

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA, MICROBIOLOGIA E
IMUNOGIA

Bárbara Bruna Muniz Figueiredo

**EFEITO DA VITAMINA D NA ATIVIDADE MICROBICIDA DE
MACRÓFAGOS A LINHAGENS DE *Mycobacterium bovis***

Juiz de Fora, 2016

BÁRBARA BRUNA MUNIZ FIGUEIREDO

**EFEITO DA VITAMINA D NA ATIVIDADE MICROBICIDA DE
MACRÓFAGOS A LINHAGENS DE *Mycobacterium bovis***

**Dissertação de Mestrado do Curso de
Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Biológicas na área
de Imunologia e DIP.**

Orientador: Dr. Henrique Couto Teixeira

Co-orientador: Dr.^a Juciane Maria de Andrade Castro

Juiz de Fora, 2016.

Figueiredo, Bárbara Bruna Muniz.

Efeito da Vitamina D na atividade microbicida de macrófagos a linhagens de *Mycobacterium bovis* / Bárbara Bruna Muniz Figueiredo. -- 2016.

67 p.

Orientador: Henrique Couto Teixeira

Coorientadora: Juciane Maria de Andrade Castro

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2016.

1. Tuberculose. 2. Vitamina D. 3. Macrófagos. 4. Óxido Nítrico. I. Teixeira, Henrique Couto, orient. II. Castro, Juciane Maria de Andrade, coorient. III. Título.

Dedico este trabalho à minha família e ao meu noivo,
pelo amor incondicional e apoio absoluto.

Agradecimento

Transformar todo o sentimento em palavras é muito difícil...

Agradeço a Deus por permitir e iluminar sempre minha trajetória.

À minha família... meus pais, Náide e José Geraldo por serem exemplos de garra, por toda compreensão nos momentos de ausência, por todo apoio e carinho... por serem os melhores pais!

Aos meus irmãos, Stéfano e Bruno, por sempre serem exemplos de determinação e pelo apoio incondicional.

Ao Célio e à Laura que sempre estiveram na torcida, e ao meu príncipe Miguel, que sempre ilumina minha vida quando sorri....

Ao meu noivo, Helder, que foi essencial com todo seu amor, apoio e incentivo. E mesmo distante, sempre se faz tão presente....

Aos meus sogros que me acolheram como filha.

Ao meu orientador, Henrique Couto Teixeira, por todos os ensinamentos em todos estes anos de orientação.

À Juciane Maria de Andrade Castro que foi muito mais do que coorientadora neste trajeto. Uma amiga que sempre esteve dando suporte nos momentos mais difíceis e aflitivos.

Ao Professor Gilson por ter auxiliado em momentos cruciais do trabalho.

Ao grupo Imuno H, Ana Márcia, Carol Almeida e Lily por todos os momentos divertidos, mesmo quando tudo estava dando errado. Mas em especial à Carol Mendonça pelo auxílio nos experimentos, mesmo que fossem durante os finais de semana, feriados ou a noite...

Aos amigos do Laboratório de Imunologia por todo aprendizado e ensinamentos. Em especial ao Érick, Flávia Márcia, Sara, Gabriela que faziam os dias mais fáceis e divertidos.

As meninas lindas que, mesmo com as conturbações do cotidiano, sempre estavam presentes.... Juliana, Bruna, Marcela, Camila.

Ao Érico, por me auxiliar em minha própria compreensão.

Aos professores da banca examinadora por se disponibilizarem a contribuir com este trabalho.

*“pode correr risco
arriscado sempre é
só não pode o medo te paralisar”*

Gessinger

Resumo

A tuberculose (TB) é a segunda maior causa de morte por doença infecciosa no mundo. O *Mycobacterium bovis* é um dos causadores de TB que se dispersa quando o indivíduo infectado tosse ou espirra liberando gotículas contendo as micobactérias. As micobactérias têm preferência por tecidos bem oxigenados pelo pulmão onde irão desenvolver a infecção e ativação do sistema imunológico. Um dos primeiros tipos celulares envolvidos na tentativa de controle da infecção são os macrófagos residentes que irão fagocitar as micobactérias e produzir espécies reativas nitrogênio e oxigênio na tentativa de destruir o patógeno além de produzir citocinas que irão auxiliar na ativação da resposta imune adquirida. O tratamento da TB é feito através do uso de antibióticos, mas no período pré-antibióticos, a vitamina D ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) era utilizada como forma de tratamento. A vitamina D é um hormônio esteroide que já se mostrou capaz de afetar a resposta imunológica a doenças infecciosas como a TB por meio da produção de catalecidina. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da vitamina D na atividade microbicida de macrófagos infectados com as linhagens atenuada (BCG) e selvagem (ATCC19274) de *M. bovis*. Foram utilizadas células da linhagem RAW 264.7 infectadas com as linhagens BCG e ATCC19274, tratadas com 1nM, 10nM e 100nM da forma ativa de vitamina D ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$). O teste de viabilidade celular demonstrou que as concentrações de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ utilizadas não são tóxicas para as células. Através da técnica de ELISA observamos que a $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ tende a diminuir a produção das citocinas IL-6 e IL-10. A contagem dos bacilos fagocitados realizada após coloração por Ziehl-Neelsen demonstrou que há diminuição na carga bacilar de forma proporcional ao aumento da concentração de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ corroborando com a diminuição da viabilidade das bactérias determinada pela contagem de CFU em lisado celular. Em relação à dosagem de óxido nítrico (NO), foi observado aumento proporcional à concentração de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Em conclusão, esses dados sugerem que a diminuição na carga bacilar e menor número de CFU no lisado celular possa ser consequência do tratamento com $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ que afeta algum mecanismo microbicida dos macrófagos, e que este mecanismo afetado pela $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ possa ser a produção de óxido nítrico.

Palavras-chave: Tuberculose. Vitamina D. Macrófago. Óxido Nítrico.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is the second leading cause of death from infectious disease worldwide. The *Mycobacterium bovis* is one of the TB causing agent that disperses when the infected person coughs or sneezes releasing droplets containing mycobacteria. This mycobacteria have a preference for tissues well oxygenated such as lungs where they will develop the infection, initiating the immune response. One of the first cell types involved in controlling the infection are the resident macrophages which will phagocytose mycobacteria and within the phagosome, producing reactive species nitrogen and oxygen in an attempt to destroy the pathogen, in addition to cytokines production, which construct the acquired immune response. TB treatment is done by the use of antibiotics, but in the pre-antibiotic period, vitamin D was used as a treatment. Vitamin D is a steroid hormone that has been shown to affect the immune response to infectious diseases such as TB by catalase production. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of vitamin D in the microbicidal activity of macrophages infected with the attenuated (BCG) and virulent (ATCC19274) strains of *M. bovis*. For this study were used cell line RAW 264.7 infected with the BCG strains and ATCC19274, treated with 1nM, 10nM and 100nM of the active form of vitamin D. The cell viability test showed that the concentrations used are non-toxic. Through ELISA we observed that vitamin D tends to decrease the production of IL-6 and IL-10 cytokines. The bacilli count after Ziehl-Neelsen staining demonstrated that there is a reduction in bacterial load in proportion to the concentration of vitamin D, confirming the reduction of viability of bacteria determined by counting CFU. The dosage of nitric oxide (NO) showed increased proportional to the concentration of vitamin D. We can conclude that a reduction in bacterial load and CFU count may be a result of treatment with vitamin D that affects some microbicidal mechanism of macrophage, and that this mechanism affected by vitamin D may be nitric oxide production.

Keywords: Tuberculosis. Vitamin D. Macrophage Nitric Oxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagem ilustrativa: Esquema básico do envoltório celular de uma micobactéria.....	16
Figura 2: Representação esquemática da cascata de sinalização pós ativação de receptores de reconhecimento de padrões semelhantes a Toll.....	19
Figura 3: Representação esquemática do processo de maturação sofrido pelo fagossomo até sua fusão com o lisossomo.....	21
Figura 4: Imagem ilustrativa: Produção do hormônio vitamin D	25
Figura 5: Gráfico: Teste de Viabilidade Celular – MTT.....	36
Figura 6: Gráfico: Dosagem das Citocinas IL-6, TNF- α , IL-10.....	38
Figura 7: Gráfico: Determinação da Taxa de Fagocitose.....	40
Figura 8: Gráfico: Determinação da Carga Bacilar.....	42
Figura 9: Gráfico: Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (CFU).....	45
Figura 10: Gráfico: Dosagem da produção de Óxido Nítrico.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TB – tuberculose

HIV – vírus da imunodeficiência humana

DST – teste de sensibilidade às drogas

PCR – reação em cadeia de polimerase

DOT – terapia diretamente observada

RD – região de diferença

PG – peptídeoglicano

AG – arabinogalactana

MA – ácido micólico

PIM - glicolipídio fosfatidil-mio-inositol

LM – lipomanana

LAM – lipoarabinomanana

IL – interleucina

TFN- α – fator de necrose tumoral alfa

BCG – Bacilo Calmette-Guerin

NKT – célula T natural “*killer*”

GM-CSF – fator estimulante de macrófagos

IFN- γ - interferon gama

PPRs – receptores de reconhecimento de padrões

PAMPs – padrões moleculares associados a patógenos

TLR – receptores semelhantes a Toll

Myd 88- proteína de diferenciação mielóide primária 88

MAL/TIRAP –adaptador semelhante a Myd88 associado a proteína TIR

TRIF–ativador de interferon associado ao receptor Toll

TRAM – molécula associada a Toll

SARM– proteína contendo motivos estéreis α e armadillo

TIR- domínio de homologia receptor Toll/IL-1R

NF- κ B–proteína ligadora acentuadora do fator nuclear κ

NLR – receptor semelhante a NOD

NLRP3 –receptor semelhante a NOD contendo resíduos de pirina tipo 3
CLRs – receptores de lectina do tipo C
MR – receptores de manose
GTPase – enzima que hidrolisa trifosfato guanosina
Rab5 – uma GTPase
PI3K – fosfoinositol 3 cinase
PI3P – fosfatidilinositol 3 fosfato
EEA1–autoantígeno inicial de endossomo 1
ROS – espécies reativas de oxigênio
NOX – NADPH oxidase
NADPH – dinucleotídeo de nicotinamida adenina oxidase
RNS – espécies reativas de nitrogênio
NOS – óxido nítrico sintase
nNOS – óxido nítrico sintase neuronal
eNOS – óxido nítrico sintase endotelial
iNOS – óxido nítrico sintase induzível
NO – óxido nítrico
LAM – lipoarabinomanana
SapM – fosfatase lipídica
UVB – ultravioleta B
DBP – proteína ligadora de vitamina D
CYP27B1 - 1-alpha-hydroxylase
VDR – receptor de vitamina D
VDRE – elementos responsivos à vitamina D
PTH – paratormônio

Sumário

1	Introdução	12
1.1	Tuberculose.....	12
1.2	Micobactéria.....	14
1.2	Resposta imunológica na tuberculose	17
1.3	Tuberculose e Vitamina D.....	24
2	Objetivos	30
2.1	Objetivo Geral	30
	Avaliar o efeito da vitamin D na atividade microbicida de macrófagos frente a linhagens de <i>Mycobacterium bovis</i>	30
2.2	Objetivos específicos	30
3	Material e Métodos.....	31
3.1	Cultura de Células.....	31
3.2	Micobacteria.....	31
3.3	Infecção	31
3.4	Tratamento com vitamina D	32
3.5	Análise da viabilidade celular pela técnica de MTT.....	32
3.6	Dosagem de NO	33
3.7	Dosagem de citocinas.....	33
3.8	Determinação da taxa de infecção por <i>M. bovis</i> BCG e <i>M. bovis</i> ATCC19274.....	33
3.9	Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (CFU).....	34
4.0	Análise estatística	34
4	Resultados	35
4.1	Teste de viabilidade celular.....	35
4.1	Análise da produção de citocinas.....	37
4.2	Determinação da taxa de fagocitose.....	39
4.3	Determinação da carga bacilar	41
4.4	Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (CFU) de <i>Mycobacterium</i> em lisado celular após tratamento	44
4.4	Análise da produção de NO	46
6	Conclusão	54
7	Referências	55

1 Introdução

1.1 Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa que representa a segunda maior causa de morte por doença infecciosa no mundo, sendo um problema de saúde pública. Em 2014, foram diagnosticados 9,6 milhões de novos casos e 1,5 milhão de mortes por TB (WHO, 2015). O Brasil ocupa a 17ª posição no *ranking* dos 22 países responsáveis por 80% do total de casos. São diagnosticados 70 mil novos casos e ocorrem 4,6 mil mortes em decorrência da TB no Brasil (SAÚDE, 2014). Há diversos fatores de risco que podem agravar esta situação como a pobreza e a desnutrição; consumo de álcool; silicose; falha renal crônica necessitando de diálise; infecção por HIV (do termo em inglês *Human Immunodeficiency Virus*), diabetes e terapia imunossupressiva (DHEDA; BARRY; MAARTENS, 2015).

A disseminação da doença ocorre pela formação de aerossol, após o espirro ou tosse de um indivíduo doente, contendo gotículas de saliva contaminadas pela micobactéria causadora da doença, que podem ser inaladas até os alvéolos de um novo hospedeiro (O'GARRA et al., 2013). Apesar de o contágio ser maior dentro das unidades familiares, a transmissão pode ocorrer nas mais diversas situações, desde as escolas até os transportes públicos (DHEDA et al., 2015). Em geral, a exposição à micobactéria causadora de TB não leva ao desenvolvimento dos sintomas e, apesar de aproximadamente um terço da população mundial estar infectada, apenas 12% desses indivíduos sensibilizados efetivamente desenvolvem a doença (DHEDA et al., 2015).

A micobactéria infecta preferencialmente os pulmões (tuberculose pulmonar), mas pode se desenvolver em outros sítios (tuberculose extrapulmonar). Os sintomas mais comumente observados são febre, sudorese noturna e perda de peso. Outros sintomas podem surgir dependendo do sítio de infecção como tosse acompanhada ou não de sangue e dor no peito no caso de TB pulmonar (DHEDA et al., 2015; O'GARRA et al., 2013; WHO, 2015).

A grande maioria das pessoas infectadas com *M. tuberculosis* desenvolve a tuberculose latente, forma clínica em que a infecção é contida pelo sistema imunológico (BARRY et al., 2009). A forma ativa da tuberculose ocorre quando a

infecção não é controlada pelo sistema imunológico. O risco de conversão da forma latente (quando o indivíduo não dissemina bacilos) para tuberculose ativa é de cerca de 5% a 10% em uma população saudável (HARRIES; DYE, 2006), mas pode aumentar para cerca de 50% em indivíduos com disfunção grave do seu sistema imunológico, tal como ocorre com infecção por vírus HIV (AARON et al., 2004).

O tratamento correto da TB depende da confirmação bacteriológica e do Teste de Sensibilidade às Drogas - DST (do termo em inglês *Drug Susceptibility Testing*). Um dos métodos de diagnóstico mais utilizados devido ao seu baixo custo é a baciloscopia que consiste na observação e detecção do patógeno em amostras biológicas do paciente. Porém, a baciloscopia não fornece informações sobre a viabilidade da micobactéria assim como informações sobre sua susceptibilidade aos medicamentos. O cultivo da micobactéria, apesar de ser considerado o melhor método de diagnóstico da doença, é pouco utilizado pois demora, aproximadamente, seis semanas para fornecer resultados (WHO, 2015). Há testes mais rápidos como a reação em cadeia de polimerase (PCR, do termo em inglês *polymerase chain reaction*), uma técnica de biologia molecular de amplificação de DNA (ácido desoxirribonucleico) comumente utilizada para o sequenciamento gênico, diagnóstico de doenças hereditárias e infecciosas, como a tuberculose (KIVIHYA-NDUGGA et al., 2004). Também pode ser usado, para a rápida detecção de tuberculose, ensaios como ELISA (do termo em inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) indireto para detecção de anticorpos, conforme observado por Mattos et al (2016) que, em seu estudo, detectaram níveis significativos de anticorpos do tipo IgG específicos para antígenos do *M. tuberculosis* no soro de pacientes TB positivo, que diminuía com o tratamento. Sugerindo que a dosagem de anticorpos possa ser um método de diagnóstico rápido e seguro (MATTOS et al., 2016). A presença de sintomas, juntamente com um exame de radiografia de tórax pode ser determinante para a implantação do tratamento (O'GARRA et al., 2013).

Após confirmação da infecção pela micobactéria, tem-se início o tratamento contra TB. O tratamento hoje empregado para a TB é a combinação de quatro drogas, sendo que a isoniazida e rifampicina devem ser administradas por seis meses, em conjunto com pirazinamida e etambutol que são inseridos apenas nos dois primeiros meses de tratamento, garantindo sucesso de 85%. A longa duração e reações

adversas são os principais responsáveis pelo abandono do tratamento e consequente piora do paciente. A fim de garantir a correta adesão ao tratamento, está sendo difundida a DOT – terapia diretamente observada (do termo em inglês *Directly Observed Therapy*) que é uma das estratégias da Organização Mundial da Saúde para frear a disseminação de TB. Dentre as várias premissas da DOT está o tratamento padronizado com supervisão e apoio aos pacientes (WHO, 2015). A eficácia da DOT foi demonstrada em um estudo qualitativo realizado por Behzadifar *et al* (2015) que demonstrou que a maioria dos pacientes com tuberculose que receberam o tratamento de acordo com a DOT completaram o tratamento (BEHZADIFAR *et al.*, 2015).

1.2- Micobactéria

A tuberculose é uma doença infecto parasitária causada pelas micobactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*. As micobactérias pertencentes a este complexo apresentam 99% de similaridade gênica, havendo uma variação de aproximadamente 140 genes entre as espécies que resulta em diferenças drásticas em relação ao fenótipo, patogenicidade e tropismo ao seu hospedeiro. Estes 140 genes estão distribuídos em regiões gênicas chamadas regiões de diferença (RD) que se classificam em RD1 a RD16, RvD1 a RvD5, MiD1 a Mid3(PYM *et al.*, 2002). Algumas destas espécies são patógenos exclusivos de humanos ou roedores, enquanto outras podem infectar diferentes hospedeiros (BROSCH *et al.*, 2002; PYM *et al.*, 2002).

O complexo *M. tuberculosis* é composto por bactérias classificadas como não pigmentadas de crescimento lento, e refere-se aos agentes causadores de TB como o *Mycobacterium tuberculosis*, (PALMA-NICOLAS; BOCANEGRA-GARCIA, 2007); *Mycobacterium bovis*; *Mycobacterium africanum*; *Mycobacterium microti*; *Mycobacterium canettii*; entre outros; sendo o *M.bovis* um dos principais causadores de TB em humanos (COLLINS; GRANGE, 1987).

O envoltório micobacteriano possui características exclusivas do gênero *Mycobacterium*. É composto por uma membrana plasmática que não se difere de outras membranas biológicas, possuindo as mesmas funções metabólicas e

composição química (DAFFÉ, 2015); exceto pela presença de glicolípídeos, lipoglicanas e lipoproteínas específicas do gênero *Mycobacterium* (ANGALA et al., 2014).

Externamente à membrana plasmática está a parede celular composta por peptídeoglicano (PG), que forma uma barreira rígida mantendo a forma celular e auxiliando na sobrevivência quando houver alterações osmóticas associado a arabinogalactana (AG) e ácido micólico (MA). A parede celular é essencial para a viabilidade da célula além de ser responsável pela susceptibilidade ou resistência a muitas drogas anti-TB (ANGALA et al., 2014; HETT; RUBIN, 2008). Associada à parede celular há uma camada de ácido micólico, extremamente hidrofóbica, chamada de micomembrana que, associada a diversos tipos de lipídeos, resulta em uma barreira altamente impermeável a diversos tipos de drogas antimicrobianas, como a penicilina (DAFFÉ, 2015; MINNIKIN et al., 2002).

Alguns desses lipídios são essenciais para a fisiologia micobacteriana e para a resposta imunológica do hospedeiro, como o glicolípídeo fosfatidil-mio-inositol (PIM), lipomanana (LM) e lipoarabinomanana (LAM) que, além de serem essenciais para a sobrevivência da micobactéria, exercem importante papel na interação com o hospedeiro possuindo capacidade imunoregulatória (MISHRA et al., 2011). A LAM é capaz de inibir a resposta do hospedeiro à infecção por inibir a ação do IFN- γ sobre macrófagos e a secreção de IL-12 por estes tipos celulares. Já a LM é um importante fator de virulência por induzir uma forte resposta imunológica com muita produção de IL-12 e TNF- α assim como o PIM, que também é capaz de induzir a produção de IL-8 (BRIKEN et al., 2004).

Sobre a membrana plasmática das micobactérias há uma camada de proteínas e polissacarídeo chamada cápsula cujo principal componente são glicanas, mas sua composição varia de acordo com os nutrientes do meio, (DAFFÉ, 2015). A cápsula pode representar uma barreira passiva impedindo a difusão de macromoléculas através das outras membranas do envoltório, pode conferir proteção a espécies reativas de oxigênio; algumas glicanas da cápsula demonstram a capacidade de mediar a adesão e penetração do bacilo nas células do hospedeiro (DAFFE; ETIENNE, 1999).

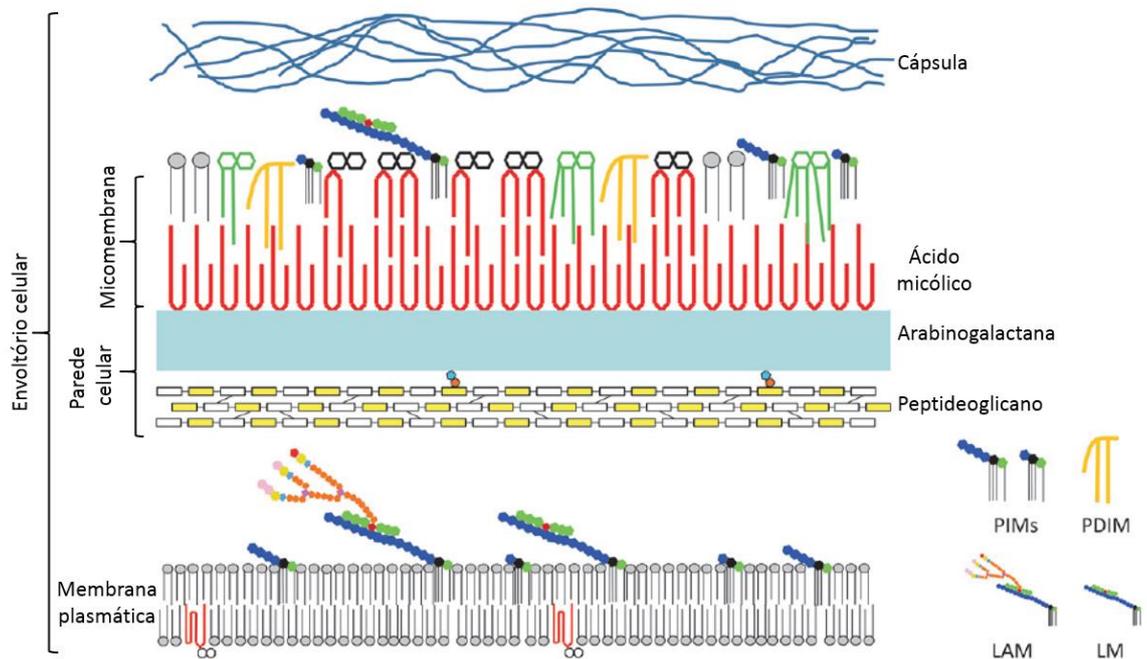


Figura 1: Representação esquemática do envoltório celular de uma micobactéria (ANGALA et al., 2014)

Dentre as micobactérias causadoras de TB, o *M. Bovis* é um dos principais responsáveis pela infecção em humanos (PYM et al., 2002). O *M. bovis* é uma micobactéria intracelular com predileção por tecidos bem oxigenados como o pulmão (KAUFMANN, 1993). Como toda micobactéria, é um bacilo reto ou ligeiramente curvo, que mede entre 0,2 a 0,6 μm de diâmetro e 1 a 10 μm de comprimento (SAÚDE/FUNASA, 2002). A variação atenuada do *M. bovis* é utilizada na vacinação de recém nascidos, a única população na qual é eficiente, e esta é a única vacina licenciada para a proteção contra TB (ORME, IAN M, 2015)

Desenvolvida por Albert Calmette e Camille Guérin, a linhagem atenuada de *M. bovis*, também conhecida como Bacilo Calmette-Guerin (BCG), foi obtida a partir da linhagem selvagem após, aproximadamente, 230 gerações, que resultou na perda de uma região gênica, da região de diferença RD1, e consequente perda da virulência. Estudos mostraram que a reinserção de RD1 em bacilos atenuados recupera a virulência destes bacilos (PYM et al., 2002) e que a retirada de RD1 da linhagem selvagem a torna atenuada (WARDS; DE LISLE; COLLINS, 2000).

Na RD1 estão contidos nove genes (Rv3871 a Rv3879) codificadores de fatores de virulência e antígenos imunogênicos como ESAT-6 (do termo em inglês *6-kDa early secreted antigenic target*) codificado pelo gene Rv3875 e CFP-10 (do termo em inglês *10-kDa culture filtrate protein*) codificado pelo gene Rv3874. Essas duas proteínas podem afetar a interação patógeno-hospedeiro comprometendo a resposta imunológica, seja promovendo o escape da micobactéria das vesículas fagossomais, seja bloqueando vias autofágicas; e os outros genes parecem ser codificadores de componentes estruturais da sistema de secreção que é responsável pela secreção do ESAT-6 e do CFP-10 (ETNA et al., 2015).

1.3 Resposta Imunológica na tuberculose

O bacilo causador da tuberculose é transmitido quando o indivíduo infectado tosse ou espirra dispersando gotículas de saliva contaminadas que podem ser inaladas, entrando em contato com as vias aéreas e alvéolos pulmonares de um novo hospedeiro e, em geral, irá residir no interior de células fagocitárias presentes no pulmão, incluindo macrófagos, neutrófilos, monócitos e células dendríticas, dando início à resposta imunológica do hospedeiro (FENNELLY et al., 2012; KANG et al., 2011).

Após inalação e direcionamento dessas gotículas até os alvéolos, a micobactéria pode infectar as células epiteliais pulmonares, porém, os macrófagos alveolares são o principal alvo da micocabctéria, e esta interação irá definir a progressão da infecção (ORME, I. M.; ROBINSON; COOPER, 2015). Os macrófagos ativados darão início à resposta granulomatosa que resultará na contenção do patógeno. O contexto da infecção resulta na atração de células T, após sua ativação em órgãos linfóides por células dendríticas, para o sítio de infecção no qual irão proliferar e liberar citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ (BANAIEE et al., 2006; KLEINNIJENHUIS et al., 2011; ORME, I. M. et al., 2015). Como resultado da interação entre a micobactéria e as células imunes do hospedeiro, tem-se a formação do granuloma cuja função é conter a infecção e eliminar a bactéria. No granuloma, composto, basicamente, por macrófagos circundados por linfócitos T cria-se um microambiente no qual a infecção é contida e cuja manutenção requer equilíbrio entre

citocinas com perfil pró-inflamatório e citocinas com perfil anti-inflamatório (ORME, I. M. et al., 2015).

O macrófago é o principal tipo celular encontrado no granuloma, e pode-se diferenciar em subtipos como as células epelióides que são macrófagos ativados que apresentam elevada produção de citocinas; células gigantes multinucleadas, resultante da fusão de vários macrófagos e apresentam baixa capacidade fagocítica, mantendo a apresentação de antígenos e os macrófagos esponjosos que são macrófagos que acumulam lipídios no interior de corpúsculos lipídicos, e perdem sua capacidade fagocítica e bactericida, permitindo a permanência da micobactéria em seu interior, que pode utilizar o lipídio armazenado como fonte nutricional (MIRANDA et al., 2012). É comum haver a formação, na região central do granuloma, de um centro necrótico cuja resposta inflamatória e dano tecidual são favoráveis para a disseminação do bacilo (MIRANDA et al., 2012).

Os macrófagos possuem papel crucial no controle e erradicação da infecção e sua interação com o bacilo e as células do sistema imune irá determinar o curso da infecção (ORME, I. M. et al., 2015). A interação inicial entre os macrófagos e o bacilo se dá por meio do reconhecimento de estruturas micobacterianas pelos receptores de reconhecimento de padrões (PPRs – do termo em inglês *pattern recognition receptors*) que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs – do termo em inglês *pathogen associated molecular patterns*). Os receptores do tipo Toll (TLR – do termo em inglês *Toll like receptors*) são expressos tanto na membrana plasmática dos macrófagos quanto em vesículas endocíticas e destes, os receptores TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR9 estão envolvidos com o reconhecimento da micobactéria (ELLSON et al., 2001; KLEINNIJENHUIS et al., 2011). A ativação destes receptores por componentes micobacterianos, leva à dimerização do receptor e ao recrutamento de proteínas adaptadoras específicas como MyD88 (do inglês, *Myeloid differentiation primary-response protein 88* – MyD88), MAL/TIRAP (“*Myd88-adaptor like/TIR-associated protein*”), TRIF (“*Toll-receptor-associated activator of interferon*”), TRAM (“*Toll-receptor-associated molecule*”) ou SARM (“*Sterile α - and armadillo-motif containing protein*”) que irão transduzir o sinal do TIR, ativando quinases e fatores de transcrição como NF- κ B (“*Nuclear factor kappa enhancer binding protein*”). A transcrição induzida por NF- κ B representa um evento central chave na defesa do

hospedeiro e nas respostas inflamatórias, com geração de moléculas efetoras envolvidas na capacidade microbicida dessas células, na promoção da resposta inflamatória e no desenvolvimento da resposta imune adaptativa. Essas moléculas incluem citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), e interleucina 1 β (IL-1 β), quimiocinas, moléculas de adesão endotelial (E-selectina) e moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86)(TAKEDA; AKIRA, 2004).

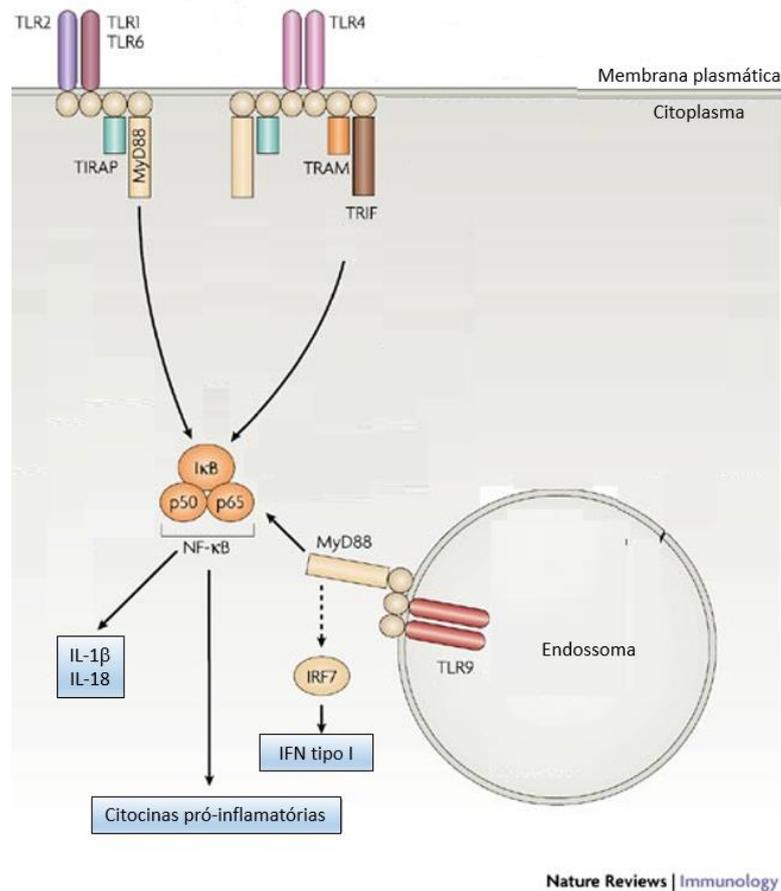


Figura 2: Representação esquemática da cascata de sinalização pós ativação de receptores de reconhecimento de padrões semelhantes a Toll. (TRINCHIERI; SHER, 2007) – modificado.

Outros receptores de reconhecimento de padrões importante na resposta ao patógeno são os receptores semelhantes a NOD (NLRs – do termo em inglês *NOD like receptors*) que desempenham papel essencial no reconhecimento de estruturas

micobacterianas, como o NOD2 que reconhece peptideoglicano culminando com a produção de citocinas pró-inflamatórias através do recrutamento de NF- κ B; e o receptor semelhante a NOD contendo resíduos de pirina tipo 3 (NLRP3- do termo em inglês *NLR pyrin domain containing 3*) que desencadeia a formação de inflamassoma (COOPER; MAYER-BARBER; SHER, 2011). Outro grupo de receptores PPR são os receptores de lectina do tipo C (CLRs – do termo em inglês *C-type lectins*) que reconhecem estruturas de polissacarídeos dos patógenos. Dentre os CLRs estão os receptores de manose (MR – do termo em inglês *mannose receptor*) que, quando ativados pela micobactéria, induz o processo de fagocitose. Por fim o receptor delectina-1 que reconhece β -glucana e induz a produção da citocina pró-inflamatória IL-6 (KLEINNIJENHUIS et al., 2011).

Após o processo de reconhecimento pelos receptores celulares, tem-se início a fagocitose. A fagocitose é um importante mecanismo biológico pelo qual o hospedeiro pode se proteger de partículas que estão no ambiente, que possam ou não ser infecciosas (PLATT; FINERAN, 2015). É o principal mecanismo utilizado por células da imunidade inata, como macrófagos e neutrófilos, e consiste na internalização de partículas como patógenos e células cenescentes por alterações no citoesqueleto celular (CHAMPION; MITRAGOTRI, 2006). Quando a partícula se liga à superfície celular, a membrana citoplasmática sofre um processo de invaginação e emissão de pseudópodes, englobando a partícula que fica retida no interior de uma vesícula – fagossomo (TJELLE; LØVDAL; BERG, 2000). Para que haja a associação do fagossomo aos lisossomos, uma vez desacoplado da membrana plasmática, o fagossomo passará por um complexo processo de maturação resultando em sua fusão com o lisossomo, formando o fagolisossomo no qual haverá a morte e degradação do conteúdo fagossomal para posterior apresentação de antígeno (VIEIRA; BOTELHO; GRINSTEIN, 2002).

No processo de maturação do fagossomo, há a participação de algumas GTPases (do termo inglês *hydrolyzeganosine triphosphate enzyme*) como a Rab5 (do termo em inglês *rat sarcoma analog in brain 5*) que é recrutada para a membrana de fagossomos recém-formados (KINCHEN; RAVICHANDRAN, 2008). Conseqüentemente, há a atração da hVPS34 (do inglês termo em inglês *human vacuolar protein sorting 34*) pertencente à classe III do grupo da fosfatidilinositol 3-

quinase – PI3K (do termo em inglês *phosphoinositide 3-kinase*) que produz fosfatidilinositol 3-fosfato - PI3P (do termo em inglês *phosphatidylinositol 3-phosphate*) na membrana do fagossomo (VIEIRA et al., 2001). Sobre a Rab5 e o PI3P irá se acoplar o EEA1 (autoantígeno inicial de endossomo1; do termo em inglês *early endosomal antigen 1*), que favorece a interação entre membranas e é característico de fagossomo que se encontra no estágio inicial de maturação (MCBRIDE et al., 1999; SIMONSEN et al., 1998). Subsequentemente, há a conversão de Rab, evento no qual ocorre a troca de Rab5 por Rab7, que é dependente de PI3P, e caracteriza os estágios finais de maturação do fagossomo que está pronto para se fundir ao lisossomo (THI; REINER, 2012).

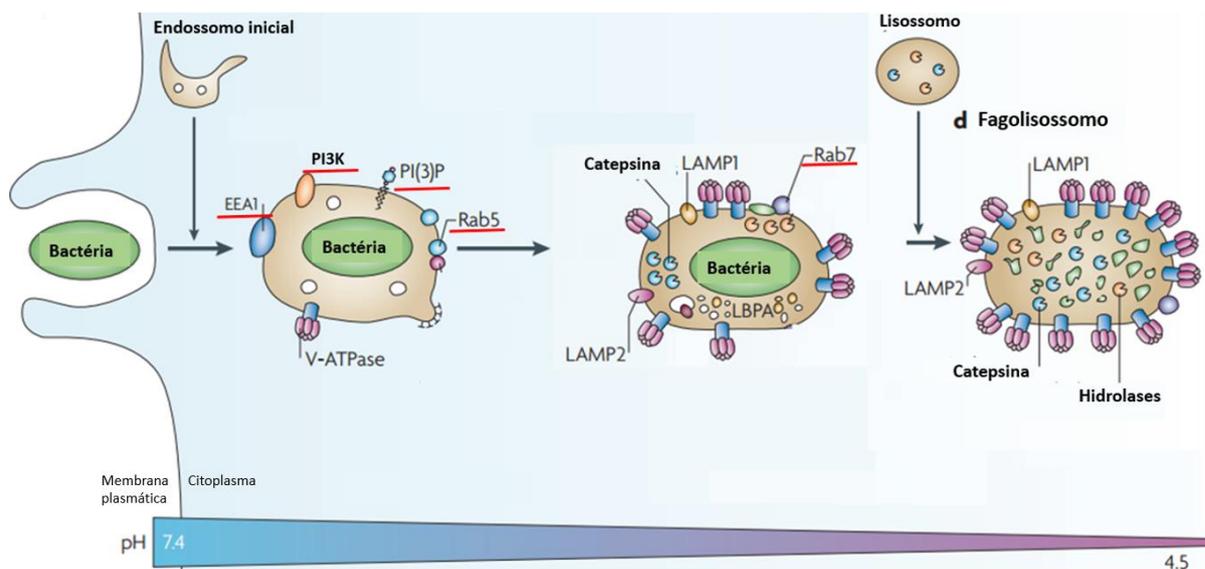


Figura 3: Representação esquemática do processo de maturação sofrido pelo fagossomo até sua fusão com o lisossomo. (FLANNAGAN; COSÍO; GRINSTEIN, 2009) – modificado.

Após a fagocitose, as células iniciarão os mecanismos microbicidas que culminarão com a eliminação do patógeno. Dentre estes mecanismos pode-se citar a produção de reativos de oxigênio (ROS) pela ação da NOX (enzima dinucleotídeo de

nicotinamida adenina fosfato oxidase; do termo em inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase-NADPH oxidase*); e a produção de reativos de nitrogênio (RNS) pela ação da NOS (do termo em inglês *nitric oxide syntase*), porém ambos mecanismos são dependentes de NADPH oxidase (FANG, 2004).

A NADPH oxidase se encontra em repouso nas células, sendo ativada quando há exposição a microrganismos ou a mediadores inflamatórios. É composta por subunidades presentes tanto na membrana plasmática, na membrana de grânulos e vacúolos (flavocitocromo *b558*: gp91^{phox}-p22^{phox}); quanto no citoplasma (p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} e Rac2) (KLEBANOFF, 2004; LAMBETH, 2004; SENGELOV, 1992). As subunidades citoplasmáticas p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} estão complexadas e, em condições de repouso, há uma alteração conformacional autoinibitória na subunidade p47^{phox}, que impede sua ligação com p22^{phox}. O estímulo celular mediado por microrganismos ou mediadores inflamatórios resulta na ativação do complexo citoplasmático e sua translocação para o flavocitocromo *b558* (LAMBETH, 2004).

A ativação do domínio p67^{phox} inicia a transferência de elétrons da NADPH oxidase para o FAD (dinucleotídeo de flaviana e adenina, do termo em inglês *flavin adenine dinucleotide*) e posteriormente, para o oxigênio molecular, gerando assim o superóxido (O₂⁻). A partir da produção do superóxido, vários outros compostos moleculares serão formados durante o *busrt respiratório oxidativo*, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), produzido espontaneamente ou pela ação da superóxido dismutase (LAMBETH, 2004). Trabalhos mostram que após a fagocitose, o complexo da NADPH oxidase pode ser encontrado na membrana do fagossomo com concomitante produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), cuja principal função é causar danos aos lipídios de membrana do patógeno levando a sua morte (BADWEY et al., 1980).

A NOS pode ser dividida basicamente em 2 grupos de enzimas: constitutiva e induzível. As classificadas como constitutivas são a NOS1 ou nNOS (prevalente em neurônios) e a NOS3 ou eNOS (prevalente em células do endotélio) (BRONTE; ZANOVELLO, 2005). Já a NOS induzível (iNOS) ou NOS2 está presente na maioria dos tipos celulares, principalmente em fagócitos como macrófagos, neste caso sendo encontrada em vesículas que se acoplam ao fagossomo (BRONTE; ZANOVELLO, 2005; CHAKRAVORTTY; HANSEN-WESTER; HENSEL, 2002). Estas são enzimas

homodiméricas que possuem um monômero com função oxidativa que apresentam sítios catalíticos para os substratos (L-arginina e oxigênio molecular), e um outro monômero com função redutora que contém sítios para a ligação de cofatores como a NADPH. Os elétrons resultantes da conversão de NADPH a NADP são transferidos para o monômero oxidativo no qual irão catalisar a reação de L-arginina com o oxigênio molecular, gerando L-citrulina e NO, que irá agir, preferencialmente, inibindo a replicação e respiração bacteriana (BRONTE; ZANOVELLO, 2005).

Em geral, após a fagocitose, patógenos intracelulares como as micobactérias, podem promover a inibição da maturação do fagossomo (RUSSELL; MWANDUMBA; RHOADES, 2002) que, sem sua acidificação e fusão com o lisossomo, se torna um nicho para a sobrevivência do patógeno, sendo um importante mecanismo de escape da resposta imunológica (STURGILL-KOSZYCKI et al., 1994). Autores mostraram que micobactérias possuem algumas maneiras de inibir a maturação do fagossomo como a SapM (fosfatase lipídica) que hidrolisa de PI3P (VERGNE et al., 2005) e a LAM (lipoarabinomanana) que inibe a enzima PI3K (MALIK et al., 2003). Além disso, sendo a NADPH oxidase um fator comum a ambos os mecanismos microbicidas, a alteração na sua ativação seria uma boa forma de escape de patógenos intracelulares. Uma molécula que, além de afetar a maturação do fagossomo, afeta também a ativação de NADPH oxidase é o PI3P. Já foi descrito que este lipídio se liga à proteína gp40^{phox}, e sua produção é dependente de PI3K, mas caso sejam utilizados camundongos/macrófagos knockout para a PI3K ou um inibidor desta enzima, a produção de NO e ROS fica comprometida (ELLSON et al., 2001; SAKAI et al., 2006).

1.4 Tuberculose e Vitamina D

Nos últimos anos, são crescentes os estudos que demonstram a importância da vitamina D na modulação do sistema imunológico especialmente frente a infecções. A deficiência de vitamina D pode estar relacionada com maior número de óbitos em decorrência de sepse e, em infecções respiratórias como a pneumonia, a suplementação com vitamina D é protetiva principalmente devido à produção de catalecidina por macrófagos (WATKINS; LEMONOVICH; SALATA, 2015). Já foi previamente demonstrado que a cascata de sinalização desencadeada pela vitamina D em fagócitos mononucleares é dependente da ativação de PI3K. Em monócitos tratados com a vitamina D é observada a formação de complexos de PI3K e o VDR, resultando em maior ativação da enzima PI3K que, dessa forma, pode estar envolvida na acentuação de mecanismos microbicidas dos monócitos tratados (HMAMA et al., 1999).

A vitamina D é um hormônio esteróide que tem como função clássica o equilíbrio e homeostase de cálcio e fosfato; e aumento na ativação de osteoblastos e osteoclastos para a formação e reabsorção óssea, respectivamente (HEWISON, 2012). Os níveis plasmáticos de vitamina D são influenciados pela luz solar (90 – 95%) e pela alimentação (5-10%). Sua síntese se inicia com a formação do colecalciferol (vitamina D₃) a partir do 7-deidrocolesterol (pré-vitamina D₃) na presença da radiação UVB. A vitamina D₃ é carregada até o fígado pela proteína ligadora de vitamina D - 1 α ,25(OH)₂D₃ (DBP) no qual é hidroxilada pela 25-hidroxilase formando 25-hidroxi vitamina D₃ (25(OH)D₃) (SMOLDERS et al., 2008). Este é hidroxilado pela enzima 25OH-D-1 α hidroxilase (CYP27B1) presente, preferencialmente, nos túbulos renais, sintetizando a forma ativa da vitamina D, 1 α ,25-dihydroxyvitamin D (1 α ,25(OH)₂D₃) ou calcitriol (FARIAS, 2009).

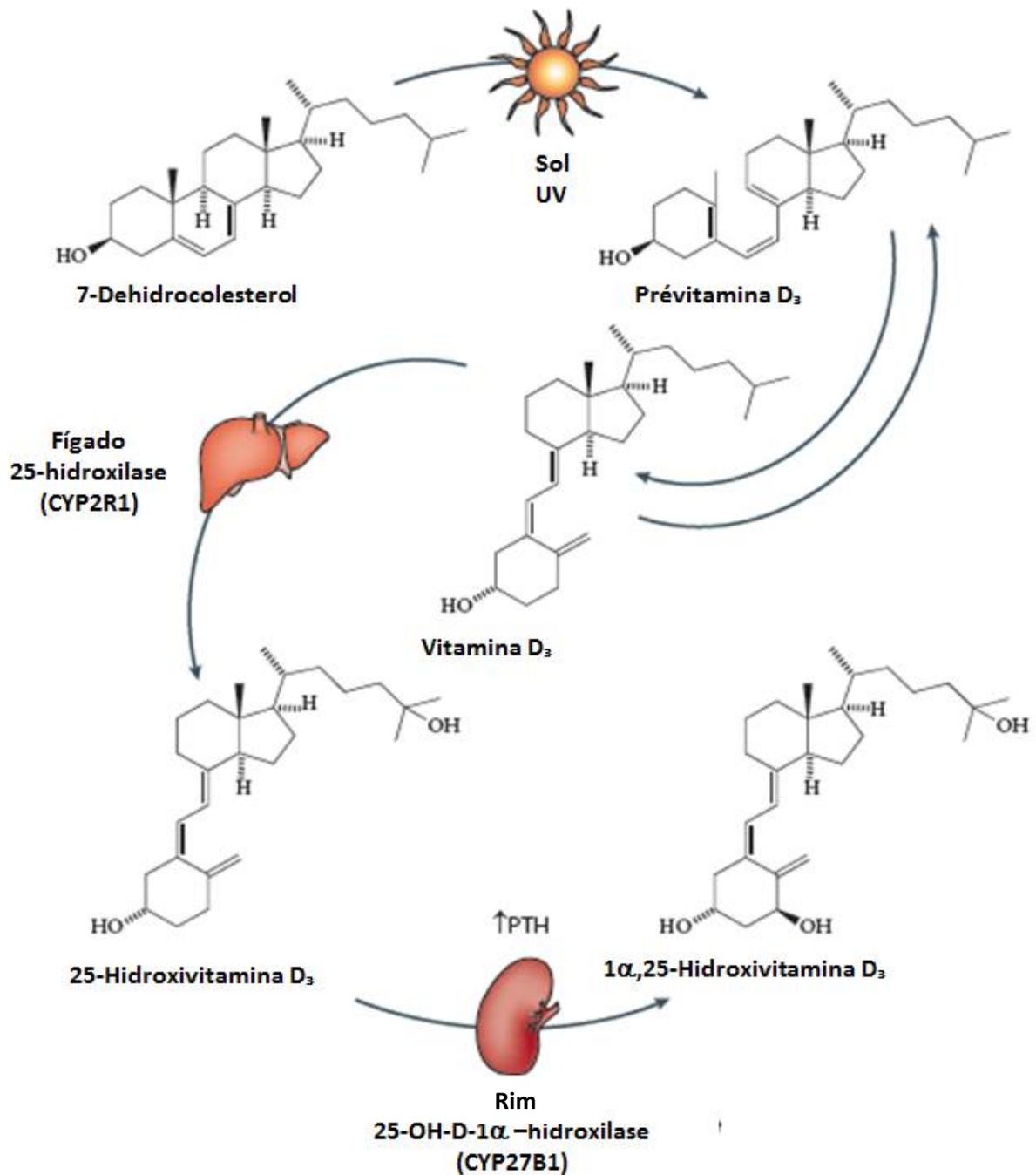


Figura 4: Produção do hormônio vitamina D - $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. A maior fonte de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ é através da irradiação ultravioleta do 7-dehidrocolesterol (pré-vitamina D₃) que, na pele, é convertido em vitamina D₃. A enzima hepática 25-hidroxilase converte avitamina D₃ em 25-hidroxivitamina D₃ (25(OH)D₃). Este é hidroxilado pela enzima 25OHD-1αhidroxilase (CYP27B1) presente, preferencialmente, nos túbulos renais, sintetizando a forma ativa da vitamina D, 1α,25-dihydroxyvitamin D ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) ou calcitriol (PLUM; DELUCA, 2010).

A vitamina D, tem sido amplamente discutida nos últimos anos. Os receptores para esta vitamina estão amplamente distribuídos em muitos tecidos e células do corpo e as concentrações adequadas desta vitamina no organismo são fundamentais para a manutenção da homeostase orgânica (HOLICK, 2006; RONCHI; SONAGLI; RONCHI, 2012).

Os efeitos mediados pela vitamina D dependem de sua ligação com seu receptor VDR (receptor de vitamina D, do termo em inglês *vitamin D receptor*), receptor nuclear que se associa a genes específicos conhecidos como elementos respondedores à vitamina D (VDRE, do termo em inglês *vitamin D response element*). Este reconhecimento ativa a transcrição desses genes resultando no efeito biológico da vitamina que, classicamente, está relacionado com a absorção de cálcio pelo organismo (CARLBERG et al., 2007).

É assumido que uma alimentação saudável é fonte abundante de vitamina D. Infelizmente são poucos os alimentos que possuem naturalmente esta vitamina, e apenas alguns são fortificados com vitamina D. Esta é uma das razões pelas quais a deficiência de vitamina D se tornou uma epidemia (HOLICK, 2004). Atualmente, a insuficiência/deficiência de vitamina D tem sido considerada um problema de saúde pública no mundo todo, em razão de suas implicações no desenvolvimento de diversas doenças (OJAIMI et al., 2013; ROOK et al., 1986).

A diminuição nos níveis séricos de vitamina D resulta na diminuição dos níveis de cálcio no organismo induzindo a produção do paratormônio (PTH) que irá agir sobre osteoclastos induzindo a reabsorção óssea, podendo gerar osteomalácia. Já foi demonstrado que a vitamina D pode estar relacionada com o desenvolvimento de diabetes tipo 2 por influenciar a resposta insulínica em estímulo à glicose. Esta influência pode ocorrer de duas formas: diretamente, se ligando ao VDR nas células β -pancreáticas; ou indiretamente por meio da ação do metabólito 25(OH)D₃ que afeta o fluxo de cálcio no interior da células β -pancreáticas, que é essencial para a conversão da pró-insulina em insulina (SCHUCH; GARCIA; MARTINI, 2009).

Alguns estudos já demonstraram que a deficiência nos níveis séricos de vitamina pode ter relação com o aumento na incidência de doenças cardiovasculares.

Nos miócitos, estão presentes os receptores para a vitamina D que suprimem fatores indutores de hipertrofia muscular e, sua deleção, além de resultar em cardiomegalia, resulta no aumento na pressão arterial e aceleração do processo de aterosclerose (BIKLE, 2014).

No câncer, a vitamina D também parece exercer influência. Dados de estudos realizados em animais e culturas celulares demonstraram que pode haver prevenção no desenvolvimento ou retardo na progressão/metástase de câncer frente ao tratamento com vitamina D, através da inibição da proliferação celular por meio do bloqueio de elementos do ciclo celular ou interferência em fatores de crescimento; induzindo a apoptose, estimulando reparo no dano do DNA e prevenindo a angiogênese tumoral (CHUNG et al., 2011).

É observada a presença do receptor de vitamina D nos mais diversos tipos celulares, inclusive em células do sistema imunológico como monócitos e linfócitos, sugerindo um papel não clássico da vitamina D que pode estar relacionado com a regulação da resposta imune (VELDMAN; CANTORNA; DELUCA, 2000).

Estudos mostram que há síntese extra-renal de vitamina D como na doença sarcóide granulomatosa na qual macrófagos de tecidos afetados agem como uma fonte de CYP27B1 resultando na produção local de vitamina D em tecidos periféricos (HEWISON, 2012). A vitamina D pode atuar sobre o sistema imune causando supressão da resposta Th1/Th17 inibindo a proliferação celular e produção de IFN- γ e IL-17 (BRUCE et al., 2010). A resposta imune de perfil Th2 também é regulada pela vitamina D que aumenta a produção de IL-4 e IL-10 em células T, o que poderia favorecer algumas patologias como a asma alérgica. Porém, a vitamina D, de forma conflituosa, induz melhora da asma, através da proliferação de células T regulatórias, inibindo a resposta Th2 (BRUCE et al., 2010).

Há relatos do papel da vitamina D afetando a resposta imunológica em doenças infecciosas como a tuberculose, principalmente induzindo a produção, em macrófagos, de um peptídeo microbicida – catalecidina; que se liga e promove a destruição da parede celular da micobactéria (COUSSENS; MARTINEAU; WILKINSON, 2014) .

De acordo com o discutido por Pareek et al. (2015), fatores ambientais além do vírus HIV e imunossupressão, podem influenciar o fenótipo da TB. Foi observado que

a deficiência de vitamina D está clinicamente correlacionada com o desenvolvimento da forma extrapulmonar de TB. Esta forma é mais comum em indivíduos do sexo feminino por, comumente, apresentarem baixos níveis séricos da vitamina (PAREEK et al., 2015). Além disso, é sabido que pessoas negras apresentam níveis pouco significativos de vitamina D quando comparados com caucasianos, devido à grande quantidade de melanina que dificulta a síntese da forma ativa da vitamina, e pode estar relacionado com o fato de serem mais susceptíveis a se infectar com o bacilo causador da TB, podendo-se supor que a vitamina afeta a capacidade bactericida da resposta imune (LIU et al., 2006).

Pensando-se no uso terapêutico da vitamina D em pacientes com tuberculose, Martineu et al (2015) demonstraram que a suplementação oral com a vitamina aumenta a imunidade de polimorfonucleares contra o *M. bovis* BCG evitando a proliferação da micobactéria; sugerindo uma possível suplementação em pacientes com TB latente a fim de evitar sua reativação (MARTINEAU et al., 2007). Além disso, na era pré-antibióticos, doses elevadas de vitamina D eram utilizadas como tratamento da tuberculose por aumentar a capacidade bactericida de macrófagos (SELVARAJ; HARISHANKAR; AFSAL, 2015).

Os macrófagos são as células que inicialmente respondem contra o bacilo através da fagocitose e formação do fagolisossomo, produção de H_2O_2 e NO (BERRINGTON; HAWN, 2007). Estudos já demonstraram que a vitamina D induz, em macrófagos infectados com *M. tuberculosis*, a produção de catalecidina, que possui elevada capacidade bactericida (LIU et al., 2007). É sabido também que a eficiência na capacidade bactericida da fagocitose é dependente da ativação da via autofágica. Bonilla et al. (2013) demonstraram que células nas quais a via autofágica havia sido inibida, apresentavam maior taxa de captura de micobactérias, porém com significativa diminuição na degradação mediada por lisossomos, favorecendo a sobrevivência das micobactérias no interior dos fagócitos (BONILLA et al., 2013).

Autofagia é um processo utilizado para manutenção do equilíbrio celular que envolve a captura e degradação lisossomal de porções de citosol ou organelas em resposta ao estresse ou a estímulos diversos, incluindo à infecção (DERETIC; LEVINE, 2009). Embora a autofagia seja fundamentalmente um processo de "autoingestão", também facilita a degradação de patógenos intracelulares (processo

conhecido como 'xenofagia') (XU; EISSA, 2010). Rook et al.(1986) mostraram que vitamina D suprime a proliferação do *M. tuberculosis* em monócitos humanos possivelmente pelo aumento dos níveis de autofagia, visto que a inibição da maturação fagossomal promovida pela micobactéria, pode ser revertida estimulando-se a autofagia, que resulta na colocalização do fagossomo com vesículas autofágicas e supressão da sobrevivência da bactéria no interior da célula hospedeira (ROOK et al., 1986).

Sendo os macrófagos as principais células envolvidas na interação direta com as micobactérias, nos propomos neste estudo a avaliar o efeito da vitamina D na atividade de macrófagos após a infecção *in vitro* com diferentes linhagens do *M. bovis*.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da vitamina D na atividade microbicida de macrófagos frente a linhagens de *Mycobacterium bovis*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 infectados com as linhagens BCG e ATCC19274, tratados com 1nM, 10nM e 100nM de vitamina D, por meio da reação de Greiss.
- Avaliar a produção das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 por macrófagos murinos imortalizados infectados com as linhagens BCG e ATCC19274, tratados com 1nM, 10nM e 100nM de vitamina D por meio da técnica de ELISA direto.
- Avaliar a toxicidade das concentrações de vitamina D utilizadas como tratamento por meio da técnica de MTT.
- Avaliar a taxa de fagocitose dos bacilos por meio da coloração pela técnica de Ziehl–Neelsen.
- Avaliar a viabilidade das bactérias fagocitadas por meio da contagem de Unidades Formadoras de Colônia – CFU.

3 Material e Métodos

3.1 Cultura de Células

As células RAW 264.7, macrófagos peritoneais murinos imortalizados, foram mantidas em meio RPMI-1640 suplementado (2 mM L-glutamina, 100 µg/mL de estreptomicina e penicilina, 5% de soro fetal bovino); incubadas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, respeitando-se um tempo mínimo de sete dias pós-descongelamento para adaptação das células.

3.2 Micobacteria

A linhagem atenuada do *Mycobacterium bovis* bacilo Calmette–Guerin (BCG; Substrato Moreau) foi obtida da Fundação Ataufo Paiva, Rio de Janeiro. A linhagem selvagem *Mycobacterium bovis* (ATCC19274) foi concedida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. As linhagens atenuadas (BCG) e selvagens (ATCC19274) de *M. bovis* foram mantidas em meio de cultura Lowenstein–Jensen (L–J) e, após 21 dias, foram colocadas em tubo contendo pérolas de vidro, agitadas vigorosamente por 5 min para desfazer os grumos, e ressuspendidas em PBS (do termo em inglês *phosphate buffer saline*) a fim de se alcançar a concentração bacteriana desejada para a infecção, de acordo com escala Mc Farland.

3.3 Infecção

As células RAW 264.7 foram plaqueadas em placas de 96 e 24 poços (que continham lamínula no fundo de cada poço) em uma concentração de 2x10⁶ células/mL. As células foram infectadas com as linhagens BCG e ATCC19274, de forma a se obter uma taxa de Multiplicidade de Infecção (MOI – do termo em inglês, *multilicity of infection*) de 10:1 bactérias por macrófago. Após 2h de incubação a 37° e 5%CO₂, o meio foi removido e as placas lavadas 3 vezes com PBS em temperatura ambiente para remover as bactérias que não foram fagocitadas, e um meio novo contendo as devidas concentrações de vitamina D(ver ítem 3.4) para tratamento e

livre de antibiótico foi adicionado. Em 24 e 48h após infecção, o sobrenadante foi removido e armazenado a -20°C para posterior análises de citocinas e dosagem de NO. As lamínulas foram removidas do fundo das placas de 24 poços e fixadas com paraformaldeído 1% para posterior coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen.

3.4 Tratamento com vitamina D

A vitamina D é um hormônio esteroide que pode afetar a capacidade bactericida da resposta imune (LIU et al., 2006). Para nosso estudo os macrófagos foram, plaqueados, infectados e posteriormente tratados com as concentrações de 1nM, 10nM e 100nM de vitamina D (Sigma-Aldrich, St. Louis – MO – Estados Unidos). Após 24h e 48h de incubação em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, os sobrenadantes foram coletados e estocados a -20°C para análises posteriores, e as células fixadas com paraformaldeído 1%.

3.5 Análise da viabilidade celular pela técnica de MTT

A viabilidade celular foi determinada através de ensaio de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). O ensaio é baseado na capacidade que as células vivas têm em converter MTT, de coloração amarelada em cristais de formazan de coloração violeta. A intensidade da coloração indica a viabilidade das células, e a absorbância foi medida por espectrofotômetro (Spectramax 190). A análise da sobrevivência relativa ou percentual de sobrevivência foi calculada segundo a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de células viáveis} = \frac{\textit{Absorbância da Amostra}}{\textit{Absorbância média do controle}} \times 100$$

3.6 Dosagem de NO

Os sobrenadantes das culturas foram analisados quanto à produção de óxido nítrico pela reação de Greiss. Para fazer esta mensuração do NO, alíquotas de 50µL das amostras foram incubadas com 50µL dos reagentes (25µL de solução de sulfanilamida 1% e 25µL de solução de N-naphthylethylenediamine dihydrochloride 0,1% em 2,5% de H₃PO₄) à temperatura ambiente por 10 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570nm.

3.7 Dosagem de citocinas

Os sobrenadantes das culturas foram analisados quanto à produção das citocinas IL-6, TNF- α , IL-10. A detecção foi realizada através de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) utilizando-se anticorpos adquiridos comercialmente, de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences – CA – Estados Unidos). A leitura foi realizada em leitor de microplaca (Spectramax 190; Molecular Devices, Sunnyvale, CA) em comprimento de onda de 450 nm.

3.8 Determinação da taxa de infecção por *M. bovis* BCG e *M. bovis* ATCC19274

Para determinação da taxa de fagocitose e carga bacilar, após fixação com paraformoldeído 1%, foram confeccionadas lâminas coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen. Algumas bactérias são resistentes aos métodos comuns de coloração devido à constituição altamente lipídica de sua parede celular. A Técnica de Ziehl-Neelsen é um processo de coloração especial, a quente, e as bactérias uma vez coradas, não sofrem ação de descolorantes fortes como o álcool-ácido. Assim, todas as bactérias serão coradas de vermelho pela fucsina e, após a descoloração com álcool-ácido, somente os bacilos álcool-ácido resistentes conservarão esta cor. E para facilitar a visualização, o fundo é corado com azul de metileno. De acordo com a padronização de Rodrigues et al, após a coloração das lâminas, o número de macrófagos contendo bacilos foi determinado assim como o número de bacilos por macrófago infectado. Para determinar a taxa de fagocitose, foi feita a contagem do número de

macrófagos infectados por 100 macrófagos analisados, por lâmina. E para determinação da carga bacilar, analisamos 100 macrófagos infectados por lâmina e estes foram classificados entre macrófagos que possuem de 1 a 10 bacilos fagocitados (<10 bacilos) e macrófagos que possuem mais de 10 bacilos fagocitados (>10bacilos) (RODRIGUES et al., 2013).

3.9 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (CFU)

Inicialmente as células foram lisadas para a liberação das micobacterias fagocitadas. Para isso, o sobrenadante foi retirado e acrescentada solução estéril em água destilada a 0,1% de Triton-100 que promove a lise celular. A partir desta solução contendo as bactérias liberadas, foram preparadas diluições da ordem de 1/10 até a diluição 10^{-4} em PBS (tampão fosfato-salino, do termo em inglês *phosphate buffered saline*) estéril. De cada diluição foi colhida uma amostra de 50 μ L para cultivo (utilizando-se a técnica de espalhamento na placa (*spread plate*) em meio seletivo LJ que foi posteriormente incubado por 21 dias em estufa a 37°C e 4% de CO₂ para contagem do CFU.

4.0 Análise estatística

Os dados são apresentados com a média e desvio padrão. A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o Graphpad Prism 6.00 e os resultados submetidos ao teste t de *student* para amostras não pareadas. Foram consideradas diferenças significativas aquelas com valores de $p < 0,05$.

4 Resultados

4.1- Teste de viabilidade celular

Para certificar se as concentrações utilizadas neste estudo são tóxicas, foi realizada a técnica MTT para determinação da viabilidade celular. Foi observado aumento significativo na viabilidade das células RAW tratadas com 10nM e 100nM de vitamina D quando comparado com o controle não infectado e não tratado (Figura 2A). Nas células da linhagem RAW infectadas com a linhagem BCG, foi observada diminuição significativa na viabilidade celular quando comparado com o controle não infectado não tratado (Figura 2B); assim como aumento significativo na viabilidade das células quando tratadas com 100nM de vitamina D quando comparado com o controle infectado não tratado (Figura 2B). No grupo infectado com a linhagem ATCC19274 não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos quando comparados com o controle infectado não tratado (Figura 2C).

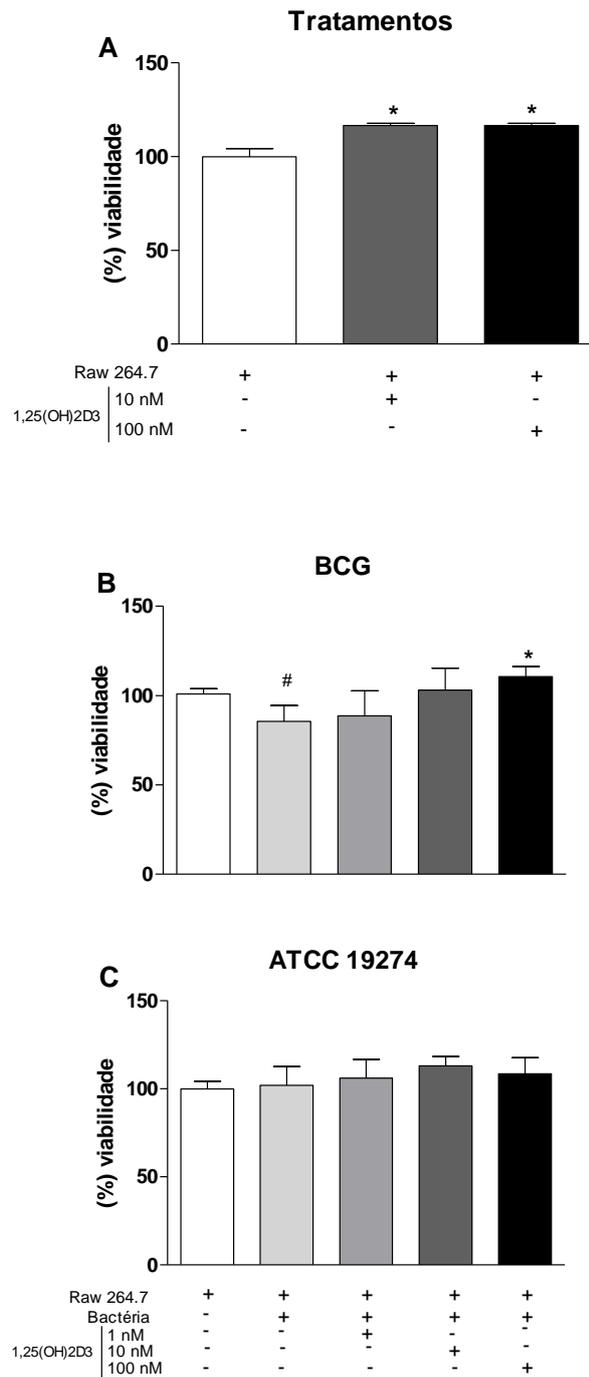


Figura 5– Análise do percentual de viabilidade celular. Avaliação, por MTT, da viabilidade das células RAW 264.7 tratadas com 10nM e 100nM de vitamina D (**A**); tratadas com as diferentes concentrações de vitamina D e infectadas com a linhagens atenuada – BCG (**B**) e selvagem – ATCC19274(**C**)de *M. bovis*, após 48h de incubação. * $p < 0,05$ em relação ao grupo infectado e não tratado. # $p < 0,05$ em relação ao grupo não infectado e não tratado.

4.1 Análise da produção de citocinas

A resposta imune inata contra patógenos intracelulares pode desencadear a produção de várias citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-1, IL-12; assim como citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (TAKEDA; AKIRA, 2004) que favorecem ou não o combate direto ao patógeno. Já foi demonstrado que a vitamina D é capaz de afetar a produção de citocinas e expressão de receptores celulares, influenciando no tipo de resposta imunológica (CHUN; ADAMS; HEWISON, 2011). Portanto, o primeiro objetivo foi avaliar o perfil de produção de algumas citocinas por macrófagos infectados e tratados com as diferentes concentrações de vitamina D. Não foram observadas diferenças significativas na produção das citocinas IL-6, TNF- α e IL-10 por macrófagos infectados com a linhagem BCG e tratados com as diferentes concentrações de vitamina D, quando comparados com o grupo infectado e não tratado (Figuras 4A, C e E, respectivamente). Em macrófagos infectadas com a linhagem ATCC19274, é observada significativa diminuição na produção de IL-6 quando tratados com 10nM e 100nM de vitamina D, comparado com o grupo infectado e não tratado (Figura 4B); significativo aumento na produção de TNF- α quando tratados com 1nM de vitamina D, comparado com o grupo infectado e não tratado (Figura 4D); e significativa diminuição na produção de IL-10 quando tratados com 10nM de vitamina D, comparado com o grupo infectado e não tratado (Figura 4F).

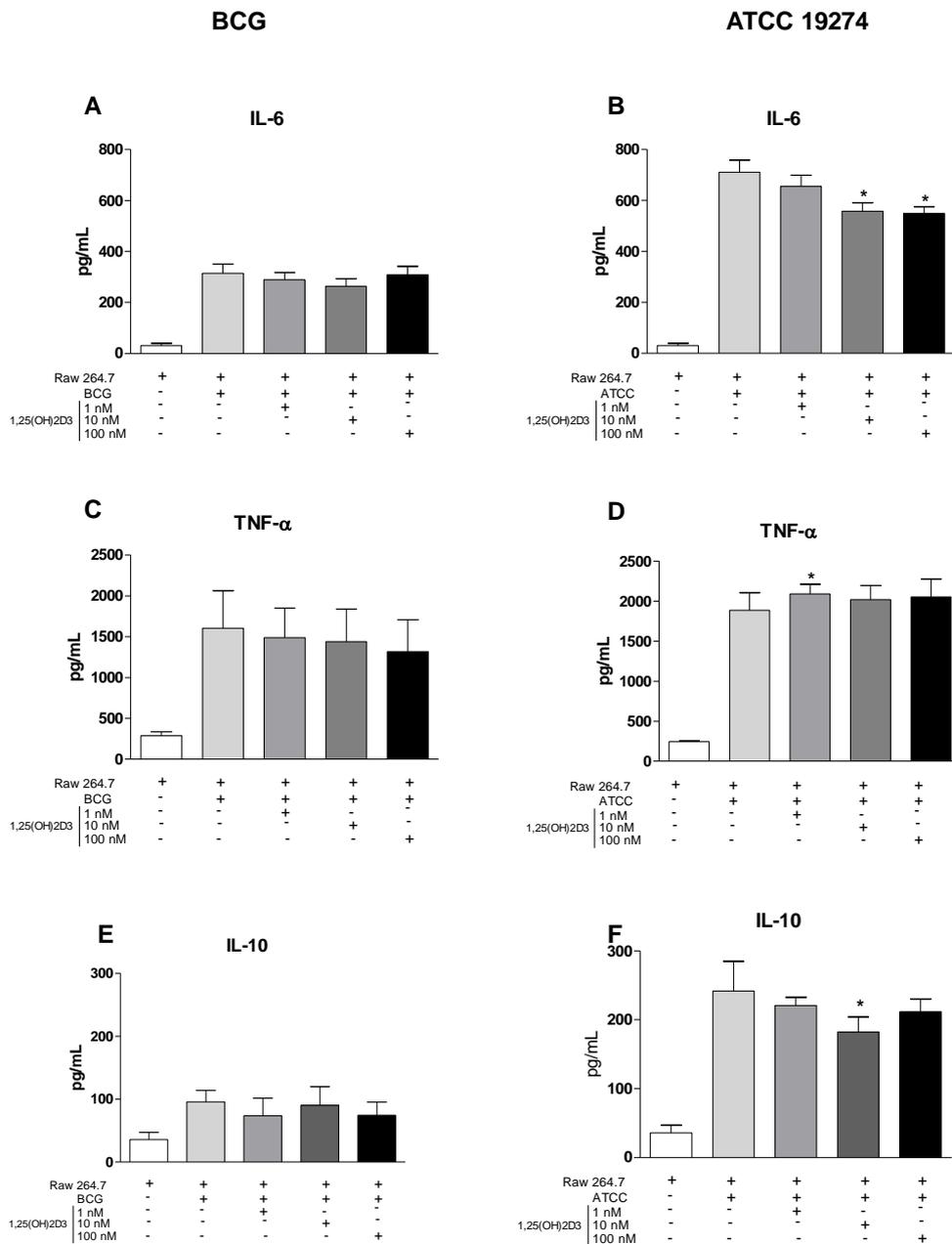


Figura 6—Análise do perfil de produção de citocinas. Avaliação, por ELISA, da produção de citocinas no sobrenadante de células infectadas com a linhagens atenuada – BCG(A, C, E) e selvagem – ATCC19274(B, D, F) de *M. bovis*, tratadas com as diferentes concentrações de vitamina D, após 24h de incubação. * $p < 0,05$ em relação ao grupo infectado e não tratado. $n = 5$.

4.2 Determinação da taxa de fagocitose

Após o reconhecimento do patógeno pelos receptores celulares, tem-se início a fagocitose, na qual ocorre a internalização do patógeno, sendo este processo essencial para o controle da infecção (VIEIRA et al., 2002). Para análise da fagocitose foi realizada a coloração das lâminas pelo método de Ziehl-Neelsen e determinada a porcentagem de macrófagos infectados. No grupo infectado com a linhagem BCG (Figura 5A), a média de macrófagos infectados decresce de 89 observada no grupo infectado não tratado, para 85, 83 e 81 observado nos grupos tratados com 1nM, 10nM e 100nM de vitamina D, respectivamente. No grupo infectado com a linhagem ATCC19274 (Figura 5B), há diminuição na média de macrófagos infectados de 71, observado no grupo infectado não tratado, para 59, 65 e 59 observado nos grupos tratados com 1nM, 10nM e 100nM de vitamina D, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) nas amostras analisadas.

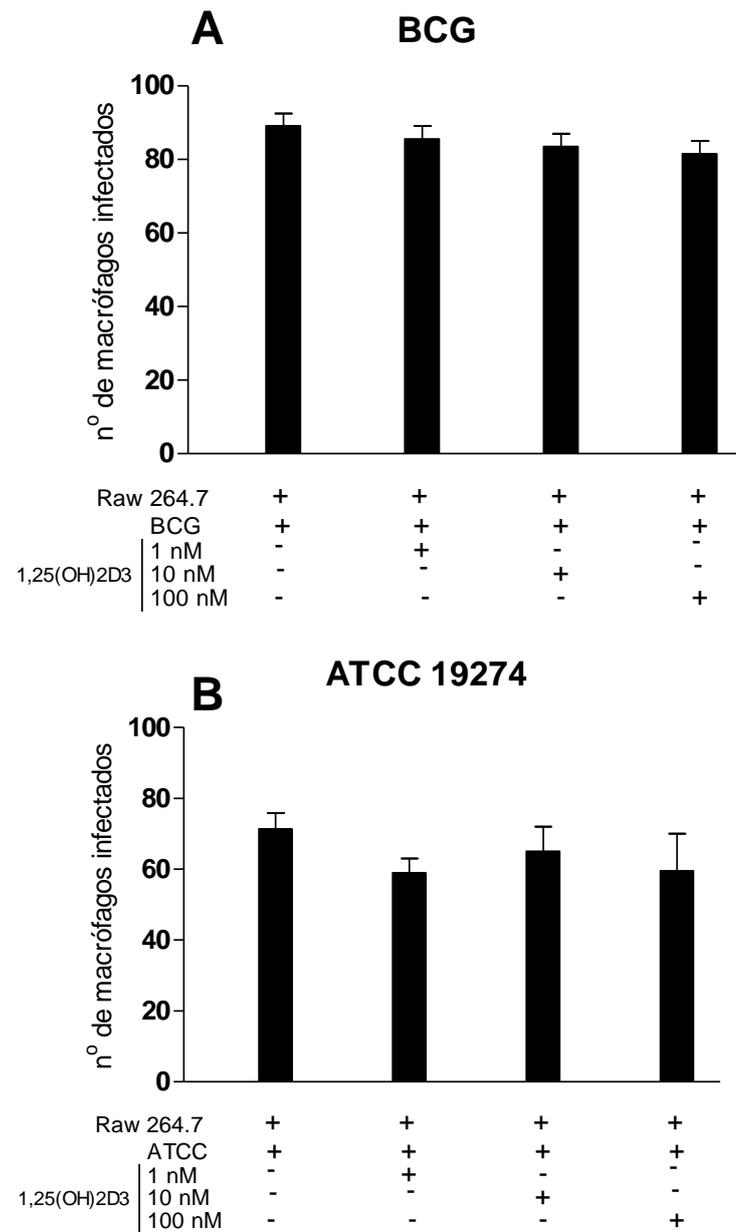


Figura 7– Determinação da taxa de fagocitose. Após coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen, foram analisados 100 macrófagos para a determinação da taxa de fagocitose nos grupos infectados com as linhagens atenuada– BCG (**A**) e selvagem-ATCC19274 (**B**) de *M. bovis*, tratadas com as diferentes concentrações de vitamina D, após 48h de incubação. n = 3.

4.3 Determinação da carga bacilar

Após coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen e determinação da taxa de fagocitose, foi realizada a contagem de bacilos em 100 macrófagos infectados analisados por lâmina, em microscópio de luz em aumento de 100X. As células foram classificadas como macrófagos que possuem de 1 a 10 bacilos fagocitados (<10 bacilos – Figura 6A) e macrófagos que possuem mais de 10 bacilos fagocitados (>10 bacilos – Figura 6B). No grupo infectado com a linhagem BCG (Figura 6C), o número de macrófagos infectados com >10 bacilos decresce significativamente nos grupos tratados com 10nM e 100nM de vitamina D quando comparado com o controle infectado não tratado, seguido de proporcional aumento no número de macrófagos infectados com <10 bacilos, sendo este aumento significativo para os grupos tratados com 10nM e 100nM de vitamina D quando comparado com o grupo infectado não tratado. No grupo infectado com a linhagem ATCC19274, há diminuição no número de macrófagos infectados com >10 bacilos que decresce significativamente nos grupos tratados com 10nM e 100nM de vitamina D quando comparado com o grupo infectado não tratado; seguido de aumento no número de macrófagos infectados com <10 bacilos, sendo este aumento significativo para os grupos tratados com 10 e 100 nM de vitamina D quando comparados com o controle infectado não tratado.

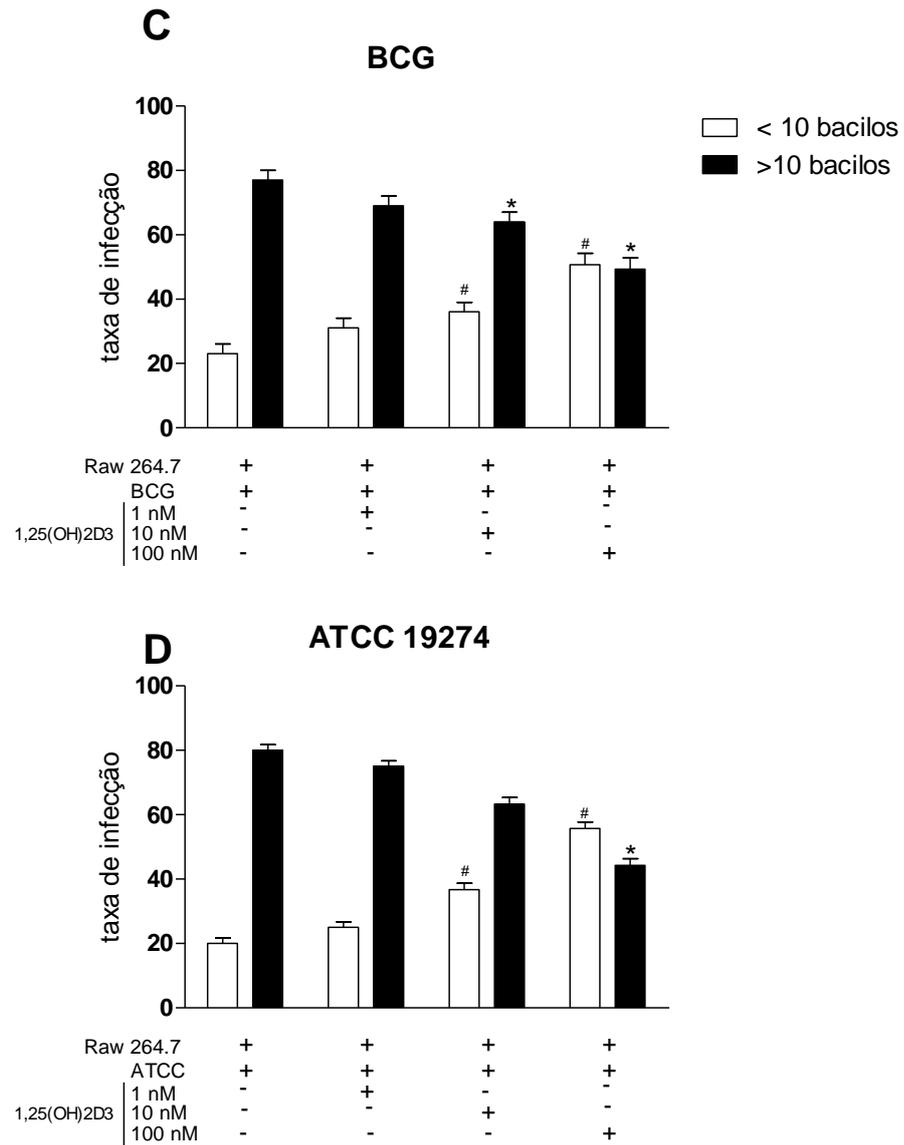
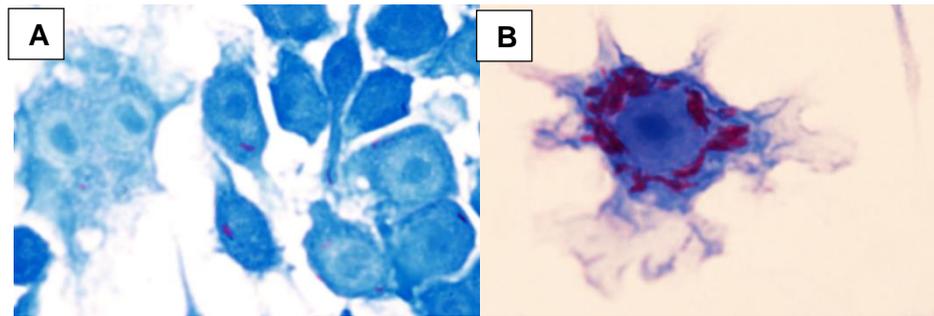


Figura 8– Determinação da carga de infecção. Após coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen, foram analisados, em microscópio de luz e aumento de 100X, 100 macrófagos para a determinação da taxa de infecção (<10 bacilos por macrófago **[A]** ou >10 bacilos por macrófago **[B]**)

nos grupos infectados com a linhagens atenuada – BCG **(C)** e selvagem – ATCC19274 **(D)** de *M. bovis*, tratadas com as diferentes concentrações de vitamina D, após 48h de incubação. * $p < 0,05$. n = 3.

4.4- Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (CFU) de *Mycobacterium* em lisado celular após tratamento

A fim de analisar a viabilidade das micobactérias que foram fagocitadas, foi realizado um ensaio para contagem das Unidades Formadoras de Colônias. Em células RAW infectadas com a linhagem BCG foi observada diminuição significativa ($p < 0,05$) no número de CFU nos tratamentos de 10nM e 100nM de vitamina D quando comparados com o controle infectado não tratado (Figura 7A). No grupo infectado com a linhagem ATCC19274 foi observada diminuição significativa ($p < 0,05$) no número de CFU nos tratamentos de 10nM e 100nM de vitamina D quando comparados com o controle infectado não tratado (Figura 7B).

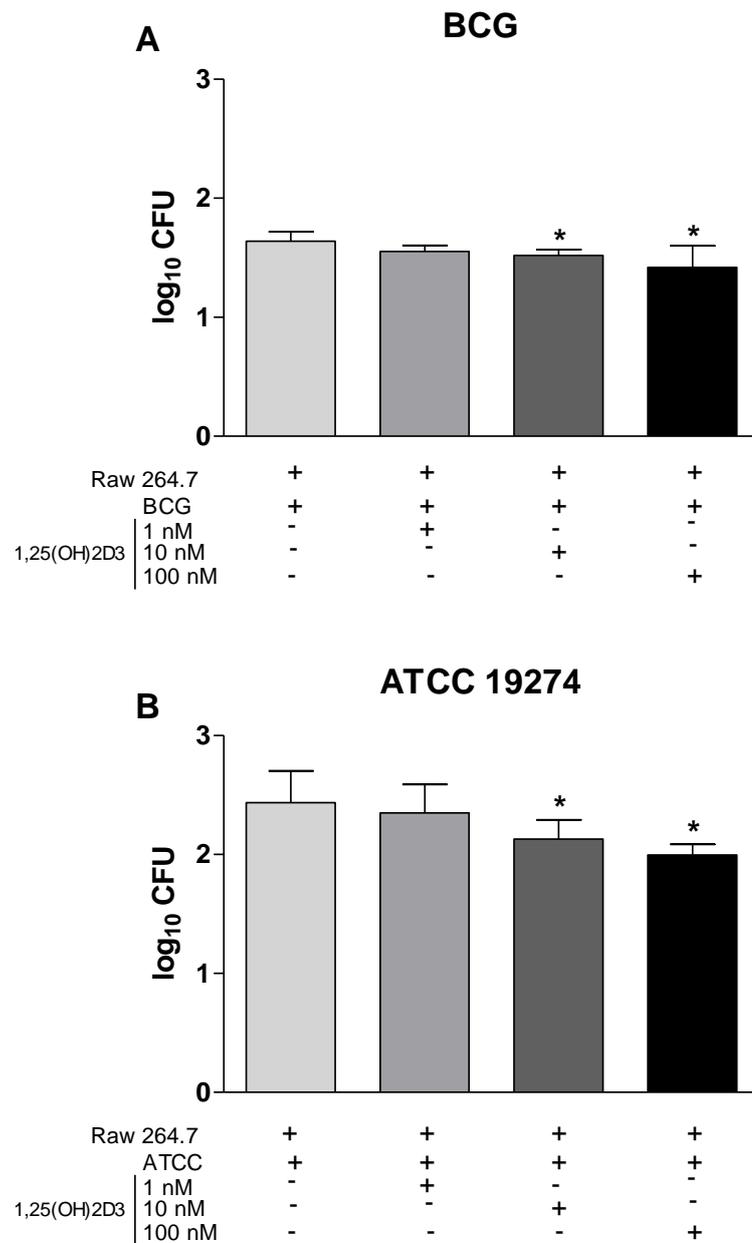


Figura 9 – Avaliação da viabilidade das linhagens atenuada (BCG) e selvagem (ATCC19274) de *M. bovis*. Através da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (CFU) em meio de cultura LJ foi determinada a viabilidade das micobactérias das linhagens atenuada –BCG (A) e selvagem – ATCC19274 (B) após fagocitose, e 21 dias de incubação. * $p < 0,05$ em relação ao grupo infectado e não tratado. $n = 6$.

4.4 Análise da produção de NO

A produção de espécies reativas de nitrogênio é um importante mecanismo microbicida utilizado pelas células fagocitárias para controle e erradicação da infecção por patógenos intracelulares (FANG, 2004). Há relatos de que a vitamina D é capaz de afetar a produção de NO em células endoteliais (ANDRUKHOVA et al., 2013) e em macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) (MORRIS; SELVARAJ, 2014). A quantificação da produção de NO por macrófagos infectados e tratados com as diferentes concentrações de vitamina D mostrou, tanto na infecção mediada pela linhagem BCG (Figura 8A), quanto na infecção mediada pela linhagem ATCC19274 (Figura 8B), aumento significativo na produção de NO em todas as concentrações do tratamento com vitamina D, quando comparado com o grupo infectado não tratado.

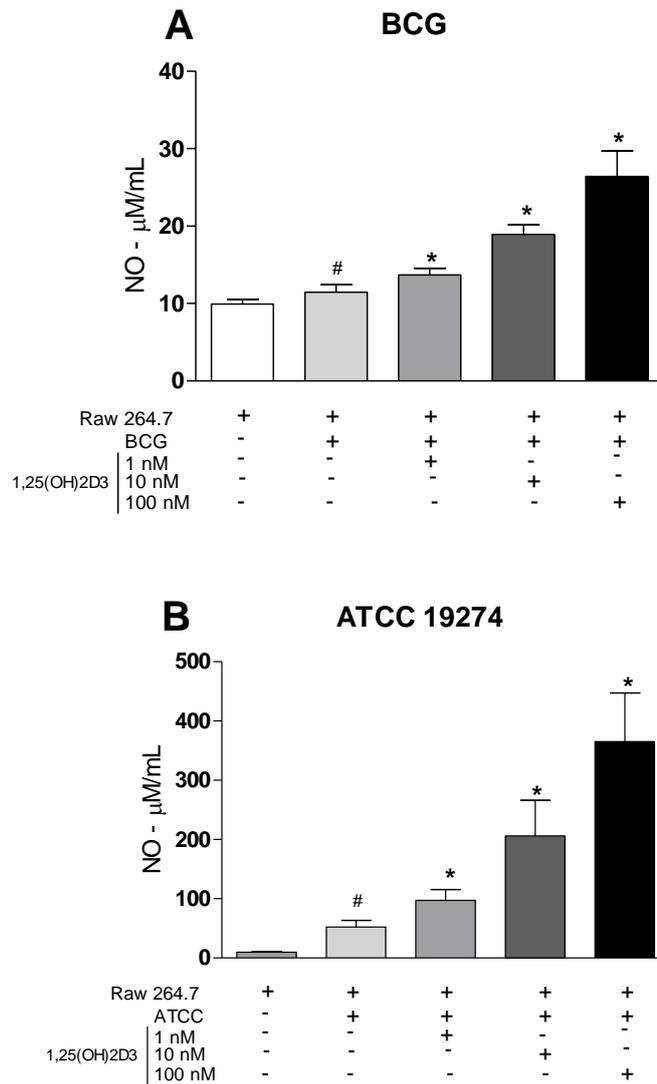


Figura 10 – Análise da produção NO. Avaliação, pela reação de Greiss, da produção de NO no sobrenadante de células infectadas com as linhagens atenuada – BCG **(A)** e selvagem – ATCC19274 **(B)** de *M. bovis*, tratadas com as diferentes concentrações de vitamina D, após 48h de incubação.* $p < 0,05$ em relação ao grupo infectado e sem tratamento. # $p < 0,05$ em relação ao grupo não infectado e sem tratamento.

5 Discussão

Estudos já demonstraram que há síntese extra-renal de vitamina D em tecidos periféricos assim como seu receptor específico está presente em diversos tipos celulares, incluindo células do sistema imunológico, sugerindo um possível papel da vitamina D na regulação da resposta imune (HEWISON, 2012). A deficiência de vitamina D tem sido considerada um problema de saúde pública por estar relacionada a diversas desordens esqueléticas, de hipertensão, doenças cardiovasculares, resistência à insulina, diabetes mellitus (DMT2), dislipidemias, alguns tipos de cânceres, osteoartrite sobrepeso, obesidade, e também na maior susceptibilidade à tuberculose (OJAIMI et al., 2013; ROOK et al., 1986).

Já foi demonstrado que a vitamina D suprime a proliferação do *M. tuberculosis* em monócitos humanos (ROOK et al., 1986) provavelmente pelo aumento da autofagia e produção de catalecidina, e que a suplementação com a vitamina D acelera a recuperação clínica de pacientes com TB que apresentavam níveis séricos reduzidos desta vitamina (SALAHUDDIN et al., 2013) demonstrando sua importância na patogênese da tuberculose. Por este motivo, investigamos como a vitamina D interfere na capacidade bactericida e inflamatória de macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 infectados com as linhagens selvagem (ATCC19274) e atenuada (BCG) do *M. bovis*.

Há relatos de que a vitamina D seja capaz de afetar o ciclo celular e a indução de apoptose em células de tumor de mama, através da translocação da proteína pró-apoptótica Bax (NARVAEZ; ZINSER; WELSH, 2001); e linfoma de células B no qual 100nM de vitamina D é responsável pela indução de um percentual de necrose de 40% das células tumorais (KOZIELEWICZ et al., 2015). Dessa forma, nosso primeiro objetivo foi avaliar se as concentrações de vitamina D poderiam afetar a viabilidade celular. Observamos que há aumento significativo na viabilidade celular para ambas as concentrações testadas (10nM e 100nM) demonstrando que as concentrações adotadas não são tóxicas. Perfil que se assemelha ao observado nos grupos infectados e tratados com as concentrações de vitamina D, que demonstram tendência no aumento da viabilidade celular para todos os tratamentos, para ambos os grupos (BCG e ATCC19274), sendo que o aumento da viabilidade celular do grupo infectado com a linhagem BCG e tratado com 100nM de vitamina D é significativo.

Este achado corrobora com o que já foi descrito em outros estudos nos quais a vitamina D seria responsável pela indução da proliferação de monócitos e macrófagos (MORA; IWATA; VON ANDRIAN, 2008; OHTA et al., 1985).

No grupo infectado com o *M. bovis* BCG mas não tratado com vitamina D, foi observada diminuição significativa na viabilidade das células RAW 264.7 quando comparado com o controle não infectado não tratado. Por outro lado, no grupo infectado com a linhagem ATCC19274 mas não tratado com vitamina D, não foram observadas diferenças significativas na viabilidade celular quando comparado com o grupo controle não infectado. Um dos mecanismos de defesa de macrófagos infectados é a indução de apoptose, pois assim os corpos apoptóticos serão fagocitados por outros macrófagos favorecendo o controle da infecção (SPIRA et al., 2003). A linhagem selvagem de *M. bovis* possui mecanismos capazes de modular a apoptose de macrófagos impedindo que esta ocorra nos primeiros momentos da infecção, favorecendo a proliferação da micobactéria no ambiente intracelular (FLANNAGAN et al., 2009). Diferente do observado quando a infecção se dá pela linhagem atenuada de *M. bovis* que não possui mecanismos de inibir a apoptose precoce, justificando a diminuição na viabilidade celular observada. Segundo Rodrigues et al (2013), esta modulação da apoptose pode estar relacionada com expressão de receptores de superfície para TNF- α do tipo 1 (TNFR1), assim como sua liberação na forma solúvel (sTNFR1). O TNFR1 é responsável pela sinalização e indução de apoptose e sua expressão na superfície é regulada positivamente pela linhagem BCG nos estágios iniciais de infecção provocando apoptose. Já para a linhagem ATCC19274 este receptor é clivado da superfície celular liberando formas solúveis que inibem a atividade pró-apoptose do TNF- α neste estágio da infecção (RODRIGUES et al., 2013).

Após a infecção com as linhagens de *Mycobacterium*, as células fagocíticas produzem citocinas pró-inflamatórias que irão auxiliar no combate ao patógeno. Durante a resposta imune ao *Mycobacterium*, o equilíbrio na produção de citocinas de perfil pró- e anti-inflamatório determinará a efetiva eliminação do patógeno ou a sobrevivência do mesmo no meio intracelular (RUSSELL et al., 2009). Neste estudo, utilizamos macrófagos peritoniais murinos imortalizados da linhagem RWA 264.7, e analisamos a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6. A análise da

produção destas citocinas no sobrenadante das culturas mostrou que vitamina D aumenta a produção de TNF- α por macrófagos infectados com a linhagem ATCC19274 de *M. bovis*. Já foi demonstrado que o TNF- α é uma importante citocina para o controle da infecção causada por micobactérias. Camundongos deficientes em TNF- α ou que este tenha sido neutralizado durante a fase crônica da infecção, não conseguem conter a infecção e sucumbem rapidamente à doença, já que a produção de quimiocinas fica comprometida e não ocorre a atração de outros tipos celulares para a formação do granuloma (LIN et al., 2007).

A IL-6 é uma importante citocina pró-inflamatória que sempre está presente no contexto de infecção por micobactérias. Porém, apesar da sua importância na mediação da inflamação, não é tão essencial quanto o TNF- α para a geração de mecanismos efetores antimicobacterianos (MARTINEZ; MEHRA; KAUSHAL, 2013). No presente estudo, a produção de IL-6 se encontra inalterada, nas culturas de células Raw 264.7 infectadas com a linhagem de *M. bovis* BCG, enquanto é observada diminuição significativa em sua produção nas culturas infectadas com a linhagem de *M. bovis* ATCC19274. Estes nossos dados estão de acordo com os achados de Dickie et al. (2010) que demonstraram que monócitos tratados com 100nM de vitamina D diminuem a produção da citocina IL-6, quando estimulados com LPS, por diminuição da expressão do TLR9 (DICKIE et al., 2010). Foi demonstrado por Platt e Fineran (2015), que a linhagem selvagem induz a produção de níveis elevados de IL-6 que compromete a biogênese do autofagossomo e formação do fagolisossomo, responsáveis pela autofagia e a fagocitose, respectivamente, que são importantes mecanismos bactericidas utilizados pelos macrófagos (PLATT; FINERAN, 2015). Dessa forma, a diminuição na produção de IL-6, provocada, pelo tratamento com a vitamina D, pode ser visto como estratégia favorável ao combate ao patógeno.

A IL-10, no contexto de infecção com o *Mycobacterium*, não é benéfica para o combate ao patógeno visto que pode bloquear a ativação de NF- κ B, comprometendo a produção de citocinas pró-inflamatórias (TAK; FIRESTEIN, 2001). Nossos resultados mostram que o tratamento com a vitamina D tende a diminuir a produção de IL-10 por macrófagos infectados por ambas as linhagens de *M. bovis* estudadas. Já foi visto em modelos experimentais que camundongos que apresentam aumento na expressão de IL-10 têm dificuldade no controle da infecção, desenvolvendo formas

mais severas e fatais da doença (COUPER; BLOUNT; RILEY, 2008). Além disso, a IL-10 está relacionada com a reativação da forma latente para a forma ativa de TB pulmonar em camundongos (TURNER et al., 2002). Tendo em vista estes efeitos da IL-10, a ação da vitamina D promovendo a diminuição na produção da IL-10 em macrófagos infectados pode ser benéfica ao controle da infecção causada por ambas as linhagens de *M. bovis*.

O próximo objetivo foi avaliar a capacidade fagocítica e bactericida do macrófago através da contagem de macrófagos infectados, assim como a carga bacilar. Nossos achados mostram que a taxa de fagocitose de bacilos da linhagem BCG é de 89% enquanto a fagocitose da linhagem ATCC19274 é menor, 71%, nos grupos não tratados, sugerindo que a linhagem ATCC19274 consegue inibir, parcialmente, sua fagocitose pelos macrófagos, e que o tratamento com a vitamina D não afetou este perfil. Estes dados corroboram com os achados de Mathieu et al. (2001) que não observaram, em camundongos selvagens e *knockout* para o receptor de vitamina D, diferença significativa na capacidade fagocítica (MATHIEU et al., 2001). Desta forma, podemos inferir que a linhagem ATCC19274 compromete os mecanismos fagocíticos dos macrófagos.

Ao analisar a carga bacilar, observamos que os grupos infectados e não tratados apresentam uma média de 72 macrófagos infectados com mais de 10 bacilos da linhagem BCG e uma média de 80 macrófagos infectados com mais de 10 bacilos da linhagem ATCC19274. Proporcionalmente à dose de vitamina D, observamos uma diminuição no número de bacilos no interior dos macrófagos infectados por ambas as linhagens, porém a diminuição no número de macrófagos infectados com >10 bacilos decresce de 72 para 49 nas células infectadas com a linhagem BCG, enquanto a diminuição no número de macrófagos infectados com > 10 bacilos decresce de 80 para 44 nas células infectadas com a linhagem ATCC19274. Portanto, o tratamento com vitamina D parece exercer maior efeito nos mecanismos microbicidas do macrófago frente ao ATCC19274 do que ao BCG, uma vez que foi observada uma diminuição mais acentuada no número de bacilos da linhagem ATCC19274 no interior dos macrófagos.

Esta suposição é suportada pela contagem das unidades formadoras de colônias (CFU). São observadas diminuições significativas na contagem do CFU para

o grupo infectado com a linhagem BCG assim como no grupo infectado com a linhagem ATCC19274, quando ambos são tratados com 10nM e 100nM de vitamina D, sugerindo que a vitamina D afeta algum mecanismo microbicida dos macrófagos que compromete a viabilidade das micobactérias.

A fim de elucidar qual mecanismo microbicida poderia ser ativado e responsável pela diminuição na carga bacilar das células infectadas após tratamento com a vitamina D, o próximo passo foi avaliar a produção de NO já que é sabido que além da produção de citocinas e consequente indução de uma resposta inflamatória contra o *Mycobacterium*, os fagócitos utilizam atividades enzimáticas para inativar e degradar microrganismos fagocitados (BRONTE; ZANOVELLO, 2005; CHAKRAVORTTY et al., 2002; FANG, 2004). O NO é uma molécula produzida por macrófagos ativados por citocinas, compostos microbianos ou ambos, e é derivado da ação enzimática da NOS sobre o aminoácido L-arginina, agindo como potente molécula tumoricida e microbicida (BOGDAN, 2001). Camundongos deficientes de iNOS possuem risco significativamente maior de disseminação da infecção e mortalidade por TB quando comparados com camundongos selvagens; e camundongos com infecção latente que recebem inibidor de NOS apresentam reativação da doença (CHAN; CHAN; SCHLUGER, 2001). Neste estudo, a análise da produção de NO por macrófagos infectados mostrou que quando infectados com a linhagem ATCC19274, os macrófagos produzem cinco vezes mais NO (52 $\mu\text{M}/\text{mL}$) do que macrófagos infectados com a linhagem BCG (11 $\mu\text{M}/\text{mL}$), sem tratamento com a vitamina D. Siswanto et al. (2015) discute que a habilidade de produção de NO por macrófagos está relacionada com os diferentes componentes bacterianos que irão estimular as células, como demonstrado por Lee et al. (2009), no qual as proteínas purificadas derivadas (PPD) do *Mycobacterium tuberculosis* induzem baixa produção de NO (LEE et al., 2009; SISWANTO et al., 2015). Por outro lado, Sharma et al. (2004) demonstrou que componentes como o CFP10, induz elevada produção de NO. Dessa forma, a maior produção de NO por macrófagos estimulados com a linhagem ATCC19274 pode estar relacionado à presença da região RD1, responsável pela produção de antígenos específicos com importante papel imunogênico (SHARMA et al., 2004).

Observamos que o tratamento com vitamina D promove significativo aumento na produção de NO de maneira dose dependente. Estes dados corroborando com Rockett et al. (1998) que mostraram que a vitamina D induz produção de NO em linhagem de macrófagos humanos infectados com o *Mycobacterium tuberculosis* (ROCKETT et al., 1998). Quando comparamos esta produção entre os grupos não tratados e tratados com 100nM de vitamina D, constatamos um aumento de sete vezes na produção de NO por macrófagos infectados com a linhagem ATTC (52µM para 365µM); e um aumento de duas vezes na produção de NO por macrófagos infectados com a linhagem BCG (11µM para 26µM). Este exacerbado aumento corresponde a uma diminuição de 48% na carga bacilar macrófagos infectados pela linhagem ATCC19274. Mattila e Thomas (2014) observaram que em infecções com linhagens selvagens de Mtb, além da ativação clássica da iNOS, também é observada a ativação da eNOS, mas que o NO produzido por esta enzima não apresentava significativa capacidade bactericida (MATTILA; THOMAS, 2014). E Mattila et al. (2013) discutem que a eNOS se localiza, preferencialmente, na membrana plasmática celular, e não na membrana do fagossomo. Dessa forma, o NO produzido é liberado para o meio, e não no interior do fagossomo, apresentando pouca ameaça às bactérias intracelulares (MATTILA et al., 2013). Podemos especular que a elevada produção de NO por macrófagos infectados pela linhagem ATCC19274 observada em nosso trabalho, pode estar relacionada à maior ativação da eNOS, e não é seguida por proporcional diminuição da carga bacilar já que o NO produzido por esta via é, preferencialmente, liberando para o ambiente extracelular.

Analisados em conjunto, os dados mostram que a produção exacerbada de NO pode ser um dos mecanismos pelos quais a 1,25(OH)₂D₃ potencializou os mecanismos bactericidas do macrófago contra as linhagens BCG e ATCC19274. No entanto, outros mecanismos devem ser estudados assim como a elucidação do motivo pelo qual a elevada produção de NO induzida por vitamina D, não foi suficiente para promover a morte da bactérias ATCC19274 fagocitadas pelos macrófagos.

6 Conclusão

Os resultados aqui apresentados demonstram que as concentrações utilizadas de vitamina D neste trabalho não são tóxicas para as células RAW 264.7, e que a vitamina D é um fator de grande importância para a resposta imunológica de macrófagos à infecção mediada por *M. Bovis* tanto para a linhagem atenuada (BCG) quanto para a linhagem selvagem (ATCC19274).

Foi observada uma tendência na diminuição das citocinas IL-6 e IL-10, que pode ser vista como estratégia favorável de combate ao patógeno pois já foi demonstrado que a produção excessiva destas citocinas é prejudicial ao controle da infecção.

A produção de NO varia entre as duas linhagens estudadas sendo maior no grupo infectado com a linhagem ATCC, e é estimulada de maneira dose dependente ao tratamento com vitamina D, o que parece ter relação direta com o aumento da capacidade bactericida dos macrófagos infectados e tratados. Isto se confirma uma vez que houve diminuição de 31% no número de macrófagos >10 bacilos infectados com a linhagem BCG e de 44% no grupo infectado com a linhagem ATCC; além de diminuição de 13% na contagem de CFU no grupo infectado com a linhagem BCG e 21% no grupo infectado com a linhagem ATCC. Estes resultados comprovaram a importância da vitamina D na infecção tanto com o *Mycobacterium bovis* ATCC quanto com o *Mycobacterium bovis* BCG.

Ainda se fazem necessários estudos complementares que visem elucidar os mecanismos moleculares pelos quais a vitamina D é capaz de aumentar a capacidade bactericida dos macrófagos; e por que a elevada produção de NO não é suficiente para promover a erradicação dos bacilos fagocitados pela linhagem ATCC19274.

7 Referências

- AARON, L. et al. Tuberculosis in HIV-infected patients: a comprehensive review. **Clinical microbiology and infection**, v. 10, n. 5, p. 388-398, 2004.
- ANDRUKHOVA, O. et al. Vitamin D is a regulator of endothelial nitric oxide synthase and arterial stiffness in mice. **Molecular Endocrinology**, v. 28, n. 1, p. 53-64, 2013.
- ANGALA, S. K. et al. The cell envelope glycoconjugates of Mycobacterium tuberculosis. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 49, n. 5, p. 361-399, 2014.
- BADWEY, J. A. et al. Comparative aspects of oxidative metabolism of neutrophils from human blood and guinea pig peritonea: magnitude of the respiratory burst, dependence upon stimulating agents, and localization of the oxidases. **Journal Cell Physiology**, v. 105, n. 3, p. 541-5, Dec 1980.
- BANAIEE, N. et al. Potent inhibition of macrophage responses to IFN-gamma by live virulent Mycobacterium tuberculosis is independent of mature mycobacterial lipoproteins but dependent on TLR2. **Journal of Immunology**, v. 176, n. 5, p. 3019-27, Mar 1 2006.
- BARRY, C. E. et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 845-855, 2009.
- BEHZADIFAR, M. et al. Patients' Experience of Tuberculosis Treatment Using Directly Observed Treatment, Short-Course (DOTS): A Qualitative Study. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 17, n. 4, 2015.
- BERRINGTON, W. R.; HAWN, T. R. Mycobacterium tuberculosis, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? **Immunological reviews**, v. 219, n. 1, p. 167-186, 2007.
- BIKLE, D. D. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. **Chemistry & biology**, v. 21, n. 3, p. 319-329, 2014.
- BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature immunology**, v. 2, n. 10, p. 907-916, 2001.
- BONILLA, D. L. et al. Autophagy regulates phagocytosis by modulating the expression of scavenger receptors. **Immunity**, v. 39, n. 3, p. 537-547, 2013.

BRIKEN, V. et al. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. **Molecular microbiology**, v. 53, n. 2, p. 391-403, 2004.

BRONTE, V.; ZANOVELLO, P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 8, p. 641-654, 2005.

BROSCH, R. et al. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. **Proceedings of the national academy of Sciences**, v. 99, n. 6, p. 3684-3689, 2002.

BRUCE, D. et al. Vitamin D and host resistance to infection? Putting the cart in front of the horse. **Experimental Biology and Medicine**, v. 235, n. 8, p. 921-927, 2010.

CARLBERG, C. et al. Controlling the chromatin organization of vitamin D target genes by multiple vitamin D receptor binding sites. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 103, n. 3, p. 338-343, 2007.

CHAKRAVORTTY, D.; HANSEN-WESTER, I.; HENSEL, M. Salmonella pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular Salmonella from reactive nitrogen intermediates. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 195, n. 9, p. 1155-66, May 6 2002.

CHAMPION, J. A.; MITRAGOTRI, S. Role of target geometry in phagocytosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 13, p. 4930-4934, 2006.

CHAN, E. D.; CHAN, J.; SCHLUGER, N. W. What is the role of nitric oxide in murine and human host defense against tuberculosis? Current knowledge. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 25, n. 5, p. 606-612, 2001.

CHUN, R. F.; ADAMS, J. S.; HEWISON, M. Immunomodulation by vitamin D: implications for TB. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 4, n. 5, p. 583-591, 2011.

CHUNG, M. et al. Vitamin D with or without calcium supplementation for prevention of cancer and fractures: an updated meta-analysis for the US Preventive Services Task Force. **Annals of internal medicine**, v. 155, n. 12, p. 827-838, 2011.

COLLINS, C.; GRANGE, J. Zoonotic implications of Mycobacterium bovis infections. Animal health: the control of infection: proceedings of a meeting held in the Royal Irish Academy on 22 April 1986/edited by JP Arbutnott, 1987. Dublin: Royal Irish Academy, 1987.

COOPER, A. M.; MAYER-BARBER, K. D.; SHER, A. Role of innate cytokines in mycobacterial infection. **Mucosal Immunol**, v. 4, n. 3, p. 252-60, May 2011.

COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RILEY, E. M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 9, p. 5771-5777, 2008.

COUSSENS, A. K.; MARTINEAU, A. R.; WILKINSON, R. J. Anti-inflammatory and antimicrobial actions of vitamin D in combating TB/HIV. **Scientifica**, v. 2014, 2014.

DAFFÉ, M. The cell envelope of tubercle bacilli. **Tuberculosis**, 2015.

DAFFE, M.; ETIENNE, G. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. **Tubercle and lung disease**, v. 79, n. 3, p. 153-169, 1999.

DERETIC, V.; LEVINE, B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. **Cell host & microbe**, v. 5, n. 6, p. 527-549, 2009.

DHEDA, K.; BARRY, C. E., 3RD; MAARTENS, G. Tuberculosis. **Lancet**, Sep 13 2015.

DICKIE, L. J. et al. Vitamin D3 down-regulates intracellular Toll-like receptor 9 expression and Toll-like receptor 9-induced IL-6 production in human monocytes. **Rheumatology**, v. 49, n. 8, p. 1466-1471, 2010.

ELLSON, C. D. et al. PtdIns (3) P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40phox. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 7, p. 679-682, 2001.

ETNA, M. P. et al. Impact of *Mycobacterium tuberculosis* RD1-locus on human primary dendritic cell immune functions. **Scientific reports**, v. 5, 2015.

FANG, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 10, p. 820-832, 2004.

FARIAS, A. S. **Efeito imunoregulador da vitamina D3 na encefalomielite experimental auto-imune**. 2009. 112 f. (Doutorado em Clínica Médica). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.

FENNELLY, K. P. et al. Variability of infectious aerosols produced during coughing by patients with pulmonary tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 186, n. 5, p. 450-7, Sep 1 2012.

FLANNAGAN, R. S.; COSÍO, G.; GRINSTEIN, S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 355-366, 2009.

HARRIES, A. D.; DYE, C. Tuberculosis. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 100, n. 5-6, p. 415-31, Jul-Sep 2006.

HETT, E. C.; RUBIN, E. J. **Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective**. Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective: American Society for Microbiology., 2008.

HEWISON, M. Vitamin D and immune function: an overview. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 01, p. 50-61, 2012.

HMAMA, Z. et al. $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D₃-induced myeloid cell differentiation is regulated by a vitamin D receptor-phosphatidylinositol 3-kinase signaling complex. **The Journal of experimental medicine**, v. 190, n. 11, p. 1583-1594, 1999.

HOLICK, M. F. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. **The American journal of clinical nutrition**, v. 80, n. 6, p. 1678S-1688S, 2004.

_____. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. Mayo Clinic Proceedings, 2006. Elsevier. p.353-373.

KANG, D. D. et al. Profiling early lung immune responses in the mouse model of tuberculosis. **PLoS One**, v. 6, n. 1, p. e16161, 2011.

KAUFMANN, S. H. Immunity to intracellular bacteria. **Annual review of immunology**, v. 11, n. 1, p. 129-163, 1993.

KINCHEN, J. M.; RAVICHANDRAN, K. S. Phagosome maturation: going through the acid test. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 9, n. 10, p. 781-795, 2008.

KIVIHYA-NDUGGA, L. et al. Comparison of PCR with the routine procedure for diagnosis of tuberculosis in a population with high prevalences of tuberculosis and human immunodeficiency virus. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1012-1015, 2004.

KLEBANOFF, S. **Oxygen metabolites from phagocytes**. Gallin JI Snyderman R eds. **Inflammation: basic principles and clinical correlates 1999: 721-768** Lippincott: Williams & Wilkins Philadelphia.

KLEINNIJENHUIS, J. et al. Innate immune recognition of Mycobacterium tuberculosis. **Clinical and Developmental Immunology** v. 2011, p. 405310, 2011.

KOZIELEWICZ, P. et al. Novel vitamin D analogues; cytotoxic and anti-proliferative activity against a diffuse large B-cell lymphoma cell line and B-cells from healthy donors. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, 2015.

LAMBETH, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 3, p. 181-9, Mar 2004.

LEE, J.-S. et al. Nitric oxide synthesis is modulated by 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ and interferon- γ in human macrophages after mycobacterial infection. **Immune network**, v. 9, n. 5, p. 192-202, 2009.

LIN, P. L. et al. Tumor necrosis factor and tuberculosis. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 2007. Nature Publishing Group. p.22-25.

LIU, P. T. et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. **Science**, v. 311, n. 5768, p. 1770-1773, 2006.

LIU, P. T. et al. Cutting edge: vitamin D-mediated human antimicrobial activity against Mycobacterium tuberculosis is dependent on the induction of cathelicidin. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 4, p. 2060-2063, 2007.

MALIK, Z. A. et al. Cutting edge: Mycobacterium tuberculosis blocks Ca²⁺ signaling and phagosome maturation in human macrophages via specific inhibition of sphingosine kinase. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 6, p. 2811-2815, 2003.

MARTINEAU, A. R. et al. A single dose of vitamin D enhances immunity to mycobacteria. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 176, n. 2, p. 208-213, 2007.

MARTINEZ, A. N.; MEHRA, S.; KAUSHAL, D. Role of Interleukin-6 (IL6) in innate immunity to Mycobacterium tuberculosis infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 207, p. 1253-1261, 2013.

MATHIEU, C. et al. In vitro and in vivo analysis of the immune system of vitamin D receptor knockout mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 11, p. 2057-2065, 2001.

MATTILA, J. T. et al. Microenvironments in tuberculous granulomas are delineated by distinct populations of macrophage subsets and expression of nitric oxide synthase and arginase isoforms. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 2, p. 773-784, 2013.

MATTILA, J. T.; THOMAS, A. C. Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns. **Frontiers in immunology**, v. 5, 2014.

MATTOS, A. M. M. et al. Detection of IgG1 antibodies against Mycobacterium tuberculosis DosR and Rpf antigens in tuberculosis patients before and after chemotherapy. **Tuberculosis**, v. 96, p. 65-70, 2016.

MCBRIDE, H. M. et al. Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. **Cell**, v. 98, n. 3, p. 377-86, Aug 6 1999.

MINNIKIN, D. E. et al. The methyl-branched fortifications of Mycobacterium tuberculosis. **Chemistry & biology**, v. 9, n. 5, p. 545-553, 2002.

MIRANDA, M. S. et al. The tuberculous granuloma: an unsuccessful host defence mechanism providing a safety shelter for the bacteria? **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.

MISHRA, A. K. et al. Lipoarabinomannan and related glycoconjugates: structure, biogenesis and role in Mycobacterium tuberculosis physiology and host–pathogen interaction. **FEMS microbiology reviews**, v. 35, n. 6, p. 1126-1157, 2011.

MORA, J. R.; IWATA, M.; VON ANDRIAN, U. H. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 9, p. 685-698, 2008.

MORRIS, A.; SELVARAJ, R. K. In vitro 25-hydroxycholecalciferol treatment of lipopolysaccharide-stimulated chicken macrophages increases nitric oxide production and mRNA of interleukin-1beta and 10. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 161, n. 3, p. 265-270, 2014.

NARVAEZ, C. J.; ZINSER, G.; WELSH, J. Functions of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ in mammary gland: from normal development to breast cancer. **Steroids**, v. 66, n. 3, p. 301-308, 2001.

O'GARRA, A. et al. The immune response in tuberculosis. **Annual review of immunology**, v. 31, p. 475-527, 2013.

OHTA, M. et al. 1 α , 25-Dihydroxy vitamin D₃ (calcitriol) stimulates proliferation of human circulating monocytes in vitro. **FEBS letters**, v. 185, n. 1, p. 9-13, 1985.

OJAIMI, S. et al. Vitamin d deficiency impacts on expression of toll-like receptor-2 and cytokine profile: a pilot study. **Journal of Translational Medicine**, v. 11, n. 1, p. 176, 2013.

ORME, I. M. Tuberculosis Vaccine Types and Timings. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 22, n. 3, p. 249-257, 2015.

ORME, I. M.; ROBINSON, R. T.; COOPER, A. M. The balance between protective and pathogenic immune responses in the TB-infected lung. **Nature Immunology**, v. 16, n. 1, p. 57-63, Jan 2015.

PALMA-NICOLAS, J. P.; BOCANEGRA-GARCIA, V. [Innovative strategies to diagnose and monitor tuberculosis patients]. **Archivos de Bronconeumología**, v. 43, n. 4, p. 225-32, Apr 2007.

PAREEK, M. et al. Vitamin D deficiency and TB disease phenotype. **Thorax**, v. 70, n. 12, p. 1171-1180, 2015.

PLATT, N.; FINERAN, P. **Measuring the phagocytic activity of cells**. 2015. ISBN 0091-679X.

PLUM, L. A.; DELUCA, H. F. Vitamin D, disease and therapeutic opportunities. **Nature reviews Drug discovery**, v. 9, n. 12, p. 941-955, 2010.

PYM, A. S. et al. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines Mycobacterium bovis BCG and Mycobacterium microti. **Molecular Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 709-17, Nov 2002.

ROCKETT, K. A. et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 induces nitric oxide synthase and suppresses growth of Mycobacterium tuberculosis in a human macrophage-like cell line. **Infection and immunity**, v. 66, n. 11, p. 5314-5321, 1998.

RODRIGUES, M. F. et al. Tumour necrosis factor receptors and apoptosis of alveolar macrophages during early infection with attenuated and virulent Mycobacterium bovis. **Immunology**, v. 139, n. 4, p. 503-512, 2013.

RONCHI, F. C.; SONAGLI, M.; RONCHI, M. D. G. C. Prevalência de Hipovitaminose D em população de consultório médico. **Revista do Médico Residente**, v. 14, n. 3, 2012.

ROOK, G. A. et al. Vitamin D3, gamma interferon, and control of proliferation of Mycobacterium tuberculosis by human monocytes. **Immunology**, v. 57, n. 1, p. 159, 1986.

RUSSELL, D. G. et al. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. **Nature immunology**, v. 10, n. 9, p. 943-948, 2009.

RUSSELL, D. G.; MWANDUMBA, H. C.; RHOADES, E. E. Mycobacterium and the coat of many lipids. **The Journal of Cell Biology**, v. 158, n. 3, p. 421-6, Aug 5 2002.

SAKAI, K. et al. Phosphoinositide 3-Kinase in Nitric Oxide Synthesis in Macrophage CRITICAL DIMERIZATION OF INDUCIBLE NITRIC-OXIDE SYNTHASE. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 26, p. 17736-17742, 2006.

SALAHUDDIN, N. et al. Vitamin D accelerates clinical recovery from tuberculosis: results of the SUCCINCT Study [Supplementary Cholecalciferol in recovery from tuberculosis]. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of vitamin D supplementation in patients with pulmonary tuberculosis'. **BMC infectious diseases**, v. 13, n. 1, p. 22, 2013.

SAÚDE, M. D., <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/742-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/tuberculose/l1-tuberculose/11937-tuberculose>, 2014. Acesso em: 22/012015.

SAÚDE/FUNASA, M. D. **manual de controle da tuberculose**. 5. Brasil: 2002.

SCHUCH, N. J.; GARCIA, V. C.; MARTINI, L. A. Vitamin D and endocrine diseases. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 625-633, 2009.

SELVARAJ, P.; HARISHANKAR, M.; AFSAL, K. Vitamin D: Immuno-modulation and tuberculosis treatment 1. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 93, n. 5, p. 377-384, 2015.

SENGELOV, H.; NIELSEN, M. H.; BORREGAARD, N. Separation of human neutrophil plasma membrane from intracellular vesicles containing alkaline phosphatase and NADPH oxidase activity by free flow electrophoresis. **Journal of Cellular Biochemistry** v. 267, n. 21, p. 14912-7, Jul 25 1992.

SHARMA, S. et al. Mycobacterium tuberculosis induces high production of nitric oxide in coordination with production of tumour necrosis factor- α in patients with fresh active tuberculosis but not in MDR tuberculosis. **Immunology and cell biology**, v. 82, n. 4, p. 377-382, 2004.

SIMONSEN, A. et al. EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. **Nature**, v. 394, n. 6692, p. 494-8, Jul 30 1998.

SISWANTO, S. et al. Vitamin D Receptor mRNA Expression and the Production of Nitric Oxide and Cathelicidin in Human Monocytes. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, v. 22, n. 3, p. 18-24, 2015.

SMOLDERS, J. et al. Association of vitamin D metabolite levels with relapse rate and disability in multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis**, v. 14, p. 120-124, 2008.

SPIRA, A. et al. Apoptosis genes in human alveolar macrophages infected with virulent or attenuated Mycobacterium tuberculosis: a pivotal role for tumor necrosis factor. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 29, n. 5, p. 545-551, 2003.

STURGILL-KOSZYCKI, S. et al. Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. **Science**, v. 263, n. 5147, p. 678-81, Feb 4 1994.

TAK, P. P.; FIRESTEIN, G. S. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 1, p. 7-11, 2001.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. *Seminars in immunology*, 2004. Elsevier. p.3-9.

THI, E. P.; REINER, N. E. Phosphatidylinositol 3-kinases and their roles in phagosome maturation. **Journal of leukocyte biology**, v. 92, n. 3, p. 553-566, 2012.

TJELLE, T. E.; LØVDAL, T.; BERG, T. Phagosome dynamics and function. **Bioessays**, v. 22, n. 3, p. 255-263, 2000.

TRINCHIERI, G.; SHER, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 3, p. 179-190, 2007.

TURNER, J. et al. In vivo IL-10 production reactivates chronic pulmonary tuberculosis in C57BL/6 mice. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 11, p. 6343-6351, 2002.

VELDMAN, C. M.; CANTORNA, M. T.; DELUCA, H. F. Expression of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in the immune system. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 374, n. 2, p. 334-338, 2000.

VERGNE, I. et al. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable Mycobacterium tuberculosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 102, n. 11, p. 4033-8, Mar 15 2005.

VIEIRA, O. V.; BOTELHO, R. J.; GRINSTEIN, S. Phagosome maturation: aging gracefully. **Biochemical Journal**, v. 366, n. Pt 3, p. 689-704, Sep 15 2002.

VIEIRA, O. V. et al. Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. **The Journal of cell biology**, v. 155, n. 1, p. 19-26, 2001.

WARDS, B.; DE LISLE, G.; COLLINS, D. An *esat6* knockout mutant of *Mycobacterium bovis* produced by homologous recombination will contribute to the development of a live tuberculosis vaccine. **Tubercle and Lung Disease**, v. 80, n. 4, p. 185-189, 2000.

WATKINS, R. R.; LEMONOVICH, T. L.; SALATA, R. A. An update on the association of vitamin D deficiency with common infectious diseases 1. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 93, n. 5, p. 363-368, 2015.

WHO. **Global Tuberculosis Report 2015**. World Health Organization, p.204. 2015

XU, Y.; EISSA, N. T. Autophagy in innate and adaptive immunity. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 7, n. 1, p. 22-28, 2010.