

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

Carla Marisa Cerqueira da Silva

**Caracterização de estirpes *Mycobacterium*
tuberculosis da família Lisboa**

-

Análise de Regiões de Diferença e *Single Nucleotide Polymorphisms*

*Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre
em Genética Molecular e Biomedicina, pela Universidade
Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia*

Orientadora:

Prof^ª. Doutora Isabel Portugal (FF/UL)

LISBOA

2009

nº de arquivo

“Copyright”

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

Carla Marisa Cerqueira da Silva

**Caracterização de estirpes *Mycobacterium*
tuberculosis da família Lisboa**

-

Análise de Regiões de Diferença e *Single Nucleotide Polymorphisms*

*Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre
em Genética Molecular e Biomedicina, pela Universidade
Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia*

Orientadora:

Prof^ª. Doutora Isabel Portugal (FF/UL)

LISBOA

2009

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à Prof. Isabel Portugal, por toda a orientação e rigor científico exigido, dedicação, incentivo e amizade que demonstrou ao longo do projecto.

Um agradecimento muito especial ao João Perdigão, pela amizade, disponibilidade e apoio prestado em todas as etapas deste projecto.

Aos meus colegas de laboratório, Inês Bártolo, Cheila Rocha, Pedro Borrego e Claudia Pinto, pela amizade, companheirismo e o óptimo ambiente que me proporcionaram.

Aos meus pais, irmão e amigos, pelo incentivo e apoio incondicional.

E por fim, mas não menos importante, ao Carlos, pela compreensão e motivação em todos os momentos.

A todos, um muito obrigado.

Sumário

Portugal é um dos países europeus com maior incidência de tuberculose (TB), encontrando-se entre os cinco países com taxa de notificação superior a 20/100 000 habitantes, apresentando também a mais elevada percentagem (14,6%) de indivíduos seropositivos para o vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV) entre casos de TB. Uma das maiores ameaças ao tratamento e controlo de TB é o surgimento de casos de infecção com características de multirresistência (TB-MR) e resistência extensiva (XDR-TB) aos antibacilares. A maioria das estirpes de TB-MR que circulam na região de saúde de Lisboa pertence a uma família particular de estirpes geneticamente relacionadas, a família Lisboa, detectada nos anos 90. A prevalência desta família de estirpes tem vindo a aumentar ao longo dos anos, mostrando os estudos mais recentes que mais de 85% dos casos de TB-MR são família Lisboa. Estirpes de TB-MR derivaram recentemente para estirpes XDR-TB, representando cerca de 50% das estirpes TB-MR, e sendo todas da família Lisboa.

A família Lisboa constitui uma ameaça ao controlo da TB no país e a sua prevalência nos últimos anos sugere que estas estirpes poderão ter vantagens selectivas relativamente a outras. Com o objectivo de definir a origem evolutiva, bem como a identificação de factores que favoreçam a permanência e disseminação das estirpes Lisboa em Portugal, procedeu-se ao estudo de deleções genómicas e polimorfismos de um único nucleótido em dois isolados da família Lisboa, e um isolado não-Lisboa. Os isolados foram analisados quanto à presença ou ausência de 14 regiões de diferença (RD) e a região *pks15/1* e, para uma análise mais detalhada do percurso evolutivo das estirpes portuguesas, foi estudada a filogenia baseada em polimorfismos de um único nucleótido (SNP).

A filogenia baseada em SNPs não-sinónimos, que ocorrem nos codões *katG*⁴⁶³ e *gyrA*⁹⁵, permitiu a classificação das referidas estirpes no grupo genético principal 2 (PGG2) e, a análise conjunta de nove SNPs sinónimos permitiu a observação de um padrão correspondente ao SCG-5.

O estudo dos *loci* RD revelou a ausência de quatro regiões nas estirpes Lisboa e não-Lisboa, designadamente TbD1, as regiões *pks15/1*, RD174 e a recém caracterizada RD^{rio}. Os dados obtidos neste estudo são coerentes com as classificações filogenéticas propostas para a evolução dos membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC), apresentadas por vários

investigadores. Entre os genes ausentes destacam-se os que codificam proteínas extracelulares (PPE55 e PPE56) que são expressas nas fases mais recentes da infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), podendo dificultar a resposta imunológica do hospedeiro, e genes que codificam proteínas que participam na regulação do estado de dormência, sugerindo alguns autores uma maior propensão para o desenvolvimento de TB activa. A ausência destas regiões em estirpes da família Lisboa pode assumir alguma influência na sua patogenicidade e virulência.

Palavras-chave: Tuberculose, família Lisboa, deleções genómicas

Abstract

Portugal is one of the european countries with the highest incidence of tuberculosis (TB), been located on the five countries with the higher reporting rate to 20/100 000 inhabitants. Portugal also has the highest percentage of individual seropositive for Human Immunodeficiency virus (HIV) among TB cases (14,6%). One of the biggest threats to control TB is the emergence of case infection with features of multidrug resistance (MDR-TB) and extensive drug-resistance (XDR-TB) TB. Most strains of MDR-TB circulating in the Lisbon area belong to a particular family of genetically related strains, the Lisboa family, detected in the 90's. The prevalence of these family of strains has been increasing over the years. The most recent studies show that more than 85% of the MDR-TB cases belong to Lisboa family. XDR-TB has been recently derived from MDR-TB strains and account for about 50% of these, all belonging to Lisboa family.

Lisboa family is a threat to TB control in Portugal and its prevalence in recent years suggest that these strains may have selective advantages over others. In order to define the evolutionary origin and the identification of factors that favors the continued existence and spread of Lisboa strains in the Portuguese setting, genomic deletions and single nucleotide polymorphisms in two isolates of the Lisboa family, and one non-Lisboa isolate were studied. The isolates were analyzed for the presence or absence of 14 regions of difference (RDs), including the *pks15/1* region. For a more detailed analysis of the evolutionary path of the portuguese strains we studied the phylogeny based on single nucleotide polymorphisms (SNPs).

The phylogeny based on non-synonymous SNPs, wich occur at codons *katG*⁴⁶³ and *gyrA*⁹⁵, allowed the classification of these strains in the principal genetic group 2 (PGG2), and the joint analysis of nine synonymous SNPs allowed the observation of a pattern corresponding to the SCG-5.

On the other hand, the study of the RD loci revealed the absence of four regions in the three strains analyzed, in particular TbD1, regions *pks15/1*, RD174 and the recently characterized RD^{rio}. The data obtained from this study is consistent with the phylogenetic classification proposed for the evolution of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) members, presented by several authors. Between the absent genes we highlighted those that encode extracellular proteins (PPE55 and PPE56), that are expressed on the earliest phases of

Mycobacterium tuberculosis (*M. tuberculosis*) infection, and could hamper the immune response of host, and genes that encode proteins involved in regulation of the dormancy state, which some authors suggesting a greater propensity to develop active TB. The absence of these regions in Lisboa strains may exert some influence on its pathogenicity and virulence.

Keywords: Tuberculosis, Lisboa family, genomic deletions.

Lista de Abreviaturas

BCG – Bacilo Calmette-Guérin
CFU – Unidades formadoras de colónias
CTAB/NaCl – Brometo de amónio hexadeciltrimetil
DC – Células dendríticas
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EMB – Etambutol
G+C – Guanina-Citosina
HIV – Vírus da Imunodeficiência Adquirida
IFN- γ – Interferão gama
IL – Interleucina
INH – Isoniazida
LAM – Lipoarabinomanano
LSP – Polimorfismos de Longa Sequência
M. – *Mycobacterium*
MHC – Sistema Major de Histocompatibilidade
MIRU – *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*
mM – micro Molar
MNT – Micobactérias Não Tuberculosas
MTC – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*
NO – Óxido nítrico
iNO – Óxido nítrico sintase
pb – Pares de base
PCR – Reacção em cadeia da polimerase
PDIM – *phenolphthiocerol-dimycocerosate*
PGG – Grupo Genético Principal
PGL – Glicolípidos Fenólicos
RD – Regiões de Diferença
RFLP – Polimorfismos dos fragmentos de restrição do DNA genómico
RIF – Rifampicina
RND – Resistência, Nodulação e Divisão celular
SCG – *SNP cluster group*

SNP – Polimorfismos de um único nucleótido
igSNP – SNP intergênico
nsSNP – SNP não-sinónimos
sSNP – SNP sinónimos
STP – Estreptomicina
TAE – tampão Tris-Acetato-EDTA
TB – Tuberculose
TBE – Tampão Tris-Borato-EDTA
TB-MR – Tuberculose multirresistente
TD – Toxicodependência
TE – Tampão Tris-HCl-EDTA
TLR – Receptores *toll-like*
TNF- α – Factor de Necrose Tumoral alfa
VNTR – Repetições em número variável
XDR-TB – Tuberculose com extensiva resistência
µg – Micrograma
µL – Microlitro
µm – Micrómetro

Índice Geral

Agradecimentos.....	i
Sumário	iii
Abstract	v
Lista de Abreviaturas	vii
1. Introdução.....	1
1.1. Género <i>Mycobacterium</i>	1
1.1.1. Taxonomia.....	1
1.1.2. Características gerais.....	2
1.2. Infecção, patogénese e transmissão do bacilo da Tuberculose.....	5
1.3. Diagnóstico laboratorial de <i>M. tuberculosis</i>	10
1.4. Tuberculose em Portugal.....	11
1.4.1. Epidemiologia Molecular	13
1.5. Diversidade genética e biológica de <i>M. tuberculosis</i>	15
1.6. Objectivos.....	23
2. Material e Métodos.....	24
2.1. Amostra	24
2.2. Cultura e isolamento de DNA micobacteriano.....	24
2.3. Amplificação de Regiões de Diferença	25
2.4. Amplificação de <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>	27
2.5. Sequenciação e análise bioinformática.....	27
3. Resultados	32
3.1. Caracterização da amostra por MIRU-VNTR.....	32
3.2. Determinação do Grupo genético principal (PGG) e <i>SNP cluster group</i> (SCG)	32

3.3. Análise de Regiões de Diferença.....	36
4. Discussão.....	40
5. Referências Bibliográficas.....	50
 Anexos.....	 I
Anexo I – Alinhamento do produto de amplificação da região RD174	II
Anexo II – Alinhamento do produto de amplificação da região RD ^{rio}	V

1. Introdução

O *M. tuberculosis* é o microorganismo que mais indivíduos afecta em todo o mundo, atingindo cerca de 3 milhões de pessoas todos os anos. A associação do género *Mycobacterium* ao hospedeiro humano remonta aos tempos pré-históricos, tendo sido identificado *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) em múmias do período Neolítico, encontradas na Sibéria, e *M. tuberculosis* em múmias Egípcias e Sul Americanas, todos com sintomas de uma forma rara de tuberculose que afecta a coluna vertebral, conhecida como doença de Potts (Salo *et al*, 1994; Zink *et al*, 2003; Taylor *et al*, 2007). Descoberto em 1882 por Robert Koch, o *M. tuberculosis* é o principal agente etiológico da TB, apesar de outras espécies constituintes do MTC, tal como *M. cannetti*, *M. africanum* ou *M. bovis*, sejam também causa desta infecção em humanos. Actualmente, o MTC é composto por sete espécies e subespécies que inclui *M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, e *M. caprae* (Ernst *et al*, 2007). Os membros do MTC caracterizam-se por 99% de identidade nucleotídica, diferindo entre si quanto ao tropismo pelo hospedeiro, fenótipo, patogenicidade e epidemiologia (Brosch *et al*, 2002; Mostowy *et al*, 2002).

1.1. Género *Mycobacterium*

1.1.1. Taxonomia

O género *Mycobacterium* pertence à classe *Actinobacteria*, ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae* (Figura 1). A classe *Actinobacteria* inclui os organismos Gram positivos (apesar de não ser possível corar micobactérias pela técnica de Gram), com elevado conteúdo Guanina-Citosina (G+C) que apresentam crescimento filamentosos, formando um micélio, ou possuem uma tendência para tal. No geral, as micobactérias são saprófitas livres, estando bem adaptadas a diferentes habitats, como solo e ambientes aquáticos (Ventura *et al*, 2007). O género *Mycobacterium* é muito diversificado e compreende mais de 100 espécies diferentes, sendo algumas estas espécies agentes causadores de uma vasta gama de doenças em humanos (Murray *et al*, 2005).

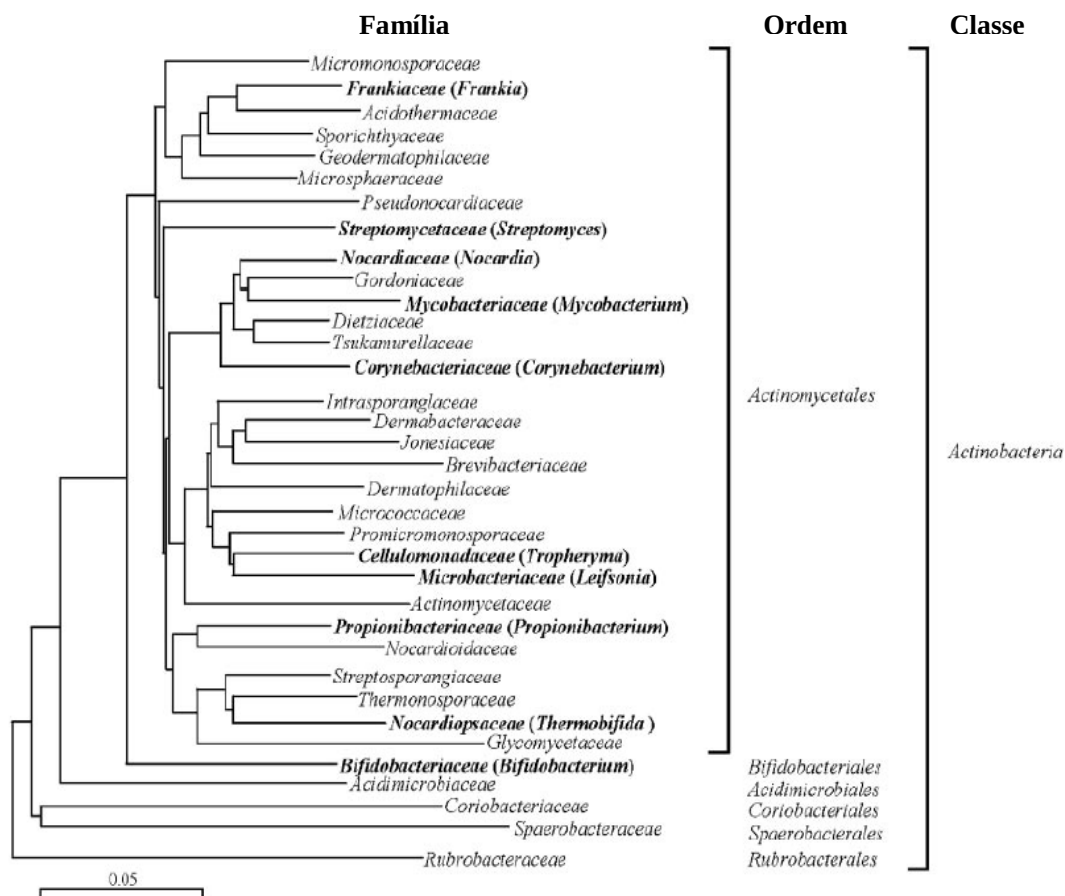


Figura 1. Árvore filogenética de Actinobacteria, baseada em 1.500 nucleótidos da sequência 16S rRNA. A negrito estão representadas as famílias com membros submetidos a sequenciação do genoma completo no momento da redacção do artigo (Ventura *et al*, 2007).

1.1.2. Características gerais

As bactérias pertencentes ao género *Mycobacterium* são classificadas de acordo com as suas características morfológicas, composição do envelope celular e elevado conteúdo em G+C (entre 60% a 70%) (Murray *et al*, 2005). O *M. tuberculosis*, um microorganismo aeróbio obrigatório, são bacilos com 0,2-0,6 x 1,0-10 µm de dimensão, rectos ou ligeiramente curvos, por vezes ramificados. São imóveis e não formadores de esporos, podendo formar filamentos facilmente

fragmentados em bacilos e cocos (Prescott *et al*, 2005). A ultraestrutura das micobactérias apresenta um envelope celular (Figura 2) muito impermeável, contendo uma elevada variedade de lípidos, como ácidos micólicos que conferem resistência álcool-ácida, sendo por isso possível de distinguir da maioria das bactérias através da coloração de Ziehl-Neelsen (Figura2); glicolípidos (lipoarabinomananos - LAM), polipéptidos (phenolphthiocerol) e polissacáridos (arabinogalactanos e arabinomanos) (Cole, 2002).

Existem outras bactérias que possuem ácidos micólicos, e são ácido-resistentes, tal como os géneros *Nocardia* e *Corynebacterium* que, juntamente com o género *Mycobacterium*, formam um grupo monofilético dentro da classe *Actinobacteria* (Figura 1) (Ventura *et al*, 2007).

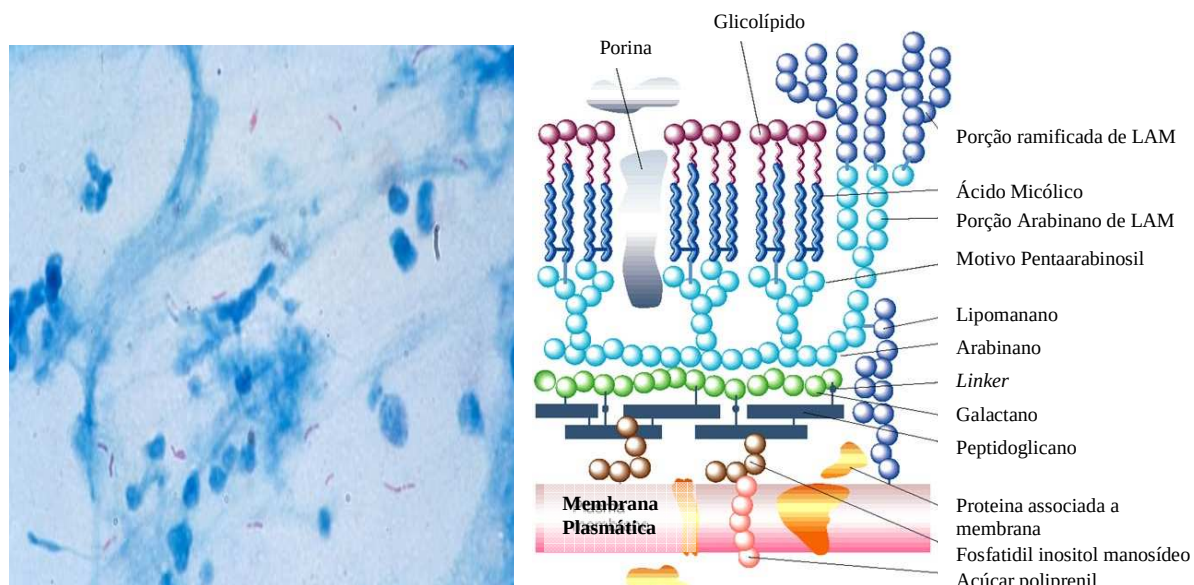


Figura 2. Bacilos álcool-ácido resistentes, corados de vermelho pela técnica de Ziehl-Neelsen à esquerda (<http://lib.jiangnan.edu.cn/ASM/039-2.jpg>) e, à direita, esquema representativo do envelope celular de *M. tuberculosis* (Adaptado de Park *et al*, 2000).

O género *Mycobacterium* é constituído pelo MTC, *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) agente etiológico de Lepra, e micobactérias designadas não-tuberculosas (MNT). As últimas são micobactérias ambientais, podendo ser encontrados como saprófitas, comensais e simbioses, distinguindo-se do MTC pelo facto de não serem patogénios obrigatórios, causando no ser humano infecções oportunistas (Primm *et al*, 2004). As MNT podem ser classificadas de acordo com a velocidade de crescimento e pigmentação, e também quanto ao seu potencial patogénico (David *et al*, 1994).

O crescimento micobacteriano é muito lento, variando o tempo de incubação entre dois a quarenta dias após inoculação em meio sólido até formar colônias visíveis (Prescott *et al*, 2005). São consideradas de crescimento rápido as micobactérias formadoras de colônias visíveis num período de cerca de sete dias, sendo de crescimento lento as micobactérias que necessitem de mais de sete dias de incubação. Relativamente à produção de pigmento, segundo Runyon as micobactérias dividem-se em quatro grupos:

- ✓ Grupo I – micobactérias fotocromogénicas, possuem crescimento lento e produzem pigmento amarelo quando expostas à luz, em aproximadamente 7 dias. São exemplo *M. ulcerans*, *M. marinum* e *M. kansasii*;
- ✓ Grupo II – micobactérias escotocromogénicas, possuem crescimento lento e produzem pigmento amarelo-alaranjado, quer na presença ou ausência de luz. Exemplos *M. scrofulaceum* e *M. xenopi*;
- ✓ Grupo III – micobactérias não cromogénicas e não fotocromogénicas possuem crescimento lento, produzem pouco ou nenhum pigmento. São exemplo o complexo *M. avium-intracellulare*;
- ✓ Grupo IV – micobactérias de pigmentação variável. Crescimento rápido em menos de 1 semana a 25°C ou a 37°C. São exemplo *M. fortuitum*, *M. phlei* e *M. smegmatis*.

As micobactérias podem ser classificadas em três grupos, de acordo com o potencial patogénico da espécie (David *et al*, 1994; Murray *et al*, 2005):

- ✓ Estritamente patogénicas – *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. bovis*, *M. africanum*;
- ✓ Potencialmente patogénicas – *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. xenopi*, *M. scrofulaceum*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. haemophilum*, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. chelonae*, *M. marinum*;
- ✓ Raramente patogénicas – *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. butyricum*, *M. gordonae*, *M. thermoresistibile*, *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. triviale*, *M. gastri*, *M. terrae*, *M. flavescens*, entre outras.

Uma das características dos membros do MTC reside no crescimento lento, necessitando cerca de três a quatro semanas para formação de colônias em meio de cultura (Cole, 2002). A morfologia das colônias difere entre os membros do complexo, apresentando as colônias de *M. tuberculosis* uma morfologia rugosa e não cromogénicas (Figura 3). Em meio líquido, as micobactérias podem crescer formando um pseudo-micélio, devido ao factor corda, sendo esta característica influenciada pela composição e condições de cultura (Badak *et al*, 1999).



Figura 3. Colônias de *M. tuberculosis* (http://www.fiocruz.br/ccs/media/ipecc_tb2.jpg)

1.2. Infecção, patogénese e transmissão do bacilo da Tuberculose

A tuberculose é transmitida por aerossóis de partículas contendo bacilos de *M. tuberculosis*, libertadas pelos pulmões de indivíduos com TB activa. Uma vez inaladas estas partículas, com 1 a 5 μm de diâmetro, as micobactérias são reconhecidas e fagocitadas por macrófagos alveolares, onde proliferam rapidamente, desenvolvendo uma vigorosa resposta imunológica celular por parte do hospedeiro, na qual participam linfócitos T CD4^+ e, mais tarde, linfócitos T CD8^+ (Robbins *et al*, 2001; Kaufmann e McMichael, 2005). Os macrófagos alveolares são o primeiro tipo celular envolvido na fagocitose de micobactérias, participando em seguida células dendríticas (DC) e macrófagos derivados de monócitos (Henderson *et al*, 1997).

A endocitose de micobactérias envolve diferentes receptores presentes nas células fagocíticas, que estabelecem ligação com bacilos não-opsinizados, tal como os receptores de manose e receptores do complemento (Schlesinger, 1993), ou reconhecem antígenos na superfície de micobactérias. Participam ainda receptores *toll-like* (TLR), mediadores de imunidade inata,

essenciais para o reconhecimento micobacteriano em macrófagos e DC (Visitin *et al*, 2001), sendo também importantes no desenvolvimento de uma resposta imunitária eficaz contra micobactérias, participando na activação de factores transcricionais e sinalização para a produção de citocinas (Means *et al*, 1999). As células fagocíticas assumem um importante papel na iniciação e direcção da imunidade mediada por linfócitos T, através da apresentação de antígenos micobacterianos e expressão de sinais co-estimuladores e citocinas (Van Crevel *et al*, 2002). A apresentação de antígenos micobacterianos pelos macrófagos e DC envolve, inicialmente, moléculas da classe II do sistema Major de Histocompatibilidade (MHC), que apresentam proteínas micobacterianas a linfócitos T CD4⁺; e moléculas de classe I do MHC, expressas em todas as células nucleadas, apresentando proteínas micobacterianas a linfócitos T CD8⁺. Este mecanismo permite a apresentação de antígenos citolíticos, importante para antígenos que de alguma forma escapam ao fagossoma (Mazzaccaro *et al*, 1996).

Após a fagocitose de micobactérias, macrófagos e DC iniciam a produção de IL-12, através dos receptores TLR, que direcciona o desenvolvimento da resposta de linfócitos T CD4⁺ com produção de IFN- γ . A principal função de IFN- γ consiste em activar macrófagos infectados, induzindo estes à produção de espécies reactivas de oxigénio e nitrogénio, necessários para a eliminação do bacilo (Flynn e Chan, 2001). A produção de IFN- γ é também realizada por linfócitos T CD8⁺, estimulando a libertação de TNF- α pelo macrófago, uma citocina importante na formação do granuloma (Mohan *et al*, 2001), que caracteriza a protecção imunitária do hospedeiro.

O granuloma (Figura 4) consiste numa massa celular, composta por macrófagos activos, células epitelióides gigantes e multinucleadas, rodeadas por linfócitos e, num estadio posterior, estará envolto em tecido fibrótico (Kaufmann e McMichael, 2005; Birkness *et al*, 2007). A sua principal função consiste no confinamento micobacteriano no interior dos macrófagos, através da indução da expressão de óxido nítrico sintase (iNOS) de modo a prevenir a disseminação, e a concentração da resposta imunológica directamente no local da infecção (Chan *et al*, 1992; MacMicking *et al*, 1997; Flynn e Chan, 2001; Saunders e Britton, 2007).

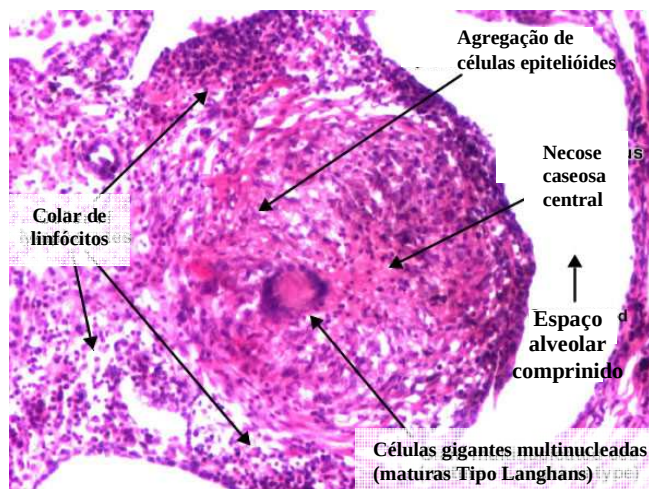


Figura 4. Corte histológico de um granuloma tuberculoso, corado com Hematoxilina e Eosina. (Adaptado de http://www.pathologyatlas.ro/pathology_atlas_imagini/pulmonary_tuberculosis_chronic_inflammation_03.jpg)

Nesta fase é também induzido um estado de dormência, devido à privação de nutrientes e oxigénio exercida pelo granuloma, sendo mantida a viabilidade micobacteriana mas num estado não replicativo (Betts *et al*, 2002; Voskuil *et al*, 2003). A resposta deste tecido representa assim a fase de contenção da infecção, durante a qual não se verificam sinais da doença e o hospedeiro não transmite a infecção (Russel, 2001). O granuloma permanece no hospedeiro persistentemente, formando a base da lesão tuberculosa, na qual o microorganismo tem capacidade de perdurar durante anos (Flynn e Chan, 2001).

Contudo, ocasionalmente a resposta imune não é eficaz, dando origem à reactivação da infecção, causando doença activa (Flynn e Chan, 2001). A ineficácia da contenção surge na sequência de alterações no estado imunitário do hospedeiro, sendo normalmente associada a idade avançada, malnutrição ou co-infecção com HIV. Nestas circunstâncias, o centro do granuloma inicia um processo de necrose caseosa, com libertação de micobactérias e disseminação, em partículas de aerossol, através de simples actos como falar, tossir ou espirrar, seguindo-se um novo ciclo de infecção num outro hospedeiro. A infecção ocorre essencialmente a nível pulmonar, mas as micobactérias podem disseminar e atingir vários tecidos pela via hematogénica (Figura5) (Robbins *et al*, 2001; Rossell, 2001; Saunders e Britton, 2007).

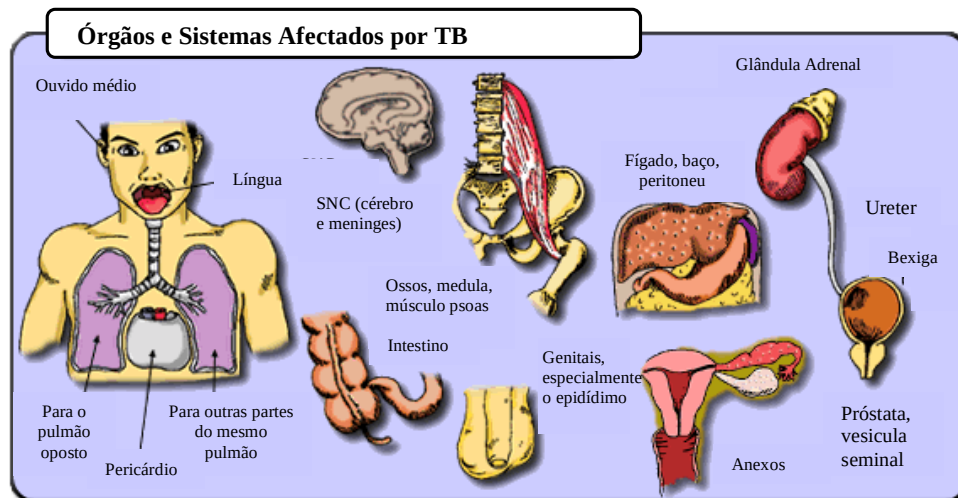


Figura 5. Diferentes órgãos e sistemas afectados por *M. tuberculosis* (Adaptado de http://sitemaker.umich.edu/medchem13/files/rccm_tuberculosis_body.gif)

A infecção por *M. tuberculosis* desenvolve-se numa sequência de eventos definida, com várias possibilidades de desfecho (Figura 6). Primeiro, o bacilo pode ser eliminado através da resposta imunitária inata por parte do hospedeiro; dos indivíduos infectados, uma proporção desenvolve TB activa num período de tempo variável entre 1 a 3 anos e, por último, como ocorre na generalidade dos casos, os indivíduos possuem infecção clinicamente latente. O estadio de latência clínica é de extrema importância para o controlo e epidemiologia da TB, sendo estimado que um terço da população mundial se encontra infectado na forma latente. Nesta situação, os indivíduos encontram-se infectados com *M. tuberculosis* embora não apresentem sintomas clínicos de TB, não representando também fontes de contágio para a população. Em cerca de 10% destes indivíduos irá ocorrer reactivação da infecção, causando TB activa (Flynn e Chan, 2001).

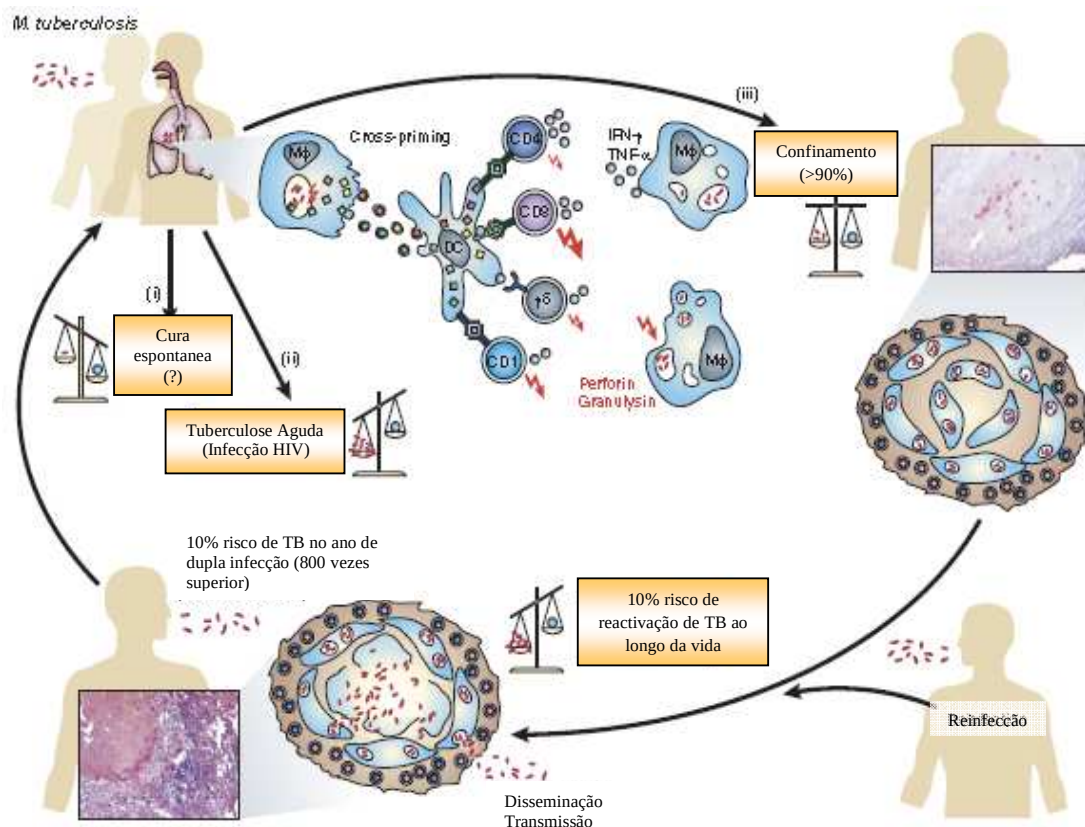


Figura 6. Diferentes formas de infecção por *M. tuberculosis* e respectivos mecanismos imunitários (Adaptado de Kaufmann *et al*, 2003).

O curso da infecção e as suas consequências epidemiológicas dependem da interacção entre hospedeiro, factores ambientais e factores bacterianos. Considerando os últimos, uma das principais características micobacterianas localiza-se no envelope celular, possuindo algumas das estruturas propriedades antigénicas, tal como LAM e PDIM (*phenolphthiocerol-dimycocerosate*), que permitem o reconhecimento e desenvolvimento de uma resposta imunológica por parte do hospedeiro (Cole, 2002; Arentz e Hawn, 2007). Além da antigenicidade, o envelope celular confere algumas propriedades características das micobactérias, nomeadamente o crescimento lento, resistência a detergentes e antibióticos comuns. Tem sido também referido que as diferenças genéticas entre estirpes de *M. tuberculosis* induzem diferentes respostas imunológicas a nível pulmonar, resultando em diferentes patologias e mortalidade (López *et al*, 2003).

1.3. Diagnóstico laboratorial de *M. tuberculosis*

Actualmente, os métodos laboratoriais mais utilizados para o diagnóstico de *M. tuberculosis* consistem na baciloscopia, cultura microbiológica e métodos moleculares para identificação da espécie e genotipagem.

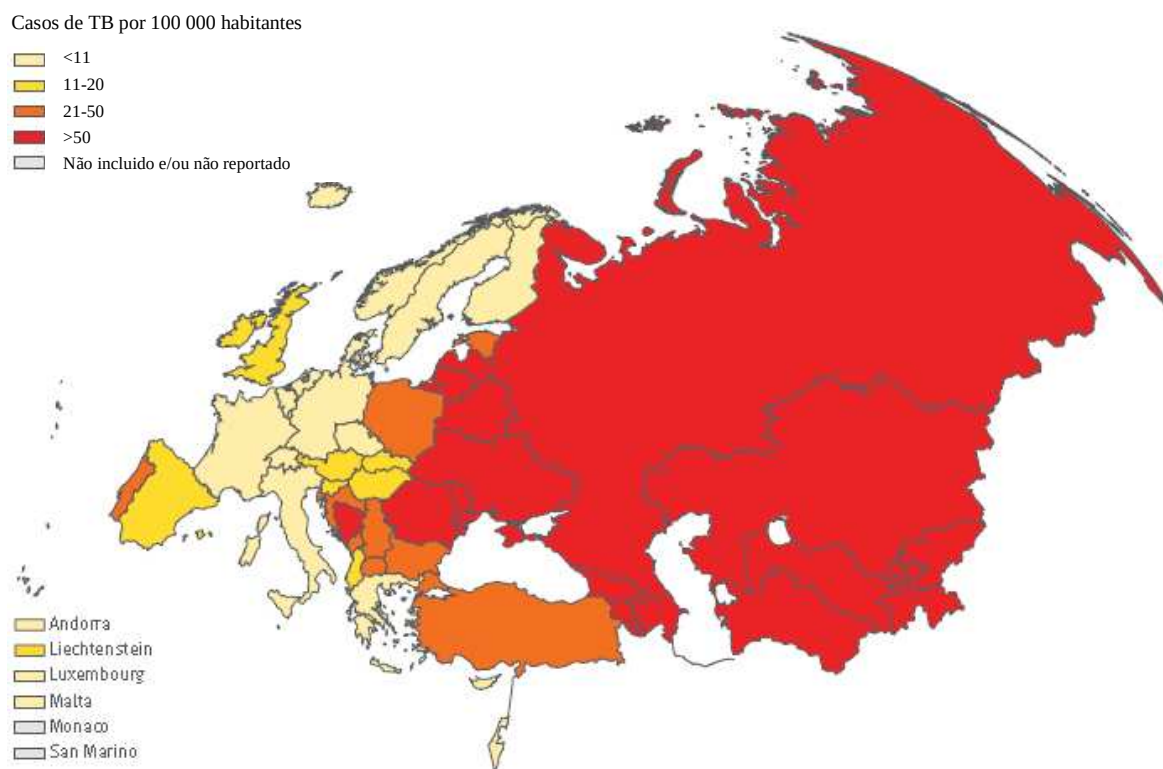
A baciloscopia permite a identificação de bacilos álcool-ácido resistentes, que adquirem cor vermelha através da técnica de Ziehl-Neelsen. Uma vez que esta característica não é exclusiva de micobactérias, é feito isolamento em cultura de modo a identificar micobactérias e determinar também a sensibilidade a fármacos antibacilares. Os principais meios de cultura utilizados são o meio sólido Löwenstein-Jensen e o meio Middlebrook, sólido ou líquido, existindo também sistemas automáticos para detecção de micobactérias, como por exemplo sistemas BACTEC, que aumentam a velocidade de crescimento ao utilizar meios enriquecidos. O produto biológico mais comumente usado para baciloscopia e cultura é a expectoração, podendo ser também analisado lavados broncoalvéolares, biopsia transbronquial, aspirados gástricos, líquido pleural e peritoneal, urina e sangue (Teixeira *et al*, 2007).

Apesar da existência de fármacos eficazes para o seu tratamento, o *M. tuberculosis* tem vindo a evoluir surgindo estirpes multirresistentes que, associado à fácil transmissão dos bacilos, ameaçam o controlo da TB, que permanece um dos maiores problemas de Saúde Pública a nível mundial. Actualmente o diagnóstico diferencial, necessário ao tratamento individual dos pacientes, e a detecção de resistências aos antibacilares dependem do isolamento do bacilo por cultura. A detecção de resistências aos antibacilares usando os métodos fenotípicos clássicos, fiáveis e amplamente testados, tem a desvantagem de necessitar de um longo período de tempo para obtenção de resultados.

A diferenciação de linhagens de *M. tuberculosis* através de técnicas moleculares, tornou-se uma ferramenta importante no estudo, controle e prevenção da TB. As técnicas mais utilizadas na epidemiologia molecular, como RFLP-IS6110 (do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*), Spoligotyping (*Spacer Oligonucleotide Typing*), e MIRU (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*)-VNTR (do inglês *Variable-Number Tandem Repeat*), consistem na análise de regiões variáveis, exclusivas ao género *Mycobacterium*, que através dos seus diferentes padrões permitem identificar e agrupar as estirpes do MTC em diversos subgrupos ou famílias (Beggs *et al*, 2000; Cowan *et al*, 2002; Sun *et al*, 2004; Brudey *et al*, 2004; Krishnan *et al*, 2007; Möbius *et al*, 2008).

1.4. Tuberculose em Portugal

Portugal é um dos países da Europa com maior incidência de TB, apesar do decréscimo contínuo que se tem verificado ao longo dos anos. Entre 2003 e 2007, Portugal registou a quarta maior descida em 28 países da União Europeia no mesmo período de tempo, diminuindo a incidência de TB em 7,2%. Contudo, encontra-se entre os cinco países com taxa de notificação de TB superior a 20/100 000 habitantes (Mapa 1) e, juntamente com Islândia e Estónia, representa a mais elevada percentagem (14,6%) de indivíduos HIV-positivo entre casos de TB (ECDC, 2009).



Mapa 1. Incidência de casos notificados na Europa, em 2007 (Adaptado de ECDC, 2009).

Em 2006, foram registados em Portugal 3092 casos novos de TB, correspondendo a uma taxa de notificação de 29,4 casos por 100,000 habitantes. No ano de 2008, foram diagnosticados 2916 casos de infecção (taxa de notificação de 25,3 casos por 100,000 habitantes), dos quais 2686 novos casos e 230 retratamentos, menos 406 novos casos e 11 retratamentos do que os registados no ano 2006. A distribuição geográfica é heterogénea, sendo as áreas de incidência maior os

distritos de Lisboa, Porto e Setúbal (DGS, 2007; DGS, 2009). A incidência de TB é superior nos indivíduos do sexo masculino, sendo a idade mediana dos doentes entre 35-44 anos apesar de, ao longo dos últimos anos, ser notável a descida da incidência entre jovens adultos.

Uma das maiores ameaças ao tratamento e controlo da TB é o surgimento de casos de infecção com características de multirresistência (TB-MR) – existência de estirpes de *M. tuberculosis* com resistência a pelo menos Isoniazida (INH) e Rifampicina (RIF), os dois mais importantes fármacos no tratamento da TB. Dados recentes da Direcção Geral de Saúde (DGS, 2009) indicam que a incidência da TB-MR tem vindo a reduzir, representando, em média 2% do número total de casos de TB em 2008 – 1,6% nos casos novos e 7,3% nos retratamentos. Esta proporção está em acordo com a mediana na União Europeia, encontrando-se praticamente circunscrita às áreas metropolitanas do Porto e, principalmente, de Lisboa. O inadequado tratamento de TB-MR aumenta a probabilidade de desenvolvimento de estirpes com resistência extensiva (XDR-TB), caracterizadas por resistência a fluoroquinolonas e pelo menos um fármaco injectável de 2ª linha (Amikacina, Kanamicina ou Capreomicina) além da resistência à INH e à RIF. Em Dezembro de 2008 a prevalência de TB-MR era de 74 casos, dos quais 34% apresentam características de XDR-TB, sendo 66% residentes em Lisboa e Vale do Tejo (DGS, 2009).

O agravamento da TB tem origem multifactorial, incluindo o aumento da pobreza, situações de exclusão social como toxicodependência (TD), movimentos migratórios a partir de regiões com índices de TB muito elevados, à desactivação parcial de medidas de luta contra a TB, à transmissão dentro de instituições como hospitais, prisões e outros centros (Antunes *et al*, 2000; Constant *et al*, 2004). Porém, a forte influência exercida pelo aumento de indivíduos infectados com o HIV tornou-se a maior ameaça ao controlo da TB. No ano de 2007, em 4% dos casos a TB foi o primeiro indicador de SIDA (ECDC, 2009). São vários os estudos que constataam a infecção HIV-positiva e a TD como um importante factor de risco para a aquisição de TB-MR, sendo a causa atribuída à diminuição das defesas do sistema imunitário. As alterações comportamentais que se associam ao consumo de substâncias como o álcool e drogas ilícitas, facilitam comportamentos de risco que aumentam a disseminação de doenças infecciosas entre estes indivíduos, nomeadamente TB (Antunes *et al*, 2000; Keizer *et al*, 2000; Hannah *et al*, 2001; Constant *et al*, 2004; Fleming *et al*, 2006). Em 2001, num estudo desenvolvido no Serviço de Doenças Infecciosas do Hospital Santa Maria, dos 39 casos estudados, verificaram que 24 casos são TB-MR, todos associados a co-infecção com HIV, dos quais nove são TD. Este estudo

alerta para o aumento significativo da incidência de TB-MR, neste serviço, ao longo dos últimos anos, de 12,5% em 1998 para 18,6% em 2000 (Constant *et al*, 2004). Porém, estes dados retratam apenas uma instituição específica. Num estudo a nível nacional, com o objectivo de caracterizar a resistência a fármacos, analisando um conjunto de 1105 isolados colhidos entre 1995 e 1998, Antunes e colaboradores (Antunes *et al*, 2000) verificaram resistência a fármacos em 197 isolados, e 48 casos de TB-MR, dos quais 17 consistem em novos casos e os restantes (31 casos) ocorreram em indivíduos previamente tratados. Estes resultados revelam não só um aumento da resistência adquirida a antibacilares no geral, mas também o aumento considerável da incidência de TB-MR adquirida (21%), estando esta relacionada com um tratamento inadequado no passado, quer por incumprimento ou má prescrição terapêutica. Os dados relativos à TB-MR entre indivíduos HIV-positivos revelam elevada prevalência de co-infecção (29.2%).

A evidente associação entre TB-MR, a infecção por HIV e TD parece estar também relacionada com hábitos de toxicofilia por parte destes indivíduos, uma vez que a principal causa de resistências aos antibacilares é devida ao baixo nível de adesão à terapêutica. É igualmente relevante referir que, em casos de co-infecção, a TB surge com uma expressão clínica diferente, sendo a sintomatologia inespecífica, com alterações típicas das infecções oportunistas ou mesmo manifestações que surgem no decurso da infecção por HIV. Esta inespecificidade dificulta o diagnóstico de TB e atrasa a instituição da terapêutica, podendo levar a um aumento significativo da possibilidade de contágio na comunidade. Este facto torna-se particularmente importante no contexto da transmissão nosocomial, devido à elevada necessidade de cuidados hospitalares por parte destes indivíduos (Constant *et al*, 2004).

1.4.1. Epidemiologia Molecular

Em Portugal, a maioria das estirpes TB-MR que circulam na região de saúde de Lisboa pertence a uma família particular de estirpes geneticamente relacionadas, detectada nos anos 90. Nesse estudo, foram identificados três *clusters*, usando o método RFLP com a sonda IS6110, sendo o *cluster* de maior representação o *cluster* A, composto de três *subclusters* (A1, A2 e A3), com uma homologia entre eles superior a 90% (Figura 7). Este *cluster*, o qual recebeu posteriormente a designação de família Lisboa, correspondeu a 72% dos isolados e apresentava

um padrão característico de multirresistência, incluindo não só a resistência à INH e à RIF, mas também à estreptomicina (STP) e, em alguns casos, ao etambutol (EMB) (Portugal *et al*, 1999). As estirpes foram isoladas principalmente em doentes HIV-positivos, embora a transmissão tenha sido demonstrada não só entre estes doentes, como em indivíduos imunocompetentes. Apesar das estirpes terem sido detectadas essencialmente na região de Lisboa, encontram-se disseminadas por todo o país e, num estudo recente, é sugerido que a transmissão das estirpes predominantes, como por exemplo estirpes Lisboa 3, possa ocorrer internacionalmente (Portugal *et al*, 1999; Portugal *et al*, 2007).

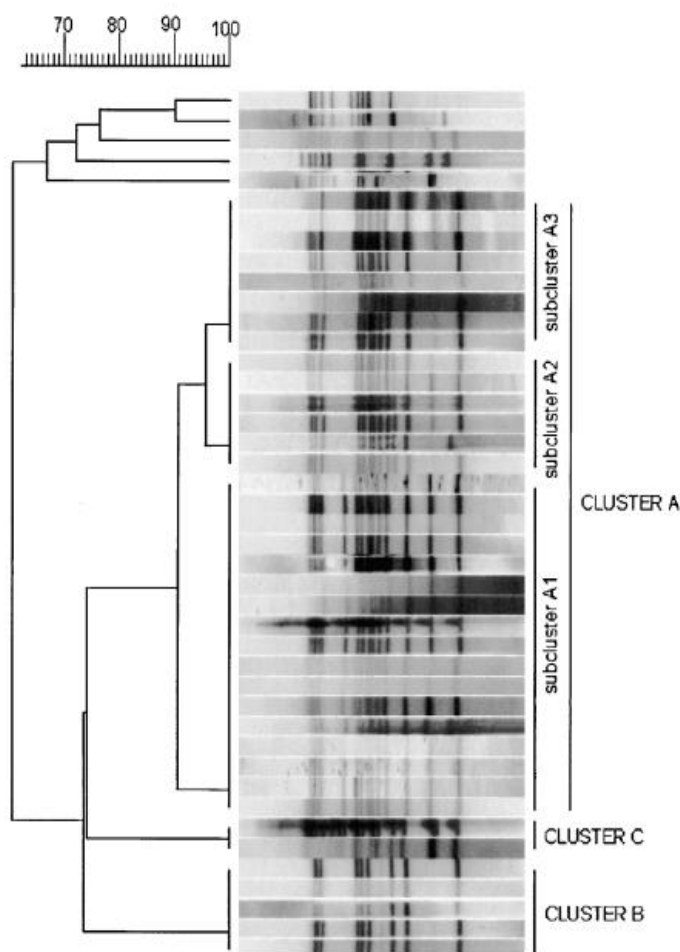


Figura 7. Dendrograma baseado na comparação de DNA fingerprint de 43 estirpes TB-MR, isoladas em Lisboa (Portugal *et al*, 1999).

Desde os anos 90, a família Lisboa tem sido associada quase exclusivamente à TB-MR, com prevalência de cerca de 50% das estirpes TB-MR em 2001 e 2002, 56% em 2003 e 88% entre 2004-2006. Muitas das estirpes evoluíram para estirpes XDR-TB, sendo que entre 2004-2006 a prevalência de XDR-TB detectada foi de 53% das estirpes TB-MR analisadas, consistindo na mais alta percentagem da Europa (Perdigão *et al*, 2008). Estes dados são particularmente alarmantes, visto que esta forma de resistência é de difícil tratamento, colocando em causa todos os avanços conseguidos no controlo e redução de mortes por TB (WHO, 2007).

1.5. Diversidade genética e biológica de *M. tuberculosis*

O *M. tuberculosis* é um microorganismo patogénico obrigatório que não se replica naturalmente fora do ambiente do hospedeiro. Tendo os membros do MTC coevoluído com a espécie humana durante milhões de anos, é provável que, ao contrário de outros oportunistas patogénicos, o bacilo da TB viável codifique um mínimo de genes de virulência necessários para a infecção, replicação e disseminação bem sucedidas.

O sucesso relativo de uma família clonal de *M. tuberculosis* sobre outra implica um equilíbrio entre níveis de expressão génica e factores ambientais. A expressão génica diferencial pode sofrer influência de variações resultantes de rearranjos cromossomais, tais como recombinações/delecções, transposições de sequências de inserção, ou polimorfismos de um único nucleótido. Assim, a ocorrência de diferentes eventos genómicos podem conduzir a vantagens adaptativas, seleccionando com sucesso uma linhagem clonal (Mathema *et al*, 2006) em detrimento de outras, resultando na alteração da capacidade do microorganismo em sobreviver, replicar e disseminar.

Membros do MTC são considerados relativamente homogéneos a nível nucleotídico, mas o aumento do número de variações específicas nas espécies, linhagens ou estirpes tem sido revelado pela identificação de multicópias de elementos de repetição, análise de espaçadores oligonucleotídicos, e a comparação de sequências genómicas de várias espécies e estirpes constituintes deste complexo. Estas diferenças têm sido usadas como marcadores para estudos epidemiológicos e/ou na identificação de estirpes de MTC ao nível de espécie. Os dados obtidos

permitem analisar a biodiversidade entre membros do MTC, relativamente à sua filogenia, distribuição geográfica e tropismo pelo hospedeiro, virulência, transmissibilidade, aquisição de resistências a antibacilares, e capacidade de invasão ou indução da resposta imunitária.

A diversidade genética e biológica das estirpes de *M. tuberculosis* advém primariamente de grandes alterações genómicas, nomeadamente deleções, inserções e duplicações, as quais são colectivamente conhecidas como polimorfismos de longa sequência (LSP, do inglês *Large Sequence Polymorphisms*) ou regiões de diferença (RD, do inglês *Region of Difference*), e de polimorfismos de um único nucleótido (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*), variações alélicas resultantes de mutações nucleotídicas aleatórias. Na formação dos *loci* RD estão envolvidas alterações como erros na replicação de DNA, movimento de elementos genéticos móveis, ou recombinação entre fragmentos adjacentes de DNA homólogo, com perda da sequência interveniente (Huard *et al*, 2006). Estas regiões foram inicialmente identificadas através da comparação do genoma de *M. bovis* e *M. bovis* BCG com a estirpe laboratorial H37Rv, onde se observou a ausência de 11 regiões nas estirpes *M. bovis* BCG relativamente à estirpe H37Rv (Behr *et al*, 1999; Gordon *et al*, 1999). Brosch e colaboradores (Brosch *et al*, 2002) verificaram que, na análise de deleções de estirpes do MTC, a sua maioria ocorre não por eventos independentes mas sim por cascatas de sucessivas deleções. Uma vez ocorrida uma deleção numa estirpe progenitora, a deleção específica pode servir como marcador genético para genotipagem da progenia dessa mesma estirpe (Figura 8).

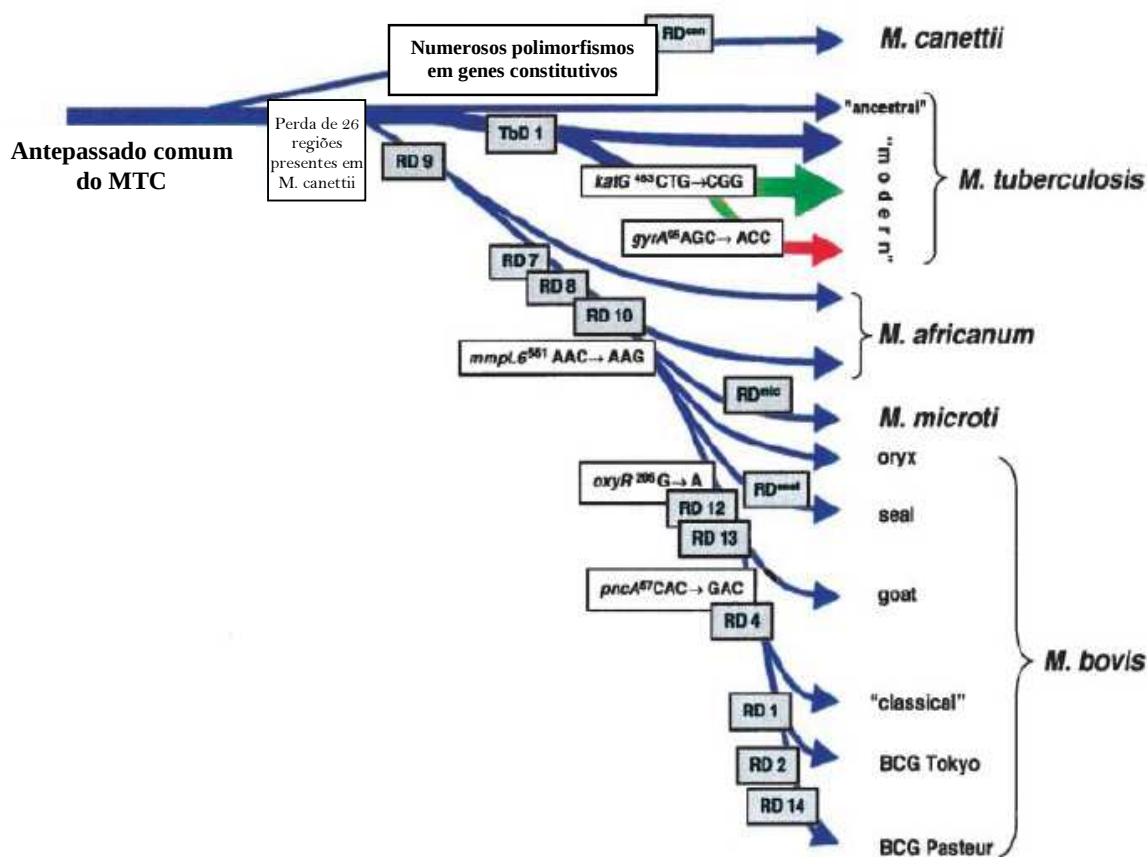


Figura 8. Esquema da via evolucionária do bacilo da TB, proposto por Brosch e colaboradores (Brosch *et al*, 2002), ilustra a perda sucessiva e unidireccional de DNA em algumas linhagens, revelando a ordem na qual os membros descendem de um ancestral comum. Este esquema é baseado na presença ou ausência de regiões de diferença conservadas e na sequência de polimorfismos de 5 genes seleccionados (Adaptado de Brosch *et al*, 2002).

Os *loci* RD variam no tamanho, desde deleções de alguns nucleótidos a polimorfismos de longa sequência, tornando-se fixos quando um clone com genótipo variante é transmitido sucessivamente, sendo fundador de uma nova linhagem (Huard *et al*, 2006). Estes padrões de deleção são uma importante fonte de variabilidade entre membros do MTC e, na medida em que a população de *M. tuberculosis* tem uma estrutura clonal (Supply *et al*, 2003; Hirsh *et al*, 2004) não ocorrendo fenómenos de transferência génica horizontal, representam eventos genéticos unidireccionais tendo um papel importante na evolução da espécie ou mesmo do género *Mycobacterium*, emergindo assim como importante sistema de caracterização para

estudos epidemiológicos e evolucionários em *M. tuberculosis* (Brosch *et al*, 2002; Mostowy *et al*, 2002; Parsons *et al*, 2002; Rao *et al*, 2005; Huard *et al*, 2006).

A comparação de genomas de estirpes de diferentes genótipos levou à descoberta de RDs específicas de diversas linhagens, tendo sido sugerido que podem existir diferenças entre estas sublinhagens na sua capacidade de transmissão e de causar doença (Fleischmann *et al*, 2002; Tsolaki *et al*, 2005; Kong *et al*, 2006). Baseando-se no estudo destas regiões, Tsolaki e colaboradores (Tsolaki *et al*, 2005) identificaram três classes de polimorfismos que permitem definir estirpes da família Beijing/W, conhecidas pela hipervirulência e disseminação a nível mundial. Devido às diferentes frequências genéticas com que surgem na população, observaram que as regiões RD105, RD149, RD152 e RD207 estão ausentes em todos os isolados desta família, enquanto as regiões RD181, RD142 e RD150 estão variavelmente ausentes, tendo observado ainda a existência de 14 LSPs exclusivos a uma única estirpe. Estes dados permitiram a identificação da linhagem de estirpes da família Beijing/W, definida pela deleção RD105 que é comum a todos os isolados, divergindo posteriormente em várias sublinhagens, que possibilitam a análise da estrutura filogenética ao identificar estirpes com diferentes fenótipos (Mostowy *et al*, 2002; Tsolaki *et al*, 2005). Assim, estes marcadores específicos são ferramentas robustas que permitem uma simples e rápida identificação dos isolados.

Comportando os *loci* RD vários importantes genes e factores de virulência, a sua presença ou ausência pode influenciar o impacto epidemiológico e relevância clínica de certas estirpes, atendendo que diferentes genótipos conferem diferentes atributos biológicos (Kong *et al*, 2006). Analisando 648 isolados clinicamente caracterizados quanto à deleção de cinco RDs (RD105, RD181, RD142, RD150 e RD239), Kong e colaboradores (Kong *et al*, 2006) observaram uma relação entre a ausência de determinadas regiões e a manifestação clínica de TB, ao associar um elevado número de casos (95%) de TB extratorácica em indivíduos cujos bacilos apresentam a combinação das deleções RD105, RD181 e RD142, ou a combinação das deleções RD105, RD181 e RD152.

Apesar das informações relativas à diversidade e frequência de polimorfismos que surgem nas populações micobacterianas, alguns autores revelam ainda que os padrões de deleções genómicas são distintos em estirpes que circulam numa determinada região geográfica, podendo ser estudada a descendência e a disseminação de um isolado partindo da sua origem (Rao *et al*, 2005; Gagneux *et al*, 2006). Rao e colaboradores (Rao *et al*, 2005) analisaram 131 isolados de *M. tuberculosis* oriundos de quatro países, com base em 14 *loci* RD e na região *tuberculosis specific deletion* (TbD1), região que permite diferenciar estirpes modernas e ancestrais de *M. tuberculosis* (Brosch *et al*, 2002), tendo observado após a construção de um dendograma, que os isolados que pertenciam a uma região geográfica específica se agrupavam num único *cluster*. Assim, os isolados agrupavam-se em quatro *clusters*, cada um geograficamente específico e dividido em subclusters dependendo da variação do padrão de RD, não tendo sido encontrado nenhum padrão de RD semelhante em isolados de países diferentes. Resultados semelhantes foram reportados por Gagneux e colaboradores (Gagneux *et al*, 2006) que, ao estudar a estrutura populacional de *M. tuberculosis* a nível global, revelaram que a população genética é altamente estruturada geograficamente, sendo possível a distinção de linhagens que se encontram associadas a áreas geográficas específicas. Assim, foram descritas seis grandes linhagens para o MTC, com base no padrão de deleção de *loci* RD: a linhagem Indo-Oceânica, que inclui as estirpes que conservam a região TbD1, designadas estirpes “modernas” de *M. tuberculosis*; linhagem do Sudeste Asiático, onde se encontra a família Beijing; linhagem Leste-Africano-Indiano; as linhagens Oeste-Africano 1 e 2, que correspondem as estirpes conhecidas como *M. africanum*; e linhagem Euro-Americana, que engloba as estirpes que pertencem ao PGG2 e PGG3. A linhagem Euro-Americana divide-se ainda em cinco sub-linhagens – Médio-Oriente, Europa-América, Oeste-Africano, Sul-Africano e África-Central.

Os *loci* RD reflectem também as primeiras migrações humanas e mesmo outras mais recentes para África e a co-adaptação hospedeiro-patogénico (Hersheberg *et al*, 2008). Através da análise de uma colecção global de estirpes do MTC, Hersheberg e os seus colaboradores (Hersheberg *et al*, 2008) demonstraram que a deriva genética (variação aleatória do *pool* genético, que ocorre de geração em geração) é uma importante força evolucionária que, associada com as alterações demográficas humanas, promove diversidade entre membros do MTC. Ao explorar a complexa interacção entre a evolução micobacteriana e o crescimento e mobilidade da população humana, os investigadores descreveram um cenário filogeográfico da TB humana (Figura 9). Este cenário

sugere que os membros do MTC tenham origem em África, o único continente onde se encontram as seis maiores linhagens MTC, migrando as estirpes das linhagens ancestrais para a Europa, e as mais recentes estirpes das linhagens modernas para as regiões que circundam o oceano Índico. O aumento da população humana global foi maior na Europa, Índia e na Ásia Ocidental, regiões associadas com as três linhagens modernas do MTC. Com o aumento recente da migração humana, estas linhagem tendem a estar distribuídas globalmente, verificando-se também algumas migrações para África (Hersheberg *et al*, 2008).

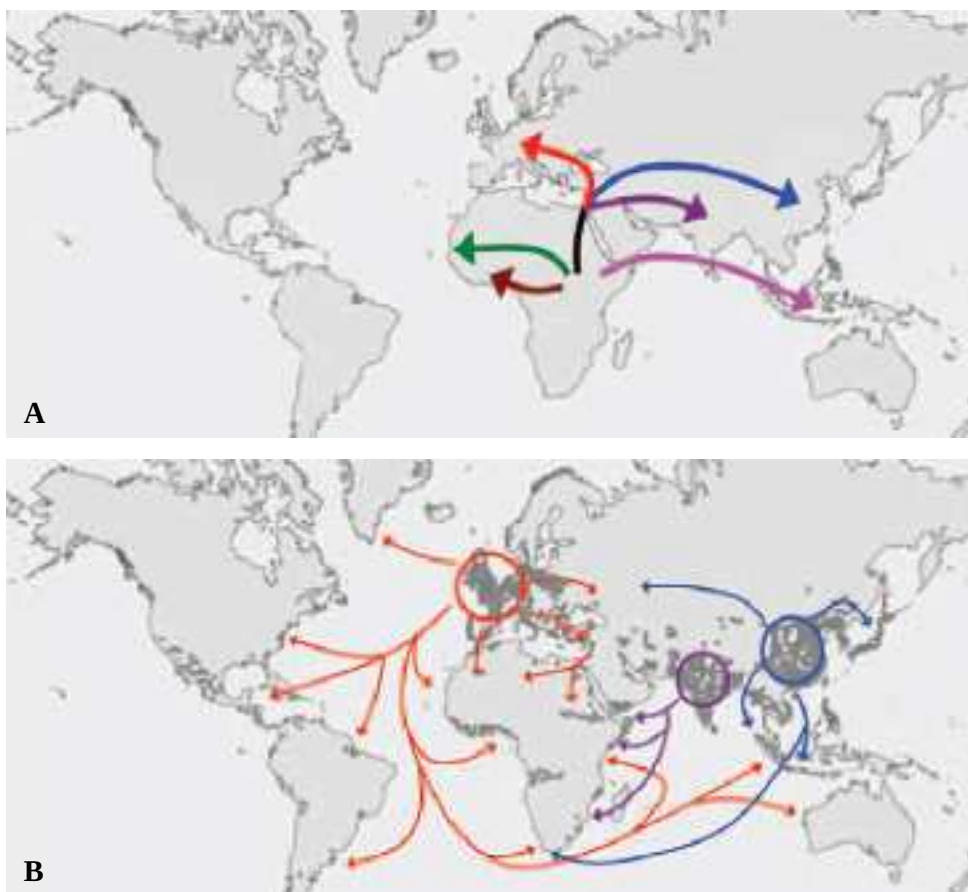


Figura 9. Cenário filogeográfico da TB humana, proposto por Hersheberg e colaboradores (Hersheberg *et al*, 2008), no qual as estirpes de *M. tuberculosis* têm origem em África, alcançando outras áreas do globo com as primeiras migrações humanas (A), e a sua distribuição pelo mundo, e de regresso a África (B), através das migrações humanas mais recentes (Hersheberg *et al*, 2008).

A análise de sequências de isolados do MTC revelou que polimorfismos alélicos são raros, ocorrendo num rácio de 1 em 10.000pb. Para o estudo das relações filogenéticas entre membros do MTC, vários autores sugerem a análise de polimorfismos de um único nucleótido – SNP, (Brosch *et al*, 2002; Gutacker *et al*, 2002; Mostowy *et al*, 2002; Baker *et al*, 2004; Filliol *et al*, 2006a; Alland *et al*, 2007) variações alélicas que derivam de mutações nucleotídicas aleatórias, por vezes sujeitas a pressão selectiva. Divididas em duas classes, as substituições podem ser designadas nsSNP (SNP não-sinónimos), havendo alteração da codificação de um aminoácido, ou sSNP (SNP sinónimos) quando a substituição não altera a estrutura das proteínas.

Foram identificados três grupos genéticos do MTC, por Sreevatsan e colaboradores (Sreevatsan *et al*, 1997), com base em dois nsSNPs que ocorrem no codão 463 do gene *katG* e no codão 95 do gene *gyrA*. Estes dois locais não participam na resistência a antibacilares e são usados como marcadores genéticos na análise de divergência de estirpes. Deste modo, é possível dividir os isolados modernos do MTC em três grupos genéticos principais (PGG): o grupo genético principal 1 (PGG1), considerado o evolucionariamente mais antigo, associado a *M. tuberculosis* ancestral, *M. microti*, *M. africanum* e *M. bovis*; o PGG2 que terá surgido de uma estirpe PGG1 na sequência de um polimorfismo no gene *katG* (Leu463Arg), e por último, uma estirpe PGG2 sofre alteração no gene *gyrA* (Thr95Ser) dando origem às linhagens de *M. tuberculosis* pertencentes ao PGG3.

Numa análise mais aprofundada, Gutacker e colaboradores (Gutacker *et al*, 2002) identificaram oito famílias relacionadas através da análise de sSNP, por comparação de genomas de quatro isolados do MTC. A árvore filogenética obtida resultou da análise de 113 sSNP, tendo-se verificado que cada cluster pertencia apenas a um único PGG, o que sugere uma forte correlação entre os dois tipos de análise. Contudo, estes estudos não identificam sistematicamente grupos filogenéticos com base na análise de clusters, permanecendo indeterminado a posição e o número de SNP *cluster groups* (SCG) entre *M. tuberculosis*.

Com o intuito de melhor definir as relações entre estes grupos, Filliol e colaboradores (Filliol *et al*, 2006a) analisaram 212 *loci* SNP, incluindo sSNP, nsSNP e igSNP (SNP intergênico), em isolados *M. tuberculosis* e *M. bovis*, o que permitiu organizar os isolados em sete SCGs, sendo possível a identificação de cinco subgrupos analisando apenas sSNP (Figura 10). Os resultados sugerem que a maioria dos clusters ter-se-ia separado por múltiplas mutações, não sendo detectados isolados de *M. tuberculosis* que se posicionem intermediamente entre dois tipos de clusters. Esta distribuição é consistente com as subdivisões anteriormente descritas para estirpes de *M. tuberculosis*, apesar das barreiras geográficas ou raízes evolucionárias, o que demonstra o grau de diferenciação no qual *M. tuberculosis* aparenta divergir em linhagens, contendo sublinhagens distintas.

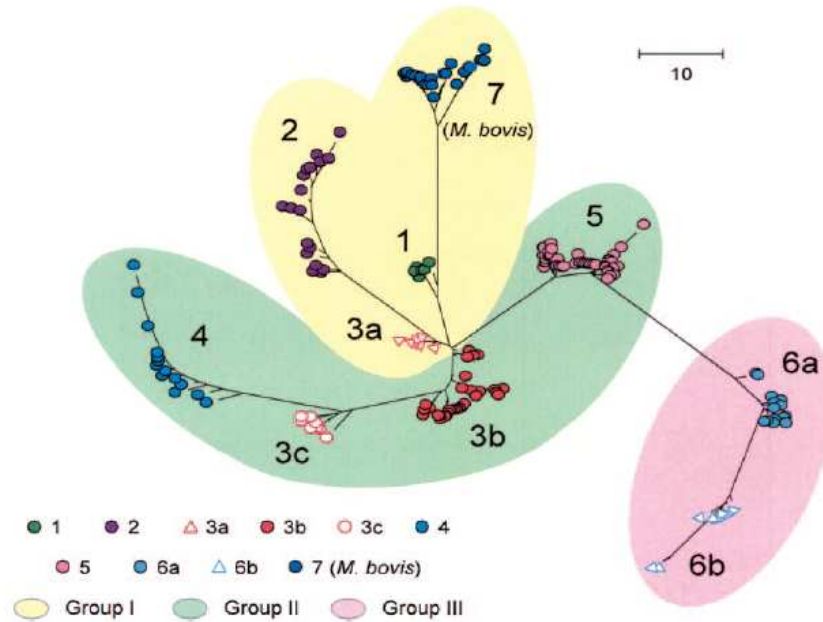


Figura 10. Esquema da distribuição de SNP sinónimos dentro de cada PGG, proposto por Filliol e colaboradores (Filliol *et al*, 2006a). O modelo foi baseado na análise de um conjunto de 212 SNPs aplicado em 327 isolados. Os números designam cada SCG, enquanto os três maiores grupos resultam da combinação de dois alelos, *katG*⁴⁶³ e *gyrA*⁹⁵ (PGG) (Filliol *et al*, 2006b).

1.6. Objectivos

Sendo as estirpes *M. tuberculosis* da família Lisboa as mais prevalentes no nosso país, e associadas quase exclusivamente a TB-MR e XDR-TB, torna-se clara a existência de vantagem adaptativa, que lhes permite alta transmissibilidade e prevalência. O presente estudo tem como principal objectivo a caracterização de grandes alterações genómicas em estirpes de *M. tuberculosis* da família Lisboa, a fim de identificar possíveis factores de disseminação, patogenicidade e virulência, que possam ajudar a caracterizar e explicar a extensiva expansão desta família em Portugal. Neste sentido, os isolados pertencentes a esta família serão analisados quanto à presença ou ausência das principais regiões de diferença. Será também caracterizado o grupo genético principal (Sreevatsan *et al*, 1997) através do estudo de polimorfismos nos genes *katG* e *gyrA* e, por fim, a análise de SNP *cluster group* (Alland *et al*, 2007).

2. Material e Métodos

2.1. Amostra

Foram analisados no presente estudo 132 isolados, previamente caracterizados por MIRU-VNTR (Perdigão *et al*, 2009), colhidos num hospital central de Lisboa, no ano de 2006. Destes isolados seleccionaram-se três, dois pertencentes à família de estirpes Lisboa (Lisboa2 e Lisboa3) com mais de 90% de similaridade, e um isolado não pertencente à família Lisboa (cluster1), que apresenta 85% de similaridade com esta família. Os isolados da família Lisboa são susceptíveis a todos os fármacos de 1ª linha, enquanto que o isolado não-Lisboa possui resistência a INH e STP.

2.2. Cultura e isolamento de DNA micobacteriano

Os isolados utilizados neste estudo foram cultivados em meio Löwenstein-Jensen, por um período de 2-3 semanas. Para extracção de DNA, foi transferida uma ansa carregada de bactérias num tubo contendo 450µL de TE pH 1x, promovendo-se lise celular através de banho-maria à temperatura de 80°C, durante 20 minutos (min). Após lise celular adicionou-se à suspensão 50µL de lisozima 10mg/mL, incubando-se as amostras com agitação a 37°C durante a noite. Adicionou-se 75µL de uma solução de 10%SDS/proteinase K, permanecendo 10 min a 65°C. Para precipitação das proteínas, juntou-se à suspensão 100µL de NaCl 5M e 100µL da solução pré-aquecida CTAB/NaCl. Ao verificar uma solução esbranquiçada após homogenização, incubaram-se as amostras durante 10min à temperatura de 65°C. Adicionou-se 750µL de clorofórmio/álcool isoamilico na proporção 24:1, centrifugou-se durante 8 min a 13000 rotações por minuto (rpm). A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, onde se adicionou 450µL de isopropanol se agitou, estimando a quantidade de DNA presente, e colocou-se a -20°C durante 30min. Após centrifugação a 13000 rpm durante 15min, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1mL de etanol 70% frio (-20°C), agitando-se o tubo para lavar o DNA precipitado. Centrifugou-se 5 min a 13000 rpm, seguido-se outra centrifugação durante 1min a 13000 rpm. Removeu-se o restante sobrenadante, deixou-se secar à temperatura ambiente, verificando a

evaporação do etanol, e dissolveu-se o sedimento com a quantidade de TE 1x estimada anteriormente (Van Soolingen, 2002).

2.3. Amplificação de Regiões de Diferença

As estirpes de *M. tuberculosis* foram analisadas quanto à presença ou ausência das principais regiões de diferença, previamente descritas para outras grandes famílias de estirpes por Gagneux e colaboradores (Gagneux *et al*, 2006). A amplificação destas regiões foi realizada através de reacção de PCR, com T3 *thermocycler* (Biometra®), contendo 10 pmol de cada primer, 2µL de DNA extraído previamente, e 12 µL de 2x Red PCR Master Mix (Invitex®), juntando água destilada até atingir um volume total de 25µL. As sequências dos primers e o respectivo peso molecular dos produtos de amplificação estão descritos na Tabela 1.

As regiões RD5, RD9, RD193 e *pks15/1* foram amplificadas segundo as condições: desnaturação 4 min a 94°C, seguida de 20 ciclos com 1 min e 30 segundos (seg) a 94°C, emparelhamento 64°C 1 min e 30 seg, extensão a 72°C durante 3 min, e 15 ciclos com 94°C 1 min, emparelhamento 64°C 1 min e 30 seg, extensão 72°C 3 min (com incremento de 4 seg), e extensão final à temperatura de 72°C durante 10 min. A mistura de reacção com os primers RD5 e RD9 contém 2 mM MgCl₂.

As regiões RD239, RD724 e RD750 foram amplificadas segundo as condições: desnaturação 4 min a 94°C, seguida de 20 ciclos com 1 min e 30 seg a 94°C, emparelhamento 58°C 1 min e 30 seg, extensão a 72°C durante 3 min, e 15 ciclos com 94°C 1 min, emparelhamento 58°C 1 min e 30 seg, extensão 72°C 3 min (com incremento de 4 seg), e extensão final à temperatura de 72°C durante 10 min. A mistura de reacção com os respectivos primers contém 3 mM MgCl₂.

As regiões RD115, RD174 e RD183 foram amplificadas segundo as condições: desnaturação 4 min a 94°C, seguida de 20 ciclos com 1 min a 94°C, emparelhamento 58°C 1 min e 30 seg, extensão a 72°C durante 9 min, e 15 ciclos com 94°C 1 min, emparelhamento 56°C 1 min e 30 seg, extensão 72°C 9 min (com incremento de 4 seg), e extensão final à temperatura de 72°C durante 10 min. A mistura de reacção com o primer RD174 contém 3 mM MgCl₂.

A região RD761 foi amplificada segundo as condições: desnaturação 4 min a 94°C, seguida de 20 ciclos com 1 min e 30 seg a 94°C, emparelhamento 64°C 1 min e 30 seg, extensão a 72°C durante 3 min, e 15 ciclos com 94°C 1 min, emparelhamento 60°C 1 min e 30 seg, extensão 72°C 3 min (com incremento de 4 seg), e extensão final à temperatura de 72°C durante 10 min.

A região RD726 foi amplificada segundo as condições: desnaturação 4 min a 94°C, seguida de 20 ciclos com 1 min a 94°C, emparelhamento 58°C 1 min e 30 seg, extensão a 72°C durante 6 min, e 15 ciclos com 94°C 1 min, emparelhamento 58°C 1 min e 30 seg, extensão 72°C 6 min (com incremento de 4 seg), e extensão final à temperatura de 72°C durante 10 min. A mistura de reacção contém 3 mM MgCl₂.

A região RD122 foi amplificada segundo as condições: desnaturação 4 min a 94°C, seguida de 20 ciclos com 1 min a 94°C, emparelhamento 58°C 1 min e 30 seg, extensão a 72°C durante 9 min, e 15 ciclos com 94°C 1 min, emparelhamento 58°C 1 min e 30 seg, extensão 72°C 9 min (com incremento de 4 seg), e extensão final à temperatura de 72°C durante 10 min.

A amplificação da região TbD1 foi realizada através de reacção de PCR, contendo 10 pmol de cada primer, 2µL de DNA extraído previamente, uma unidade de NZYTaq *polymerase* (nzytech®), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, juntando água destilada até atingir um volume total de 25µL. A amplificação ocorreu segundo as condições: desnaturação 4 min a 94°C, seguida de 20 ciclos com 1 min a 94°C, emparelhamento 62°C 1 min e 30 seg, extensão a 72°C durante 6 min, e 15 ciclos com 94°C 1 min, emparelhamento 62°C 1 min e 30 seg, extensão 72°C 6 min (com incremento de 4 seg), e extensão final à temperatura de 72°C durante 10 min.

A região RD^{rio} foi amplificada através de Multiplex-PCR, utilizando os primers IS1561, e RD^{rio} Bridge (Gibson *et al*, 2008), na concentração de 10mMol/µL, com 12,5µ de Taq Red, 2µL DNA, adicionando-se água destilada até prefazer o total de 25µL de reacção. A reacção de amplificação ocorreu segundo as condições: 5min de desnaturação a 95°C, seguida de 45 ciclos a 95°C 1min, emparelhamento a 64°C durante 1min, e 4min a 72°C, com extensão final durante 10min à temperatura de 72°C.

2.4. Amplificação de *Single Nucleotide Polymorphisms*

Os isolados de *M. tuberculosis* foram analisados quanto à existência de polimorfismos nos genes *katG*⁴⁶³ e *gyrA*⁹⁵ para determinação do PGG. Procedeu-se à amplificação do gene *katG*⁴⁶³ utilizando os primers *katG* 904 e *katG* 1523 (Tabela 2), sob as seguintes condições de amplificação: desnaturação 2 min a 94°C, seguida de 50 ciclos com 1min a 94°C, emparelhamento 60°C 1min e extensão a 72°C durante 1min. Para amplificação do gene *gyrA*⁹⁵, sob as seguintes condições de amplificação: 1ciclo de desnaturação 4 min a 95°C, 35 ciclos de 1min a 94°C, emparelhamento a 55°C durante 1 min, e extensão a 72°C durante 1 min, 1ciclo de extensão final, 72°C durante 10 min.

Na análise do SCG procedeu-se à amplificação de nove SNPs, descrito por Alland e colaboradores (Alland *et al*, 2007), cuja análise conjunta permite a distinção de dez SCG (Tabela 3). As sequências dos primers que flanqueiam estas regiões encontra-se na Tabela 2, ocorrendo a amplificação nas seguintes condições: 1 ciclo de desnaturação de 4 min a 94°C, 30 ciclos de 1min a 94°C, 1 min de emparelhamento a 63°C e 1 min de extensão a 72°C, 1 ciclo de extensão final, 72°C durante 1 min.

2.5. Sequenciação e análise bioinformática

Os produtos de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose a 1.5%, em tampão TBE 0.5%, aplicando o marcador de peso molecular *peqGOLD 100 pb DNA-Ladder*, da *peqLab*[®], para análise dos produtos de amplificação dos *loci* RD5, RD9 e *pks15/1*, sendo utilizado para análise das restantes regiões o marcador *peqGOLD DNA-sizer V* (λ -*BstEII*), da *peqLab*[®] (Figura 11). Para análise de polimorfismos e confirmação das regiões deletadas, as amostras foram purificadas a partir do produto de PCR, adicionando 250µL de *Binding Buffer* em colunas MSB Spin PCRapace (Invitek[®]), seguida de centrifugação durante 3min a 12000 rpm. Após centrifugação transferiu-se o filtro para um novo tubo, adicionando 20µL da solução *Elution Buffer* e, terminada a incubação de 5min, centrifugou-se 5min a 10 000 rpm.

Os produtos purificados foram enviados para sequenciação na Macrogen Inc, e posteriormente analisados com os programas bioinformáticos CLC *Sequence Viewer* versão 6, e BioEdit *Sequence Alignment Editor*.

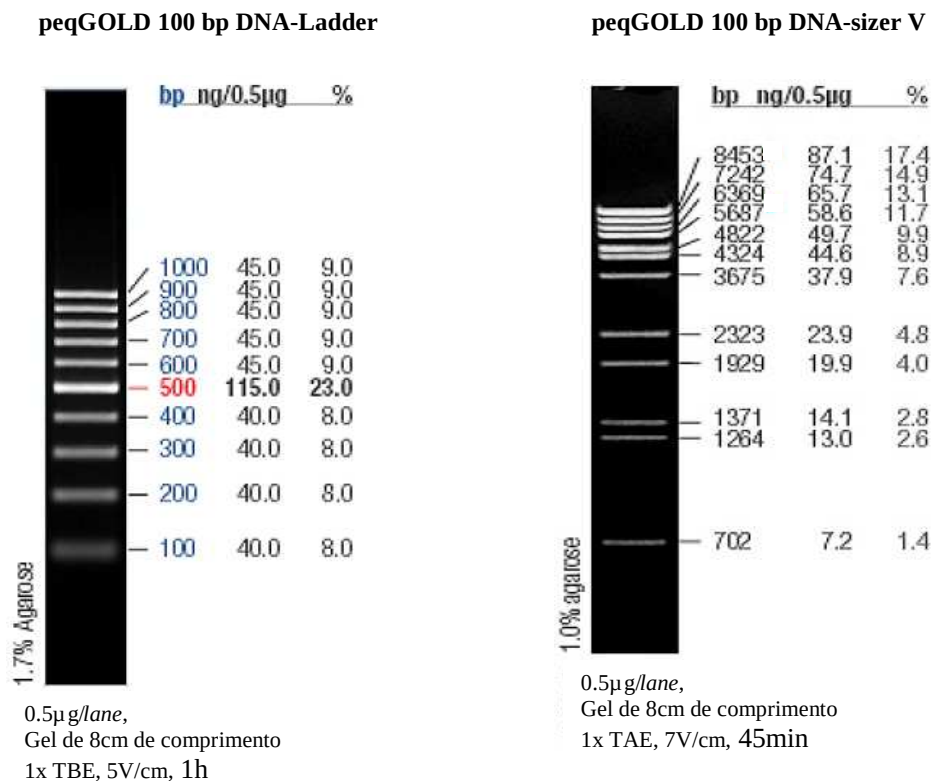


Figura 11. Esquematização das bandas de electroforese dos marcadores peqGOLD 100 bp DNA-Ladder, à esquerda, e peqGOLD DNA-Sizer V, à direita (Adaptado de <http://www.biotarget.pt>).

Tabela 1: Sequências dos primers que flanqueiam as principais regiões de diferença, com respectiva temperatura de fusão (Tm), tamanho molecular do produto de amplificação na estirpe de referência H37Rv, e em estirpes com a região deletada.

RD	Primers (5'-3') Forward (F) e Reverse (R)	Tm (°C)	Produto amplificação (bp)		Fonte
			H37Rv	deletado	
RD5	F: CTGGTCGAATTCGGTGGAGT	57.0	152	–	Parsons <i>et al</i> , 2002
	R: ATGGTCTCCGACACGTTTCGAC	59.2			
RD9	F: GTGTAGGTCTAGCCCCATCC	57.6	306	206	Parsons <i>et al</i> , 2002
	Int: CAATGTTTGTGCGCTGC	53.5			
	R: GCTACCCTCGACCAAGTGTT	57.0			
RD105	F: GGAGTCGTTGAGGGTGTTTCATCAGCTCAGTC	64.4	4252	785	Gagneux <i>et al</i> , 2006
	R: CGCCAAGGCCGCATAGTCACGGTCG	67.5			
RD115	F: TTCGGGGGCCAGGTCGTTGAT	63.6	3442	835	Gagneux <i>et al</i> , 2006
	R: CCGCGGGAATGCCTGCTGTTAT	62.4			
RD122	F: GCCGGCACCCTAATCGCTACTT	63.9	1456	285	Gagneux <i>et al</i> , 2006
	R: TTCTCTTGGGCATGATCATCCTTTCGTTA	59.7			
RD174	F: GGTGCCCTCCCGCAGAACTGT	64.5	4525	874	Gagneux <i>et al</i> , 2006
	R: AGCGCGATCGCAGCGGTGAA	64.9			
RD183	F: CCGAACCGCCCGCATCAAG	62.0	3965	1048	Gagneux <i>et al</i> , 2006
	R: ACGACGGCCGAAACACAGGAA	63.5			
RD193	F: CCGACTACGCCTGGCGCTAAACC	64.2	1308	807	Gagneux <i>et al</i> , 2006
	R: GTAGGGGGCCACCCGATTGTCAC	64.0			
RD239	F: GGCCAACATCGACCACCTACCC	62.2	1730	888	Gagneux <i>et al</i> , 2006
	R: ATCCTCGCTACCGGCACCTCAT	52.5			
RD724	F: CCATGCGATTTGACTTCCGATTGA	57.8	1288	1650	Gagneux <i>et al</i> , 2006
	R: ATATACCGTGCCGCGACTTGCTCT	62.3			
RD726	F: GCCC GGCGGATGCTGTT	64.4	2062	313	Gagneux <i>et al</i> , 2006
	R: CGGCGGCGCGTTTGTCA	62.7			
RD750	F: GTCGGCGGTCTGCTTCGTTCC	63.0	1533	743	Gagneux <i>et al</i> , 2006
	R: CCTGTGCGCCGGGTGTCTTTC	62.8			
RD761	F: GCCGGCGTGCTCAATGCTCAG	63.9	1389	295	Gagneux <i>et al</i> , 2006
	R: CCTAGGCCGCGACGAAGTGC	65.1			
TbD1	F: CGTTCAACCCCAAACAGGTA	55.2	*	–	Brosch <i>et al</i> , 2002
	R: AATCGAACTCGTGGAACACC	55.1			
pks15/1	F: CTGGGTTGGCCTGCACGTGGGCCATAA	68.4	143	143	Gagneux <i>et al</i> , 2006
	R: GCCCCCGCAGAGGCGCCGGTT	72.4			

* presente em *M. bovis*: 500pb

Tabela 1: (continuação)

RD	Primers (5'-3') Forward (F) e Reverse (R)	Tm (°C)	Produto amplificação (bp)	Fonte
IS1561	F: GACCTGACGCCGCTGACAC	61.2	530	Gibson <i>et al</i> , 2008
	R: CACCTACACCGCTTCCTGCC	60.7		
RD ^{rio} Bridge	F: CACTCCGGCTGCCAATCTCGTC	62.4	1175	Gibson <i>et al</i> , 2008
	R: CACCGCCACGCTGAATGAGACCA	63.9		

Tabela 2: Sequências dos primers específicos para a identificação de SNPs sinónimos e não sinónimos, com respectivo tamanho molecular do produto de amplificação e temperatura de fusão (Tm).

	Primers (5'-3') Forward (F) e Reverse (R)	Tm(°C)	Produto amplificação (pb)	Fonte
katG	katG904: AGCTCGTATGGCACCGGAAC	59.9	620	Uhl <i>et al</i> , 1996
	katG1523: TTGACCTCCCACCCGACTTG	59.4		
gyrA	F: CAGCTACATCGACTATGCGA	54.2	320	Ginsburg <i>et al</i> , 2005
	R: GGGCTTCGGTGTACCTCAT	57.0		
913274	F: AAGTGCTCGACGATACGGCC	61.8	389	Presente estudo
	R: GCCTTCTGGTTCGGGTTGGAG	60.5		
2154724	F: GTTGACCTCCCACCCGACTTG	60.2	260	Presente estudo
	R: CCGTTGCGAGATACCTTGGGC	60.7		
1977	F: CGTTCGCTGGATACACCCGC	63.0	309	Presente estudo
	R: TTTAGCCACCCACGACACCGC	62.5		
54394	F: GAAGGGGCGTTGTTGGCAGC	62.2	350	Presente estudo
	R: TTCGCAACCGCCTTCTCCGC	63.3		
74092	F: GCGCGGTCCAGTGTATCGA	62.4	297	Presente estudo
	R: AGCCGCCATCAAGGAAGTGC	60.8		
105139	F: TCCAGACGTTCCAGAGACCGC	61.2	339	Presente estudo
	R: CCAGGACTCACCTCCTTGCC	60.1		
144390	F: ATTGTCGTCGCTTGCTGGC	62.9	323	Presente estudo
	R: TCGTCCCGCCGGTGAACATG	62.6		
232574	F: CGTTGCGGCTGGACATTACC	61.1	359	Presente estudo
	R: CCCGACGAACACCGACACCTC	62.3		
311613	F: TTCCGTGGGCCGTCAAGATCA	61.2	260	Presente estudo
	R: TGAAGCCACTATCGCCGTCCG	61.7		

Tabela 3: Conjunto mínimo de SNP que permite a classificação de estirpes *M. tuberculosis* em 10 SCG distintos (Adaptado de Alland *et al*, 2007).

SCG	SNP								
	1977	54394	74092	105139	144390	232574	311613	913274	2154724
1	G	G	C	C	G	G	T	G	A
2	G	G	C	A	G	G	T	C	A
3a	G	G	C	C	G	G	T	C	A
3b	G	G	C	C	G	G	T	C	C
3c	G	G	C	C	G	T	T	C	C
4	G	G	C	C	A	T	T	C	C
5	G	A	C	C	G	G	T	C	C
6a	A	A	C	C	G	G	T	C	C
6b	A	A	C	C	G	G	G	C	C
7	G	G	T	C	G	G	T	G	A

3. Resultados

Por forma a delinear a linhagem filogenética das estirpes da família Lisboa, estirpes muito associadas à multirresistência a antibióticos e as mais prevalentes na região de Lisboa, procedeu-se à análise de deleções genómicas e polimorfismos de um único nucleótido, através de reacções por PCR utilizando primers específicos para as referidas regiões, e sequenciação.

3.1. Caracterização da amostra por MIRU-VNTR

No presente estudo foram analisados três isolados, seleccionados de uma população de 132 isolados previamente caracterizados por MIRU-VNTR (Figura 12), provenientes de um hospital central de Lisboa. Os isolados, 112 HPV06, 130 HPV06 e 157 HPV06, pertencem respectivamente aos clusters Lisboa3, Lisboa2 e C1. A selecção dos isolados foi realizada com base na representatividade dos maiores clusters da família Lisboa e uma estirpe de um cluster não-Lisboa, embora com cerca de 85% de similaridade por MIRU-VNTR com a família Lisboa (Perdigão *et al*, 2009). Foi utilizada a estirpe *M. tuberculosis* H37Rv como controlo.

3.2. Determinação do Grupo genético principal (PGG) e SNP cluster group (SCG)

De acordo com Sreevatsan *et al* (1997), as estirpes de *M. tuberculosis* podem ser divididas em três PGG, tendo como base a análise de dois polimorfismos nos genes *katG*⁴⁶³ e *gyrA*⁹⁵. Procedeu-se à amplificação e sequenciação das referidas regiões nos dois isolados Lisboa e isolado não-Lisboa, utilizando primers específicos, tendo sido observada após o alinhamento com a estirpe H37Rv uma substituição nucleotídica no locus 463 do gene *katG* (T por G) em todas as estirpes analisadas. Ao contrário da estirpe H37Rv, que tem uma substituição de C por G, não se observaram alterações na sequência do gene *gyrA*⁹⁵ em qualquer um dos isolados

analisados. A existência do polimorfismo no gene *katG* resulta na alteração da codificação aminoacídica, sendo produzido o aminoácido arginina em vez de leucina. Comparando os resultados obtidos com o cenário evolutivo de *M. tuberculosis*, proposto por Sreevatsan e colaboradores (Sreevatsan *et al*, 1997) conclui-se que as estirpes da família Lisboa, e estirpe não-Lisboa, pertencem ao PGG2, caracterizado pela produção dos resíduos aminoacídicos arginina no gene *katG*⁴⁶³, e tirosina a nível do gene *gyrA*⁹⁵. Numa análise mais pormenorizada, fez-se a pesquisa de polimorfismos sinónimos, que possibilitam a distinção de vários grupos dentro de cada PGG, designado SCG. O estudo de nove SNPs permite a classificação dos isolados em 10 SCGs (Tabela 3, ver em Materiais e Métodos); a amplificação e sequenciação das nove regiões nos isolados da família Lisboa e isolado não-Lisboa, permitiu a observação de um padrão de polimorfismos idêntico ao polimorfismo característico do SCG-5 (Tabela 4), pertencendo a estirpe H37Rv ao SCG-6b (Filliol *et al*, 2006a; Alland *et al*, 2007). Esta análise é consistente com os resultados obtidos no PGG, colocando os isolados da família Lisboa no grupo de estirpes modernas de *M. tuberculosis*.

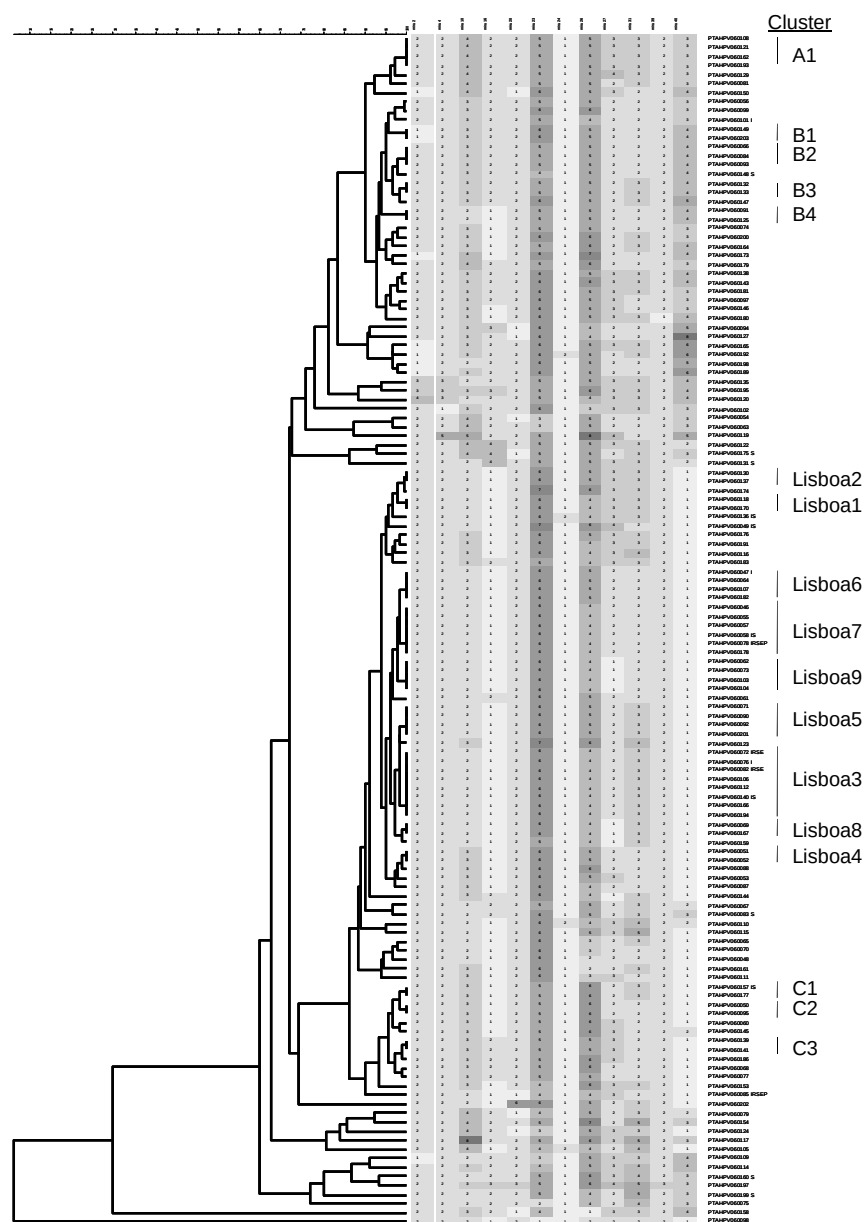


Figura 12. Dendrograma obtido através da análise de MIRU-VNTR, em 132 isolados clínicos de *M. tuberculosis* (Perdigão *et al*, 2009).

Tabela 4: Resultados obtidos da análise sequencial dos genes *katG463* e *gyrA95*, para caracterização do grupo genético principal, e de nove SNPs, que permitem inferir o SCG.

Isolados	Grupo Genético Principal				SNP cluster group									
	katG463	gyrA95	PGG	1977	54394	74092	105139	144390	232574	311613	913274	2154724	SCG	
H37Rv	CGG	AGC	3	A	A	C	C	G	G	G	C	C	6a	
1171IPV06 (Lx3)	CGG	ACC	2	G	A	C	C	G	G	T	C	C	5	
1301IPV06 (Lx2)	CGG	ACC	2	G	A	C	C	G	G	I	C	C	5	
1571IPV06 (C1)	CGG	ACC	2	G	A	C	C	G	G	T	C	C	5	

3.3. Análise de Regiões de Diferença

As estirpes *M. tuberculosis* da família Lisboa foram analisadas quanto à presença ou ausência de 14 regiões de diferença e da região *pks15/1*, usadas para distinguir membros relacionados do MTC, estando os resultados expressos na Tabela 5. Numa primeira fase, estudaram-se quatro marcadores que permitem a distinção de estirpes *M. bovis* (RD9), *M. microti* (RD5) e *M. tuberculosis* (TbD1 e RD239 – Indo-Oceânica) (Brosch *et al*, 2002; Parsons *et al*, 2002). Foram considerados dois grupos de *M. tuberculosis* com base na presença ou ausência de uma região específica, TbD1, designando-se ancestrais as estirpes que conservam esta região, que está deletada nas estirpes “modernas” de *M. tuberculosis* (Brosch *et al*, 2002). Todos os isolados em estudo apresentam a deleção TbD1 (Figura 13), estirpes modernas de *M. tuberculosis*, estando em concordância com os resultados obtidos na análise de SNPs.

Tabela 5: Resultado da análise de presença ou ausência de RDs em três isolados. Os círculos, claros e escuros, indicam a ausência ou presença das RDs específicas, respectivamente.

Regiões de Diferença	Isolados		
	112 (Lisboa3)	130 (Lisboa2)	157 (C1)
TbD1	○	○	○
pks15/1	○	○	○
RD5	●	●	●
RD9	●	●	●
RD105	●	●	●
RD115	●	●	●
RD122	●	●	●
RD174	○	○	○
RD183	●	●	●
RD193	●	●	●
RD239	●	●	●
RD724	●	●	●
RD726	●	●	●
RD750	●	●	●
RD761	●	●	●
RD ^{RIO}	○	○	○

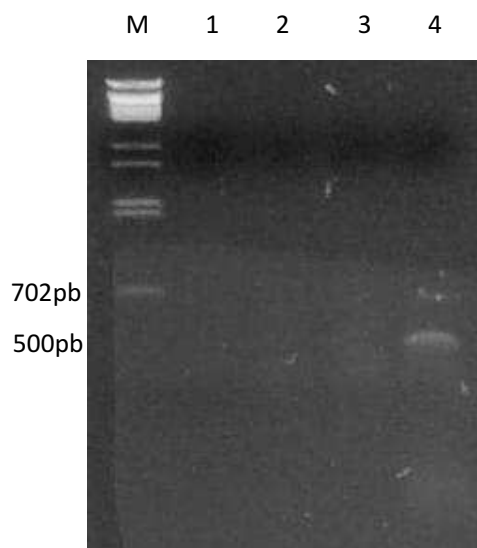


Figura 13. Amplificação da região TbD1, observando-se um fragmento de 500pb na estirpe *M. bovis* BCG (4). A ausência de banda nos isolados 112HPV06 (1), 130HPV06 (2) e 157HPV06 (3) indica a deleção desta região. M) marcador de peso molecular λ -BstEII.

Uma vez ausente a região TbD1, procedeu-se ao estudo dos marcadores que definem as quatro grandes linhagens de *M. tuberculosis*, nomeadamente RD105 (Sudeste-Asiático), RD750 (Leste-Africano-Indiano) e *pks15/1* (Euro-Americana) (Gagneux *et al*, 2006). Os dois primeiros marcadores estão presentes nos três isolados analisados, revelando a análise sequencial do *locus pks15/1* uma deleção de 7pb, quando comparada com as estirpes de referência *M. tuberculosis* 210 (Beijing) (Figura 14). O *locus pks15/1*, envolvido na biossíntese de glicolípidos fenólicos (PGL), é considerado um factor de virulência em algumas estirpes do MTC (Reed *et al*, 2004; Ehrt e Schnappinger, 2007). Estando o fenótipo de produção de PGL associado à presença de 7pb e 1pb (Constant *et al*, 2002; Reed *et al*, 2004), os resultados sugerem um fenótipo de não produção de PGL nas estirpes da família Lisboa, fenótipo semelhante ao da estirpe de referência H37Rv.

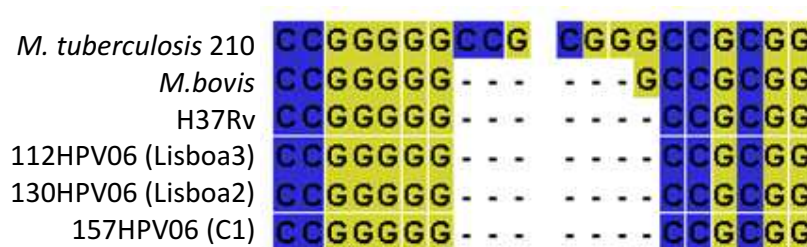


Figura 14. Alinhamento de parte da sequência do *locus pks15/1* nas estirpes de referência *M. tuberculosis* 210 (família Beijing), *M. bovis* e estirpe H37Rv, e nos isolados da família Lisboa 112HPV06 e 130HPV06, e estirpe 157HPV06 (C1).

Pertencendo as estirpes não produtoras de PGL à linhagem Euro-Americana (Gagneux *et al*, 2006) de *M. tuberculosis*, foram analisadas as regiões que definem as suas sublinhagens (RD115, RD122, RD183, RD193, RD174, RD726, RD724 e RD761), tendo sido verificada a deleção da região RD174 (Figura 15), cuja ausência é específica da sublinhagem Oeste-Africano (Gagneux *et al*, 2006), nos três isolados analisados.

O produto de amplificação desta região foi sequenciado para confirmação da deleção, encontrando-se o respectivo alinhamento com a estirpe de referência H37Rv em anexo (Anexo I). A linhagem Euro-Americana é a mais frequente nos continentes Europeu e Americano apesar de algumas sublinhagens predominarem em diferentes regiões de África e Médio Oriente (Gagneux *et al*, 2006).

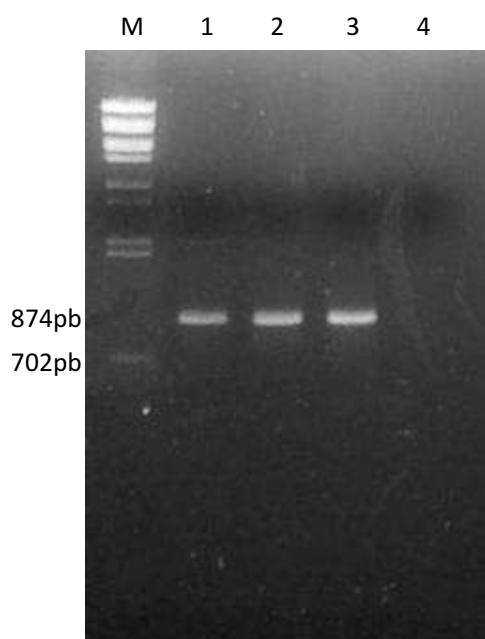


Figura 15. Amplificação da região RD174, observando-se um fragmento de cerca de 800pb nos isolados 112HPV06 (1), 130HPV06 (2) e 157HPV06 (3), o que indica a deleção desta região. Não foi possível a amplificação do fragmento que corresponde à presença do *locus* RD174 na estirpe *M.tuberculosis* H37Rv (4), devido ao seu elevado peso molecular (mais de 4500pb). M) marcador de peso molecular λ -BstEII.

Lazzarini e colaboradores (Lazzarini *et al*, 2007) descreveram uma estirpe prevalente no Rio de Janeiro, Brasil, que apresenta o maior LSP documentado até ao momento, com 26,317 kb, denominado RD^{rio}. Fez-se pesquisa da região RD^{rio}, visto que um dos marcadores para esta RD consiste na deleção do *locus* RD174, que está também ausente nas estirpes Lisboa estudadas. De modo a identificar a existência do polimorfismo RD^{rio}, procedeu-se à pesquisa do elemento de inserção IS1561, que é interno à região RD^{rio}, ou do fragmento correspondente à perda desta região, através de PCR-Multiplex (Lazzarini *et al*, 2007; Gibson *et al*, 2008).

A técnica revelou a amplificação de um fragmento de 1175 pb nas estirpes da família Lisboa e não-Lisboa, que corresponde à sequência do genoma que flanqueia os genes constituintes da região RD^{rio}, enquanto a estirpe de referência H37Rv apresenta a amplificação de um fragmento de 530pb, relativa à presença do elemento de inserção IS1561 (Figura 16) (Gibson *et al*, 2008).

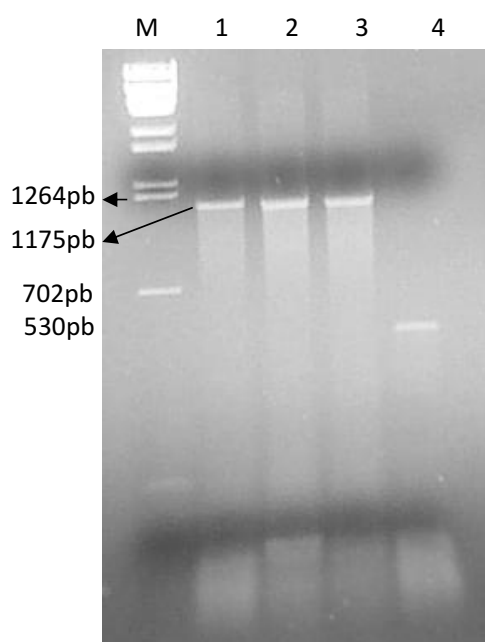


Figura 16: Amplificação da região RD^{rio}, observando-se um fragmento de 1175pb nos isolados 112HPV06 (1), 130HPV06 (2) e 157HPV06 (3), e um fragmento de 530pb na estirpe H37Rv (4), que corresponde à amplificação do elemento de inserção IS1561, sendo este interno à região deletada RD^{rio}. M) marcador de peso molecular λ -BstEII.

A análise sequencial dos fragmentos de 1175pb mostra uma perfeita homologia com as regiões do genoma que flanqueiam o *locus* RD^{rio} (ver em anexo II), o que comprova a ausência desta região nas estirpes da família Lisboa.

4. Discussão

Em Portugal, a maioria das estirpes TB-MR que circulam na Região de Saúde de Lisboa pertence a uma família particular de estirpes geneticamente relacionadas, a família Lisboa, envolvida num surto no final da década de 90 e identificadas por Portugal e colaboradores (Portugal, Covas et al. 1999). Nessa altura, foram analisados 71 isolados de *M. tuberculosis*, provenientes de 14 unidades hospitalares da região de Lisboa, que apresentavam resistência a pelo menos dois antibacilares: INH e RIF, consideradas por isso estirpes TB-MR. A análise das estirpes por RFLP, usando a sonda IS6110, permitiu a identificação de quatro clusters com perfil idêntico de RFLP, partilhando três clusters (cluster A, B e C) um grau de similaridade de cerca de 75%. O cluster predominante – o cluster A, dividido em três subclusters – o qual recebeu posteriormente a designação de família Lisboa, apresentou perfis de RFLP com 90% similaridade entre si, possuindo as estirpes um padrão característico de multirresistência, incluindo para além da resistência à INH e RIF, também à STP e, em alguns casos, ao EMB. As estirpes foram isoladas principalmente em doentes seropositivos para HIV e TD, embora a transmissão tenha sido demonstrada não só entre estes doentes, como em indivíduos imunocompetentes. Estas estirpes, principalmente detectadas na região de Lisboa foram contudo transmitidas a outras regiões do país (Portugal et al, 1998).

Nos últimos anos, tem-se vindo a determinar a diversidade genética dos isolados de *M. tuberculosis* que circulam em Lisboa, de modo a avaliar a prevalência das estirpes da família Lisboa. Em 2001-2002 detectou-se uma prevalência de cerca de 50% dos casos TB-MR, e 56% em 2003, como sendo pertencentes à família Lisboa (Perdigao, Macedo et al. 2008). Os estudos mais recentes (2004-2006) mostram que a prevalência da família entre casos TB-MR é agora de 88% (Macedo, 2007). Estirpes de TB-MR derivaram recentemente para estirpes XDR-TB, representando cerca de 50% das estirpes TB-MR (Perdigao, Macedo et al. 2008). As estirpes XDR-TB estão agrupadas em dois perfis de MIRU-VNTR diferentes, mas relacionados, pertencentes à família Lisboa, e são provavelmente o resultado de mais de 10 anos de circulação de estirpes TB-MR Lisboa. A família Lisboa é uma ameaça ao controlo da TB no país e a sua predominância nos últimos anos sugere que estas estirpes poderão ter vantagens selectivas relativamente a outras.

Com o intuito de definir a origem evolutiva, bem como a identificação de factores que favoreçam a permanência e disseminação das estirpes da família Lisboa em Portugal, procedeu-se ao estudo de deleções genómicas e polimorfismos de um único nucleótido. Para o efeito, de 132 isolados de um hospital central de Lisboa previamente caracterizados por MIRU-VNTR, foram seleccionados três isolados, dois pertencentes à família Lisboa e um não-Lisboa, para análise da presença ou ausência de 14 *loci* RD e região *pks15/1*, anteriormente descritos para outras importantes famílias de *M. tuberculosis*, por Gagneux e colaboradores (Gagneux *et al*, 2006). Foi igualmente estudada a filogenia baseada em polimorfismos sinónimos e não sinónimos (Sreevatsan *et al*, 1997; Filliol *et al*, 2006a), para uma análise mais detalhada do percurso evolutivo das estirpes portuguesas.

A análise filogenética realizada em estirpes *M. tuberculosis* da família Lisboa, baseada nos nsSNP que ocorrem nos codões *katG*⁴⁶³ e *gyrA*⁹⁵, permitiu a classificação das três amostras no PGG2, na sequência da observação de uma substituição nucleotídica no codão 463 do gene *katG*, pertencendo a estirpe de referência H37Rv ao PGG3. De modo a inferir um padrão evolucionário mais aprofundado dentro deste grupo foram analisados nove sSNPs, que no seu conjunto definem dez grupos e subgrupos filogenéticos (Alland *et al*, 2007), tendo sido o padrão de polimorfismo apresentado pelas estirpes Lisboa e pela não-Lisboa correspondente ao *cluster* SCG-5, um dos grupos que apresenta maior diversidade (Filliol *et al*, 2006a). Os SCG não se encontram uniformemente distribuídos, variando a sua predominância consoante a região de origem do paciente ou de colheita dos isolados (Filliol *et al*, 2006a; Gutaker *et al*, 2006). Ao observar a distribuição geográfica de SCG, verifica-se que o *cluster* SCG-5 é maioritariamente predominante no Uganda (África), e co-predominante no México, Texas, Colômbia, Nova York (Continente Americano) e Espanha (Europa) (Filliol *et al*, 2006a; Brimacombe *et al*, 2007; Hazbón *et al*, 2008). Num estudo de Filliol e colaboradores (Filliol *et al*, 2006a), no qual analisaram a distribuição de SCG entre as diferentes famílias definidas pela técnica de tipagem Spoligotyping, concluíram que todos os isolados classificados como SCG-5 pertenciam ao PGG2, tal como as estirpes Lisboa, estando associado a elementos da família LAM (*Latin American and Mediterranean*) definida por Spoligotyping (Vultros *et al*, 2008), tendo sido igualmente identificado como SCG-5 alguns isolados da superfamília T e família Haarlem (H), que possui dois grupos filogenéticos distintos (SGC-3a e SCG-5). Uma vez que a aquisição de nsSNP constitui uma das formas através da qual *M. tuberculosis* adquire resistência a antibacilares, Brimacombe e colaboradores (Brimacombe *et al*, 2007) estudaram os perfis de

resistência a antibacilares e mutações que conferem resistências nos diferentes clusters SCG, mostrando que os SCG-5, SCG-3b e SCG-1 comportam maior número de mutações, possuindo SCG-5 e SCG-1 todas as mutações responsáveis pela aquisição de resistência à INH, um dos fármacos mais potentes no tratamento da infecção por *M. tuberculosis*. Estirpes que possuem elevadas taxas de mutação, designadas *mutator*, têm sido encontradas em populações de bactérias patogênicas, tal como *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella enterica* e *Helicobacter pylori*, sendo este fenótipo resultado de alterações em genes que codificam para enzimas de reparação de DNA e para proteínas que asseguram a eficácia da replicação de DNA (Denamur e Matic, 2006). Alguns estudos revelam uma associação entre estirpes *mutator*, patogenicidade e resistência a antibacilares, ao mostrar que estirpes *mutator* de *E. coli* patogênica têm vantagem adaptativa *in vivo* em modelo de infecção urinária em ratinhos, e a resistência a antibacilares está significativamente aumentada em isolados patogênicos de *Pseudomonas aeruginosa* com fenótipo *mutator*, relativamente às estirpes não-*mutator* (Oliver *et al*, 2000; Labat *et al*, 2005). É de interesse uma análise mais aprofundada, no sentido de averiguar se as estirpes *M. tuberculosis* pertencentes ao grupo SCG-5, tal como as estirpes Lisboa, têm uma maior tendência para fenótipos *mutator*, e se existe uma relação entre o fenótipo *mutator* e mutações em genes de reparação, replicação ou recombinação, que possam estar a elevar a taxa de mutação, aumentando a capacidade de adaptação das estirpes ao meio onde estão inseridas.

Dados obtidos após amplificação de 14 *loci* RD, permitiram observar a ausência de quatro regiões, designadamente TbD1, as regiões *pks15/1*, RD174 e a recém caracterizada RD^{rio}. A região TbD1, cuja deleção define as estirpes modernas de *M. tuberculosis* (Brosch *et al*, 2002), encontra-se ausente em todas as estirpes analisadas, incluindo a estirpe de referência H37Rv. A presença da região TbD1 é característica de estirpes ancestrais, tal como estirpes *M. tuberculosis* pertencentes à família EAI (*East Africa-Indian*), definida por Spoligotyping, com prevalência na Ásia Oriental, Médio Oriente, Ásia Central, e Oceânia, sendo a prevalência mais elevada no Sudeste Asiático (Sun *et al*, 2004; Brudey *et al*, 2006). Em *M. bovis*, o locus TbD1 contém o gene *mmpS6*, e a porção 5' do gene *mmpL6* (*Mycobacterial membrane protein Large*), que codificam proteínas de membrana e proteínas de transporte transmembranar (Garnier *et al*, 2003). O genoma de *M. tuberculosis* contém 13 genes da família MmpL (Cole *et al*, 1998), que codificam para proteínas RND (*resistance-nodulation-cell division*) cuja função consiste em reconhecer e mediar o transporte de uma grande variedade de substâncias, incluindo fármacos anti-tuberculose, através da membrana citoplásmica, funcionando como bombas de efluxo

(Paulsen *et al*, 1996; Putman *et al*, 2000). Apesar de não ser totalmente conhecida a sua função, julga-se que *mmpL6* seja induzida pela INH (Betts *et al*, 2003) e, apesar de não serem associadas funções determinantes relativamente ao transporte ou resistência a fármacos anti-tuberculose por parte destas proteínas (Domenech *et al*, 2005), estudos demonstram que sensivelmente 50% dos isolados com deleção da região TbD1 são resistentes à INH, enquanto que apenas 10% dos isolados que possuem esta região são resistentes (Phyu *et al*, 2005; Stavrum *et al*, 2008). Uma vez que a resistência à INH constitui o primeiro passo para o desenvolvimento de multirresistência, a alteração ou perda de proteínas de transporte membranar pode ter surgido como mecanismo de sobrevivência vantajoso, possibilitando a permanência de estirpes em condições antes adversas.

A observação de uma deleção de 7pb no *locus pks15/1*, sugere um fenótipo de não produção de PGL, uma família de lípidos presente no envelope celular, sendo produzidos por algumas micobactérias de crescimento lento, nomeadamente *M. leprae*, *M. ulcerans* e alguns membros do MTC (Daffé e Laneelle, 1988). O *locus pks15/1*, localizado numa região do genoma que inclui os genes *mas*, *mmpL7* e os genes *ppsA-E*, codifica uma enzima de elongação que participa na biossíntese de PGL, um imunomodulador que está associado ao fenótipo de hipervirulência em modelo animal, incluindo resposta imunológica e pré-inflamatória (Constant *et al*, 2002; Sirakova *et al*, 2003; Reed *et al*, 2004; Tsenova *et al*, 2005). Uma vez que a capacidade de induzir uma forte resposta inflamatória por parte do hospedeiro está relacionada com a virulência das estirpes, verificaram que a perda de PGL induz o aumento da libertação *in vitro* de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL 6 e IL12, enquanto a sua sobreprodução inibe a libertação destes mediadores pró-inflamatórios (Reed *et al*, 2004; Ehrt e Schnappinger, 2007). Assim, a não indução do sistema imunitário do hospedeiro constitui um factor de virulência, sendo característico das estirpes *M. tuberculosis* mais patogénicas. Estudos comparativos de sequências do *locus pks1/15*, demonstraram que a produção de PGL ocorre nas estirpes que possuem 7pb ou 1pb nesta região, tal como sucede nas estirpes *M. tuberculosis* 210 (Beijing) e *M.bovis*, respectivamente. Estirpes que possuam uma deleção de 7pb exibem uma mutação *frameshift* que leva à inactivação do *locus pks15/1*, incapacitando assim a produção de PGL (Constant *et al*, 2002; Chaiprasert *et al*, 2006). É este o caso da estirpe de referência H37Rv, e curiosamente das estirpes da família Lisboa e não-Lisboa. Na incapacidade de produzir PGL, este funciona como atenuador da virulência nas estirpes Lisboa. No entanto, poderá existir nas estirpes Lisboa alguma alteração genómica compensatória, ainda não identificada, que permita a sua elevada

prevalência em comparação com outras famílias de estirpes. A deleção de 7pb no *locus pks15/1* constitui um marcador de estirpes da linhagem Euro-Americana. A linhagem Euro-Americana, que engloba as estirpes pertencentes aos PGG 2 e PGG 3, é a mais frequente nos continentes Europeu e Americano apesar de algumas sublinhagens predominarem em diferentes regiões de África e Médio Oriente (Gagneux *et al*, 2006).

A análise de estirpes da família Lisboa, e não-Lisboa, revela a ausência da região RD174, que define as estirpes da sublinhagem Oeste-Africano de *M. tuberculosis*. Esta região é constituída por seis genes, Rv1992c a Rv1997, codificando os *loci* Rv1992 e Rv1997 as proteínas CtpG e CtpF respectivamente, proteínas de membrana com actividade ATPase, estando envolvidas no movimento transmembranar de metais catiónicos, mecanismos de fosforilação e ligação a Mg^{2+} . O *locus* Rv1994c codifica uma proteína reguladora da transcrição da família MerR (Canneva *et al*, 2005), desconhecendo-se até ao momento a função das proteínas codificadas pelos restantes genes (Cole *et al*, 1998). MerR consiste numa família de activadores transcrpcionais de resposta à presença de iões metálicos no citoplasma bacteriano, com forte selectividade para o ião mercúrio (Hobman *et al*, 2005; Hobman, 2007). Os genes Rv1996 e *ctpF* fazem parte de um programa transcricional que regula o estado de dormência em *M. tuberculosis*, designado regulão de dormência, que ocorre nos estadios mais recentes da infecção, quando exposto a condições de hipóxia e óxido nítrico (NO) na forma de granuloma, durante a resposta imunitária normal por parte do hospedeiro (Park *et al*, 2003; Voskuil *et al*, 2003; Zhang *et al*, 2008). Este sistema, constituído por 48 genes envolvidos na respiração anaeróbica e metabolismo lipídico, é induzido em condições de baixa concentração de NO ou oxigénio, *in vitro*, permitindo a adaptação a um estado de dormência, com estabilização de componentes vitais para a célula bacteriana de forma a prolongar a sobrevivência por extensos períodos de latência. Estes genes são regulados pelo factor de transcrição DosR (*dormancy survival regulator*) codificado pelo *locus* Rv3133c, sendo necessário para indução de uma forte resposta genética para a redução da concentração de oxigénio (Park *et al*, 2003; Voskuil *et al*, 2003). Seis dos genes de regulação da dormência, incluindo Rv1996, contêm um motivo UspA, encontrado também em *E. coli*, envolvido na resistência à radiação UV e mitomicina C (Voskuil *et al*, 2003). Este último é um dado importante na medida em que tem sido referido que micobactérias em estado de dormência induzido por baixa concentração de oxigénio exibem elevada resistência à mitomicina C (Phe *et al*, 2001).

A ausência da região RD174 representa assim uma deleção de dois genes no regulão DosR (Jong *et al*, 2009). Porém, desconhece-se a função individual dos genes constituintes do regulão de dormência, não estando descritas alterações sugestivas de níveis de incapacidade de entrada no estado de dormência das referidas estirpes. Por outro lado, tem sido observado que alterações na indução dos genes de resposta à hipóxia resultam de mutações no gene *dosR*, e não de outros genes individuais (Park *et al*, 2003). Assim, seria de esperar que as estirpes com esta deleção mantivessem a sua capacidade de entrada num estado de latência, promovendo a sobrevivência a longo-tempo de *M. tuberculosis* num estado não replicativo. Contudo, estudos sugerem que a perda de genes associados à latência favoreça uma rápida progressão a TB activa e transmissão (Tsolaki *et al*, 2004). Jong e colaboradores (Jong *et al*, 2008) fizeram um estudo com 12 sublinhagens de *M. tuberculosis* e mostraram que doentes infectados com estirpes da sublinhagem Oeste-Africano de *M. tuberculosis* possuem uma probabilidade acrescida de progressão a TB activa, sendo a segunda linhagem mais provável em que tal possa ocorrer. Uma vez que as estirpes da família Lisboa pertencem a esta sublinhagem, é possível que este fenómeno possa ocorrer nas estirpes da família Lisboa, contribuindo para o aumento da sua transmissão e disseminação na comunidade.

Recentemente foi descrito no Rio de Janeiro, Brasil, um polimorfismo de longa sequência denominado RD^{rio}, ausente nas estirpes *M. tuberculosis* predominantes da região, igualmente caracterizadas pela deleção da região RD174 (Lazzarini *et al*, 2007; Gibson *et al*, 2008). No presente estudo, a análise sequencial das estirpes Lisboa e da estirpe não-Lisboa evidencia a ausência do locus RD^{rio}, consistindo este numa sequência de 26,317 kb de DNA contíguo, a mais longa deleção identificada em estirpes *M. tuberculosis* até ao momento. Na formação deste polimorfismo, cujo mecanismo consiste na recombinação homóloga entre os genes que flanqueiam a região, resultando num evento de duplo *crossover* com excisão e perda do segmento genómico interveniente, foram removidos oito genes (Rv3347c a Rv3354) e outros dois foram modificados (Lazzarini *et al*, 2007). Os genes Rv3346c e Rv3355c, que flanqueiam a região deletada, ao sofrer recombinação homóloga originaram um gene quimérico Rv3346/55c, que consiste na sequência 5' do gene Rv3346c, continuando numa fusão da região central de perfeita homologia, e terminando na porção 3' do gene Rv3355c (Lazzarini *et al*, 2007).

Entre os genes deletados, encontram-se os genes Rv3352c e Rv3353c que codificam oxidoredutases (Deshayes *et al*, 2008); os genes Rv3348 e Rv3349c codificam transposases envolvidas na transposição dos elementos IS1608 e IS1561, respectivamente; os genes Rv3347c e Rv3350c codificam as proteínas PPE55 e PPE56 respectivamente, entre outros com função ainda desconhecida.

O genoma de *M. tuberculosis* codifica cerca de 69 membros da família PPE (*Proline-Proline-Glutamic acid*), que contém uma sequência N-terminal conservada com 180 aminoácidos, seguida de uma sequência C-terminal variável, que distingue as proteínas em quatro subfamílias (Cole *et al*, 1998; van Pittius *et al*, 2006). As proteínas da família PPE são expressas na superfície extracelular e, apesar da semelhança entre si, pelo facto de apresentarem grande variabilidade são consideradas potenciais antigénios para o hospedeiro imunitário (Cole *et al*, 1998; Cole, 2002; Fleischmann *et al*, 2002). Um dos mecanismos desta variação reside na alteração da sequência dos genes que codificam para proteínas PPE, tendo sido demonstrado que a frequência de substituições sinónimas e não-sinónimas é consideravelmente elevada nos genes da família PE/PPE, quando comparada com outras famílias de genes (Fleischmann *et al*, 2002). Eventos de recombinação homóloga são igualmente sugeridos como mecanismos efectivos que contribuem para a diversidade antigénica na resposta imunitária do hospedeiro, permitindo novos determinantes de virulência (Karboul *et al*, 2008). Tem sido referido que alguns genes PPE se encontram independentemente modificados ou deletados, em várias espécies do complexo e linhagens *M. tuberculosis*, sendo disto exemplo a perda de PPE55 e PPE56 nas estirpes *M. microti* e *M. pinnipedii*, e o elevado grau de polimorfismo apresentado por PPE55 em estirpes *M. canettii* (Huard *et al*, 2006).

A função das proteínas PPE55 e PPE56 está ainda por determinar, porém é conhecida a sua indução *in vivo* em modelo ratinho TB e *in vitro*, 24 horas após a infecção, quando as micobactérias são fagocitadas por macrófagos activados (Talaat *et al*, 2004; Voskuil *et al*, 2004). As proteínas PPE55 e PPE56 pertencem à subfamília MPTR da família de proteínas PPE de *M. tuberculosis* (van Pittius *et al*, 2006), possuindo a porção C-terminal de PPE55, uma região de 2977 aminoácidos, 67% de homologia com a mesma região em PPE56. A porção C-terminal da proteína PPE55 é muito imunogénica, tendo sido detectada a sua expressão durante as fases incipiente e subclínica da infecção por *M. tuberculosis*, em soro de indivíduos com TB, seronegativos para HIV (97%), e 71% dos casos de co-infecção HIV/TB, sendo que os dados

sugerem uma relação entre a expressão *in vivo* desta proteína com a infecção activa por *M. tuberculosis* (Singh *et al*, 2005). Sendo as proteínas PPE55 e PPE56 expressas durante a fase subclínica da infecção, que corresponde à replicação activa do microorganismo sem manifestação clínica de TB, participam nos primeiros contactos entre o microorganismo e hospedeiro imunitário. Na ausência destas proteínas, o reconhecimento do microorganismo por parte do sistema imunitário do hospedeiro pode estar dificultado, não havendo uma resposta imunitária eficaz, sendo possível o desenvolvimento de manifestações clínicas mais severas.

De facto, estudos que focam a patogenicidade e virulência das estirpes RD^{rio} sugerem que indivíduos infectados com esta estirpe possuem uma forma mais severa de TB, sendo característica a elevada frequência de hemoptises, associada a uma maior perda de peso e aumento da concentração bacilar em expectoração (Lazzarini *et al*, 2007). São vários os estudos que têm demonstrado que pacientes com elevada concentração bacilar em expectoração estão associados a TB pulmonar cavitária (Gomes *et al*, 2003; Matsuola *et al*, 2004; Palaci *et al*, 2007), tendo sido recentemente realçado que a probabilidade de desenvolver doença cavitária é oito vezes superior em indivíduos infectados com RD^{rio} do que indivíduos infectados com estirpes não-RD^{rio} (Lazzarini *et al*, 2008). A presença de TB cavitária parece aumentar o risco de recidiva e desenvolvimento de resistência a fármacos, assumindo também um efeito significativo no perfil de antigénios que são reconhecidos pelos anticorpos (o número de antigénios reconhecidos é superior em pacientes com TB cavitária do que pacientes com TB não-cavitária) (Samanich *et al*, 2001; Lazzarini *et al*, 2008). Por outro lado, na medida em que a elevada contagem de unidades formadoras de colónias (CFU) é um indicador de multiplicação bacteriana acelerada, *in vivo*, pode aumentar a transmissão visto que casos de baciloscopia positiva constituem as fontes mais potentes de infecção na comunidade (Liippo *et al*, 1993).

Relativamente à disseminação deste novo genótipo, estudos revelam que as estirpes RD^{rio} não se encontram restritas ao Brasil, circulando actualmente a nível mundial, havendo sido identificados isolados RD^{rio} em quatro dos cinco continentes (Lazzarini *et al*, 2007; Gibson *et al*, 2008). Além da sua identificação nos estados Rio de Janeiro e Minas Gerais, Brasil, foram encontradas estirpes RD^{rio} no Equador, Guiana Francesa, países Sul Americanos e Estados Unidos. Foram também encontrados isolados nas ilhas das Caraíbas (Guadeloupe, Haiti e Martinique), Sul de África e República do Djibouti e também na Europa, em Espanha e Holanda. Os resultados mostram claramente que as estirpes *M. tuberculosis* RD^{rio} estão globalmente disseminadas (Gibson *et al*, 2008), sendo Portugal o terceiro país europeu a detectar estirpes com genótipo RD^{rio}, nomeadamente as estirpes da família Lisboa. A associação do fenótipo RD^{rio} às estirpes Lisboa pode contribuir para o seu sucesso, ao conseguir iludir o sistema imunitário do hospedeiro, e provavelmente aumentar a sua capacidade de transmissão e disseminação na comunidade.

Os dados obtidos no presente estudo apoiam as classificações filogenéticas propostas para a evolução dos membros do MTC, apresentadas por vários investigadores (Sreevatsan *et al*, 1997; Filliol *et al*, 2006a; Gagneux *et al*, 2006), nas quais todos os descendentes do complexo derivam de um ancestral comum. Analisando conjuntamente as regiões deletadas, e os possíveis efeitos fenotípicos que assumem, observa-se um conjunto de características que podem conduzir ao sucesso das estirpes Lisboa em detrimento de outras: 1) a ausência de proteínas de superfície que dificultam o reconhecimento por parte do hospedeiro, levando a uma menor eficácia do sistema imunitário na contenção da infecção, associada ao facto de 2) estarem também ausentes proteínas de indução do estado de dormência, que podem levar a uma maior propensão para desenvolver TB activa, e 3) uma possível associação das estirpes Lisboa com o fenótipo *mutator*, que permite elevada taxa de mutação e melhor capacidade de adaptação a condições desfavoráveis, nomeadamente à presença de fármacos antibacilares. Estes factores podem estar a contribuir para o aumento da capacidade de adaptação a condições adversas, transmissão e disseminação das estirpes Lisboa na comunidade. Normalmente, uma família de estirpes é caracterizada por uma das técnicas aceite de tipagem, quando apresenta mais de 90% de similaridade. No entanto, as estipes do *cluster* C1, que apresentam um perfil de *MIRU-VNTR* com 85% de similaridade com a família Lisboa, possuem o mesmo padrão de deleções das estirpes Lisboa. Isto leva a pensar que estas estipes podem ter uma origem comum e ter derivado em famílias distintas, e por isso partilharem as regiões analisadas. Por outro lado, poderão existir

outros factores, presentes apenas nas estirpes Lisboa, que conferem vantagem adaptativa e permitem maior prevalência em detrimento de outras estirpes.

Sendo as estirpes da família Lisboa associadas quase exclusivamente a TB-MR e XDR-TB, considera-se importante a realização de mais estudos, mais alargados, incluindo outras famílias de estirpes não-Lisboa, e outras mais afastadas geneticamente, que permitam não só identificar factores que possam contribuir para a sua virulência e transmissão, mas também explicar a vantagem selectiva das estirpes Lisboa em Portugal.

Uma vez que as estirpes Lisboa carecem de duas proteínas de superfície que interagem com o hospedeiro humano nas fases mais recentes da infecção, PPE55 e PPE56, sugere-se o estudo dessas mesmas proteínas, através da criação de estirpes mutantes e inoculação de ratinhos, de forma a averiguar a influência da expressão e não-expressão de PPE55 e PPE56, associando também com a evolução da infecção e manifestações clínicas de TB. Igualmente importante seria o estudo de factores a nível do hospedeiro que possam constituir condições favoráveis ao desenvolvimento da infecção, bem como estudos de *fitness* que permitam analisar a capacidade de crescimento destas estirpes *M. tuberculosis* e, estabelecendo comparação com estirpes de outras famílias, identificar possíveis factores bacterianos que possam conferir vantagem adaptativa às estirpes da família Lisboa, aumentando a capacidade de sobrevivência, replicação e infecção destas estirpes, aumentando a probabilidade de transmissão à comunidade. Todos estes estudos deverão ter em conta o estudo de dados clínicos de indivíduos infectados com estirpes *M. tuberculosis* da família Lisboa, com o objectivo de estabelecer uma possível correlação entre genótipo e a forma clínica de TB apresentada por estes doentes, analisando a severidade e duração dos sintomas, bem como a eficácia das medidas terapêuticas.

5. Referências Bibliográficas

- Alland, D., Lacher, D. W., Hazbón, M. H., Motiwala, A. S., Qi, W., Fleischmann, R. D., and Whittam, T. S. 2007. Role of Large Sequence Polymorphisms (LSPs) in Generating Genomic Diversity among Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and the Utility of LSPs in Phylogenetic Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 45: 39-46.
- Antunes, M. L., Aleixo-Dias, J., Antunes, A. F., Pereira, M. F., Raymundo and E., Rodrigues, M. F. 2000. Anti-Tuberculosis Drug Resistance In Portugal. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 4(3): 223-231.
- Arentz, M., and Hawn, T.R. 2007. Tuberculosis Infection: Insight from Immunogenomics. *Drug Discovery Today Disease Mechanisms* 4(4): 231-236.
- Baker, L., Brown, T., Maiden, M. C., and Drobniewski, F. 2004. Silent nucleotide polymorphisms and a phylogeny for *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Infectious Diseases* 10: 1568-1577.
- Beggs, M. L., Eisenach, K.D., and Cave, M.D. 2000. Mapping of IS6110 Insertion sites in Two Epidemic Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 38(8): 2923-2928.
- Behr, M. A., Wilson, M.A., Gill, W.P., Salamon, H., Schoolnik, G.K., Rane, S., Small, P.M. 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 284(54199): 1520-1523.
- Betts, J. C., Lukey, P.T., Robb, L.C., McAdam, R.A., and Duncan, K. 2002. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Molecular Microbiology* 43: 717-731.
- Birkness, K. A., Guarner, J., Sable, S., Tripp, R.A., Kellar, K.L., Bartlett, J., and Quinn, F.D. 2007. An in vitro model of the leukocyte interactions associated with granuloma formation in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology and Cell Biology* 85: 160-168.
- Blaser, M. J., and Kirschner, D. 2007. The equilibria that allow bacterial persistence in human host. *Nature* 449: 843-849.

- Brimacombe, M., Hazbon, M., Motiwala, A.S., and Alland, D. 2007. Antibiotic Resistance and Single-Nucleotide Polymorphism Cluster Grouping Type in a Multinational Sample of Resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51(11): 4157-4159.
- Brosch, R., S. V. Gordon, M. Marmiesse, P. Brodin, C. Buchrieser, K. Eiglmeier, T. Garnier, C. Gutierrez, G. Hewinson, K. Kremer, L. M. Parsons, A. S. Pym, S. Samper, D. van Soolingen, and S. T. Cole. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PNAS USA* 99: 3684-3689.
- Brudey, K., Gutierrez, M.C., Vincent, V., Parsons, L.M., Salfinger, M., Rastogi, N., and Sola, C. 2004. *Mycobacterium africanum* Genotyping Using Novel Spacer oligonucleotides in the Direct Repeat Locus. *Journal of Clinical Microbiology* 42(11): 5053-5057.
- Brudey, K., Driscoll, J.R., Rigouts, L., Prodinger, W.M., Gori, A., Al-Hajjaj, S.A., Allix, C., Liselotte Aristimuño, L., Arora, J., Baumanis, V., Binder, L., Cafrune, P., Cataldi, A., Cheong, S., Diel, R., Ellermeier, C., Evans, J.T., Fauville-Dufaux, M., Ferdinand, S., de Viedma, D.G., Garzelli, C., Gazzola, L., Gomes, H.M., M Cristina Gutierrez, M.C., Hawkey, P.M. et al. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for Classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiology* 6: 23.
- Canneva, F., Branzoni, M., Riccardi, G., Provvedi, R., and Milano, A., 2005. Rv2358 and FurB: Two Transcriptional Regulators from *Mycobacterium tuberculosis* Which Respond to Zinc. *Journal of Bacteriology* 187(16): 5837-5840.
- Chaiprasert, A., Yorsangsukkamol, J., Prammananan, T., Palittapongarnpim, P., Leechawengwong, M., and Dhiraputra, C. 2006. Intact *pks15/1* in Non-W-Beijing *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *Emerging Infectious Diseases* 12(5): 772-774.
- Chan, X., Xing, Y., Magliozzo, R.S., and Bloom, B.R. 1992. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated macrophages. *Journal of Experimental Medicine* 175: 1111-1122.
- Cole, S. T. 2002. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology* 148: 2919-2928.

- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry III, C.E., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., S. Holroyd, Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.-A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S. and B. G. Barrell 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature 393: 537–544.
- Constant, C. A., Ferreira, P. B., Valadas, E., e Antunes, E. 2004. Tuberculose Multirresistente. Acta Médica Portuguesa. 17: 157-166.
- Constant, P., Perez, E., Malaga, W., Lanéelle, M.A., Saurel, O., Daffé, M., and Guilhot, C. 2002. Role of the *pks15/1* gene in the biosynthesis of phenolglycolipids in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Journal of Biological Chemistry 277: 38148-58.
- Cowan, L. S., Mosher, L., Diem, L., Massey, J.P., and Crawford, J.T. 2002. Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates with Low Copy Numbers of IS6110 by Using Mycobacterial Interspersed Repetitive Units. Journal of Clinical Microbiology 40(5): 1592-1602.
- Daffé, M., Laneelle, M.A. 1988. Distribution of Phthiocerol Diester, Phenolic Mycosides and Related Compounds in Mycobacteria. Journal of General Microbiology 134: 2049-2055.
- David, H., Brum, L., Prieto, E. 1994. Manual de micobacteriologia em Saúde Pública: princípios e métodos. Instituto de Medicina Tropical, Lisboa.
- Deshayes, C., Perrodou, E., Euphrasie, D., Frapy, E., Poch, O., Bifani, P., Lecompte, O., and Reyrat, J.M 2008. Detecting the molecular scars of evolution in the *Mycobacterium tuberculosis* complex by analyzing interrupted coding sequences. BMC Evolutionary Biology 8: 78.
- DGS. 2007. Tuberculose: Ponto da Situação em Portugal em 2006, dados preliminares em Março de 2007. Direcção Geral de Saúde, Divisão de Doenças Transmissíveis [available at <http://www.dgs.pt>]

- DGS. 2009. Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose, Situação epidemiológica da tuberculose e resultados em Dezembro de 2008 Direcção Geral de Saúde, Divisão de Doenças Transmissíveis [available at <http://www.dgs.pt>]
- Domenech, P., Reed, M.B., and Barry, C.E. 2005. Contribution of the *Mycobacterium tuberculosis* MmpL Protein Family to Virulence and Drug Resistance. *Infection and Immunity*. 73(6): 3492-3501.
- Ehrt, S., Schnappinger, D. 2007. *Mycobacterium tuberculosis* virulence: lipids inside and out. *Nature Medicine* 13(3): 284-285.
- Ernst, J. D., Trevejo-Nuñez, G., and Banaiee, N. 2007. Genomics and the evolution, pathogenesis, and diagnosis of tuberculosis. *Journal of Clinical Investigation* 117: 1738-1745.
- Filliol, I., Motiwala, A.S., Cavatore, M., Qi, W., Hazbon, M.H., del Valle, M.B., Fyfe, J., Garcia-Garcia, L., Rastogi, N., Sola, C., Zozio, T., Guerrero, M.I., Leon, C.I., Crabtree, J., Angiuoli, S., Eisenach, K.D., Durmaz, R., Joloba, M.L., Rendon, A., Sifuentes-Osornio, J., Ponce de Leon, A., Cave, M.D., Fleishmann, R., Whittam, T.S., and Alland, D. 2006. Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. *Journal of Bacteriology* 188: 759-772.
- Filliol, I., A. S. Motiwala, M. Cavatore, W. Qi, M. Hernando Hazbon, M. Bobadilla Del Valle, J. Fyfe, L. Garcia-Garcia, N. Rastogi, C. Sola, T. Zozio, M. I. Guerrero, C. I. Leon, J. Crabtree, S. Angiuoli, K. D. Eisenach, R. Durmaz, M. L. Joloba, A. Rendon, J. Sifuentes-Osornio, A. Ponce de Leon, Cave, M.D., Fleishmann, R., Whittam, T.S., e Alland, D. 2006. Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. *Journal of Bacteriology* 188(8): 3162-3163.

- Fleischmann, R. D., D. Alland, J. A. Eisen, L. Carpenter, O. White, J. Peterson, R. DeBoy, R. Dodson, M. Gwinn, D. Haft, E. Hickey, J. F. Kolonay, W. C. Nelson, L. A. Umayam, M. Ermolaeva, S. L. Salzberg, A. Delcher, T. Utterback, J. Weidman, H. Khouri, J. Gill, A. Mikula, W. Bishai, W. R. Jacobs, Jr., J. C. Venter, and C. M. Fraser. 2002. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *Journal of Bacteriology* 184: 5479-5490.
- Fleming, M. F., Krupitsky, E., Tsoy, M., Zvartau, E., Brazhenko, N., Jakubowiak, W., and McCaul, M. E. 2006. Alcohol and drug use disorders, HIV status and drug resistance in a sample of Russian TB patients. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 10(5): 565-570.
- Flynn, J. L., and Chan, J. 2001. Tuberculosis: latency and reactivation. *Infection and Immunity* 69: 4195-4201.
- Gagneux, S., K. DeRiemer, T. Van, M. Kato-Maeda, B. C. de Jong, S. Narayanan, M. Nicol, S. Niemann, K. Kremer, M. C. Gutierrez, M. Hilty, P. C. Hopewell, and P. M. Small. 2006. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *PNAS USA* 103: 2869-2873.
- Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J.C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., Duthoy, S., Grondin, S., Lacroix, C., Monsempe, C., Simon, S., Barbara Harris, B., Atkin, R., Doggett, J., Mayes, R., Keating, L., Wheeler, P.R., Parkhill, J., Barrell, B.G., Cole, S.T., Stephen V. Gordon, S.V., and Hewinson, R.G. 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *PNAS* 100(13): 7877-7882.
- Gibson, A. L., Huard, R.C., van Pittius, N.C.G., Lazzarini, C.O., Driscoll, J., Kurepina, N., Zozio, T., Sola, C., Spinola, S.M., Kritski, A.L., Fitzgerald, D., Kremer, K., Mardassi, H., Chitale, P., Brinkworth, J., Viedma, D.G., Gicquel, B., Pape, J.W., van Soolingen, D., Kreiswirth, B.N., Warren, R.M., van Helden, P.D., Rastogi, N., Suffys, P.N., Silva, J.L., and Ho, J.L. 2008. Application of Sensitive and Specific Molecular Methods To Uncover Global Dissemination of the Major RD^{Rio} Sublineage of the Latin American-Mediterranean *Mycobacterium tuberculosis* Spoligotype Family. *Journal of Clinical Microbiology* 46(4): 1259-1267.

- Ginsburg, A. S., Sun, R., Calamita, H., Scott, C.P., Bishai, W.R., and Grosset, J.H. 2005. Emergence of Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* during continuously dosed moxifloxacin monotherapy in a mouse model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(9): 3977-3979.
- Gomes, M., Saad Junior, R., and Stirbulov, R. 2003. Pulmonary tuberculosis: relationship between sputum bacilloscopy and radiological lesions. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 45: 275-281.
- Gordon, S. V., Brosch, R., Billault, A., Garnier, T., Eiglmeier, K., and Cole, S.T. 1999. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Molecular Microbiology* 32(3): 643-655.
- Gutacker, M. M., Smoot, J.C., Migliaccio, C.A., Ricklefs, S.M., Hua, S., Cousins, D.V., Graviss, E.A., Shashkina, E., Kreiswirth, B.N., and Musser, J.M. 2002. Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. *Genetics* 162: 1533-1543.
- Gutacker, M. M., Mathema, B., Soini, H., Shashkina, E., Kreiswirth, B. N., Graviss, E. A., and Musser, J. M. 2006. Single-nucleotide polymorphism based population genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from 4 geographic sites. *Journal of Infectious Diseases* 193: 121-128.
- Hannah, M. M., Peres, H., Maltez, F., Hayward, A.C., Machado, J., Morgado, A., Proenca, R., Nelson, M.R., Bico, J., Young, D.B., Gazzard, B.S. 2001. Investigation and control of a large outbreak of multi-drug resistant tuberculosis at a central Lisbon hospital. *Journal of Hospital Infection* 47: 91-97.
- Hazbón, M. H., Motiwala, A.S., Cavatore, M., Bimacombe, M., Whittam, T.S., and Alland, D. 2008. Convergent Evolutionary Analysis Identifies significant Mutations in drug Resistance Targets of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(9): 3369-3376.

- Henderson, R. A., Watkins, S.C., and Flynn, J.L. 1997. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Immunology* 159: 635-643.
- Hersheberg, R., Lipatov, M., Small, P.M., Sheffer, H., Niemann, S., Homolka, S., Roach, J.C., Kremer, K., Petrov, D.A., Feldman, M.W., Gagneux, S. 2008. High Functional Diversity in *Mycobacterium tuberculosis* Driven by Genetic Drift and Human Demography. *PloS Biology* 6(12): 2658-2670.
- Hirsh, A. E., Tsolaki, A.G., DeRemier, K., Feldman, M.W., and Small, P.M. 2004. Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations. *PNAS* 101(14): 4871-1876.
- Hobman, L. J., Wilkie, J., Brown, N. L. 2005. A design for life: prokaryotic metal-binding MerR family regulators. *BioMetals* 18: 429-436.
- Hobman, L. J. 2007. MerR family transcription activators: similar designs, different specificities. *Molecular Microbiology* 63(5): 1275-1278.
- Huard, R. C., Fabre, M., de Haas, P., Lazzarini, L. C. O., van Soolingen, D., Cousins, D., and L. Ho, J. 2006. Novel genetic Polymorphisms that Further Delineate the Phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Journal of Bacteriology* 188: 4271-4287.
- Jong, B. C., Hill, P.C., Aiken, A., Awine, T., Antonio, M., Adetifa, I.M., Jackson-Sillah, D.J., Fox, A., DeRiemer, K., Gagneux, S., Borgdorff, M.W., McAdam, P.W.J., Corrah, T., Small, P.M., and Adegbola, R.A. 2008. Progression to active tuberculosis, but not transmission, varies by *M. tuberculosis* lineage in The Gambia. *Journal of Infectious Disease* 198(7): 1037–1043.
- Jong, B. C., Antonio, M., Awine, T., Ogungbemi, K., Jong, Y. P., Gagneux, S., DeRiemer, K., Zozio, T., Rastogi, N., Borgdorff, M., Hill, P. C., and Adegbola, R. A. 2009. Use of Spoligotyping and Large Sequence Polymorphisms To Study the Population Structure of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in a Cohort Study of Consecutive Smear-Positive Tuberculosis Cases in the Gambia. *Journal of Clinical Microbiology* 47(4): 994-1001.

- Karboul, A., Mazza, A., van Pittius, N.C.G., Ho, J.L., Brousseau, R., and Mardassi, H. 2008. Frequent Homologous Recombination Events in *Mycobacterium tuberculosis* PE/PPE Multigene Families: Potencial Role in Antigenic Variability. *Journal of Bacteriology* 190(23): 7838-7846.
- Kaufmann, H. E., and McMichael, A. 2005. Annuling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nature Medicine* 11(4 Suppl): S33-44.
- Keizer, S. T., Langendam, M.M.W., van Deutekon, H., Coutinho, R.A., van Ameijden, E.D.C. 2000. How does TB relate to HIV positive and HIV negative drug users? *Journal of Epidemiology and Community Health* 54: 64-68.
- Kong, I., Cave, M. D., Zhang, L., Foxman, B., Marrs, C. F., Bates, J. H., and Yang, Z. H. 2006. Population-Based Study of Deletions in Five Different Genomic Regions of *Mycobacterium tuberculosis* and Possible Clinical Relevance of the Deletions. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 3940-3946.
- Krishnan, M. Y., Radhakrishnan, I., Joseph, B.V., GK, M.L., KumarR, A., and Mundayoor, S. 2007. Combined use of Amplified Fragment Length Polymorphism and IS6110-RFLP in fingerprinting clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Kerala, South India. *BMC Infectious Disease* 7: 86.
- Lazzarini, L. C. O., Huard, R. C., Boechat, N. L., Gomes, H. M., Oelemann, M. C., Kurepina, N., Shashkina, E., Mello, F. C. Q., Gibson, A. L., Virginio, M. J., Marsico, A. G., Butler, W. R., Kreiswirth, B. N., Suffys, P. N., Silva, J.R. L., and Ho, J. L. 2007. Discovery of a Novel *Mycobacterium tuberculosis* Lineage That Is a Major Cause of Tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 45: 3891-3902.
- Lazzarini, L. C. O., Spinola, S. M., Bang, H., Gibson, A. L., Weisenberg, S., Carvalho, W. S., Augusto, C. J., Huard, R. C., Kritski, A. L., Ho, J. L. 2008. RD^{rio} *Mycobacterium tuberculosis* Infection Is Associated with a Higher Frequency of Cavitory Pulmonary Disease. *Journal of Clinical Microbiology* 46(7): 2175-2183.
- Liippo, K. K., Kumala, K., Tala, E.O.J. 1993. Focusing tuberculosis contact tracing by smear grading of index cases. *American Review of Respiratory Disease* 148: 235-6.

- López, B., Aguilar, D., Orozco, H., Burger, M., Espitias, C., Ritacco, V., Barrera, L., Kremer, K., Hernandez-Pando, R., Huygen, K., and van Soolingen, D. 2003. A marked difference in pathogenesis and immune responses induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clinical and Experimental Immunology* 133: 30-37.
- Macedo, R. 2007. Tuberculose na Grande Lisboa, análise molecular de estirpes *Mycobacterium tuberculosis*. Tese de Mestrado. Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina de Lisboa
- MacMicking, J. D., North, R.J., LaCourse, R., Mudgett, J.S., Shah, S.K., and Nathan, C.F. 1997. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *PNAS USA* 94: 5243-5248.
- Mathema, B., Kurepina, N. E., Bifani, P. J., and Kreiswirth, B. N. 2006. Molecular Epidemiology of Tuberculosis: Current Insights. *Clinical Microbiology Reviews* 19: 658-685.
- Matsuola, S., Uchiyama, K., Shima, H., Suzuki, K., Shimura, A., Sasaki, Y., and Yamagishi, F. 2004. Relationship between CT findings of pulmonary tuberculosis and the number of acid-fast bacilli on sputum smears. *Clinical Imaging* 28: 119-123.
- Mazzaccaro, R. J., Gedde, M., Jensen, E.R., van Santen, H.M., Ploegh, H.L., Rock, K.L., and Bloom, B.R. 1996. Major histocompatibility class I of soluble antigen facilitated by *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PNAS USA* 93: 11786-11791.
- Means, T. K., Wang, S., Lien, E., Yoshimura, A., Golenbock, D.T., and Fenton, M.J. 1999. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Immunology* 163: 3920-3927.
- Möbius, P., Luyven, G., Hotzel, H., and Köhler, H. 2008. High Genetic Diversity among *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis Strains from German Cattle Herds Shown by Combinatios of IS900 Restrictions Fragment Length Polymorphism Analysis and Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variabe-Nmber Tandem-repeat Typing. *Journal of Clinical Microbiology* 46(3): 972-981.

- Mohan, V. P., Scanga, C.A., Yu, K., Scott, H.M., Tanaka, E.K., Tsang, E., Tsai, M.C., Flynn, J.L., and Chan, J. 2001. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistence tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infection and Immunity* 69: 1847-1855.
- Mostowy, S., Cousins, D., Brinkman, J., Aranaz, A., and Behr, M-A. 2002. Genomic deletions suggest a phylogeny for *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Infectious Diseases* 186: 74-80.
- Murray, P. R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A. 2005. *Medical Microbiology*, 5th ed, pp: 297-310, Elsevier, Berlin.
- Palaci, M., Dietze, R., Hadad, D. J., Ribeiro, F.K.C., Peres, R. L., Vinhas, S. A., Maciel, E.L.N., Dettoni, V.V., Horter, L., Boom, W.H., Johnson, J.L., and Eisenach, K.D. 2007. Cavitory Disease and Quantitative sputum bacillary Load in Cases of Pulmonary Tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 45(12): 4064-4066.
- Park, H. D., Guinn, K. M., Harrell, M. I., Liao, R., Voskuil, M. I., Tompa, M., Schoolnik, G. K., and Sherman, D. R. 2003. Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology* 48(3): 833-843.
- Park, S. H., and Bendelac, A. 2000. CD1-restricted T-cell responses and microbial infection. *Nature* 406: 788-792.
- Parsons, L. M., Brosch, R., Cole, S. T., Somoskövi, A., Loder, A., Bretzel, G., van Soolingen, D., Hale, Y. M., and Salfinger, M. 2002. Rapid and Simple Approach for Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates by PCR-Based Genomic Deletion Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 40(7): 2339-2345.
- Paulsen, I. T., Brown, M.H., and Skurray, R.A. 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiology Reviews* 60: 575-608.
- Perdigão, J., Macedo, R., João, I., Fernandes, E., Brum, L., Portugal, I. 2008. Multidrug-resistant tuberculosis in Lisbon, Portugal: a molecular epidemiological perspective. *Microbiology Drug Resistance* 14(2): 133-43.

- Perdigão, J., C. Milho, Carrilho, L., Brum, L., Portugal, I. 2009. Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a Lisbon hospital in Portugal. *Revista Portuguesa de Pneumologia* 15(5): 761-9.
- Phe, H. L., Toh, A., Murugasu-Oei, B., Dick, T. 2001. In vitro Activities of Mitomycin C against Growing and Hypoxic Dormant Tubercle bacilli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45(8): 2403-2404.
- Phyu, S., Lwin, T., Ti, T., Maung, W., Mar, W.W., Shein, S.S., and Grewal, H.M.S. 2005. Drug-resistant tuberculosis in Yangon, Myanmar. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 37(11): 846-851.
- Portugal, I., Brum, L., Viveiros, M., Pereira, J.M., David, H. 1998. Tipificação genética de estirpes multirresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas na região de Lisboa. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*: 54-59.
- Portugal, I., Covas, M.J., Brum, L., Viveiros, M., Ferrinho, P., Moniz-Pereira, J., David, H. 1999. Outbreak of multiple drug-resistant tuberculosis in Lisbon: detection by restriction fragment length polymorphism analysis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 3: 207-213.
- Portugal, I., Barreiro, L., Vultos, T., Macedo, R., Furtado, C., Antunes, A. F., Brum, L. 2007. Epidemiologia Molecular de *Mycobacterium tuberculosis* em Lisboa. *Revista Portuguesa de Pneumologia* XIV(2): 239-259.
- Prescott, L. M., Harley, J.P., and Klein, D.A., 2005. *Microbiology*. 6th ed. 3:521-528, McGraw-Hill.
- Putman, M., van Veen, H.W., and Konings, W.N. 2000. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 672-693.
- Rao, K. R., Kauser, F., Srinivas, S., Zaneti, S., Sechi, L. A., Ahmed, N., and Hasnain, S. E. 2005. Analysis of Genomic Downsizing on the Basis of Region-of-Difference Polymorphisms Profiling of *Mycobacterium tuberculosis* Patient Isolates Reveals Geographic Partitioning. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 5978-5982.

- Reed, M. B., Domenech, P., Manca, C., Su, H., Barczak, A.K., Kreiswirth, B.N., Kaplan, G., and Barry III, C.E. 2004. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature* 431: 84-7.
- European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional and Office for Europe. 2009. Tuberculosis surveillance in Europe 2007. European Centre for Disease Prevention and Control
- Rieder, H. L., 1ª Ed. 2001. Bases Epidemiológicas do Controlo da tuberculose, Direcção-Geral de Saúde.
- Robbins, S. L., Cotran, R. S., Kumar, V., and Collins, T., 6ª Edição. 2001. Fundamentos de Patologia Estrutural e Funcional. Guanabara Koogan.
- Russell, D. G. 2001. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2: 569-586.
- Salo, W. L., Aufderheide, A.C., Buikstrat, J., and Holcomb, T.D. 1994. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Microbiology* 91: 2091-2094.
- Samanich, K., Belisle, J. T., and Laal, S. 2001. Homogeneity of Antibody Responses in Tuberculous Patients. *Infection and Immunity* 69: 4600-4609.
- Saunders, B., and Britton, W.J. 2007. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunology and Cell Biology* 85: 103-111.
- Schlesinger, L. S. 1993. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *Journal of Immunology* 150: 2920-2930.
- Singh, K. K., Dong, Y., Patibandla, S. A., McMurray, D. N., Arora, V. K., and Laal, S. 2005. Immunogenicity of the *Mycobacterium tuberculosis* PPE55 (Rv3347c) Protein during Incipient and Clinical Tuberculosis. *Infection and Immunity* 73(8): 5004-5014.
- Sirakova, T. D., Dubey, V. S., Cynamon, M. H., and Kolattukudy, P. E. 2003. Attenuation of *Mycobacterium tuberculosis* by Disruption of a mas-Like Gene or a Chalcone Synthase-Like Gene, Which Causes Deficiency in Dimycocerosyl Phthiocerol Synthesis. *Journal of Bacteriology* 185(10): 2999-3008.

- Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K. E., Connel, N. D., Kreiswirth, B. N., Whittam, T. S., and Musser, J. M. 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. PNAS USA 94: 9869-9874.
- Stavrum, R., Valvatne, H., BØ, T.H., Jonassen, I., Hinds, J., Butcher, P.D., Grewal, H.M.S. 2008. Genomic Diversity among Beijing and non-Beijing *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Myanmar. PLoS ONE 3(4): e1973.
- Sun, Y. J., Bellamy, R., Lee, S.G., Ng, S.T., Ravindran, S., Wong, S.Y., Locht, C., Suplly, P., and Paton, N.I. 2004. Use of Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing to Examine Genetic Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. Journal of Clinical Microbiology 42(5): 1993-2004.
- Talaat, A. M., Lyons, R., Howard, S. T., and Johnston, S. A. 2004. The temporal expression profile of *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. PNAS 101(13): 4602-4607.
- Taylor, G. M., Murphy, E., Hopkins, R., Rutland, P., and Chistov, Y. 2007. First report of *Mycobacterium bovis* DNA in human remains from the Iron Age. Microbiology 153: 1243-1249.
- Teixeira, H. C., Abramo, C., Munk, M.B. 2007. Immunological diagnosis of tuberculosis: problems and strategies for success. Jornal Brasileiro de Pneumologia 33(3): 323-334.
- Tsenova, L., Ellison, E., Harbacheuski, R., Moreira, A.L., Kurepina, N., Reed, M.B., Mathema, B., Barry III, C.E., and Kaplan, G. 2005. Virulence of selected *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the rabbit model of meningitis is dependent on phenolic glycolipid produced by the bacilli. Journal of Infectious Diseases 192: 98-106.
- Tsolaki, A. G., Hirsh, A. E., DeRiemer, K., Enciso, J. A., Wong, M. Z., Hannan, M., Goguet de la Salmoniere, Y. O., Aman, K., Kato-Maeda, M., and Small, P. M. 2004. Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: insights from genomic deletions in 100 strains. PNAS USA 101: 4865-4870.

- Tsolaki, A. G., Gagneux, S., Pym, A. S., de la Salmoniere, Y. O. G., Kreiswirth, B. N., Van Soolingen, D., and Small, P.M. 2005. Genomic deletions classify the Beijing/W strains as a distinct genetic lineage of *Mycobacterium tuberculosis* Journal of Clinical Microbiology 43: 3185-3191.
- Ulh, J. R., Sandhu, G.S., Kline, B.C., and Cockerill, F.R. 1999. PCR-RFLP detection of point mutations in the catalase-peroxidase gene (*katG*) of *Mycobacterium tuberculosis* associated with isoniazid resistance ASM Press, Washington DC III: 144-149.
- Van Pittius, N. C. G., Sampson, S. L., Lee, H., Kim, Y., van Helden, P. D., and Warren, R. M. 2006. Evolution and expansion of the *Mycobacterium tuberculosis* PE and PPE multigene families and their association with the duplication of the ESAT-6 (*esx*) gene cluster regions. BMC Evolutionary Biology 6: 95.
- Van Soolingen, D., de Haas, P.E.W., and Kremer, K. Ed. 2002. Restriction fragment polymorphism (RFLP) typing of mycobacteria. Bilthoven, The Netherlands, National Instituut of Public Health and The Environment.
- Voskuil, M. I., Schnappinger, D., Visconti, K.C., Harrell, M.I., Dolganov, G.M., Sherman, D.R., Schoolnik, G.K., 2003. Inhibition of Respiration by Nitric Oxide Induces a *Mycobacterium tuberculosis* Dormancy Program. Journal of Experimental Medicine 198(5): 705-713.
- Voskuil, M. I., Schnappinger, D., Rutherford, R., Liu, Y., Schoolnik, G. K. 2004. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* PE/PPE genes. Tuberculosis 84: 256-262.
- Vultos, T. D., Mestre, O., Rauzier, J., Golec, M., Rastogi, N., Rasolofo, V., Tonjum, T., Sola, C., Matic, I., Gicquel, B. 2008. Evolution and Diversity of Clonal Bacteria: The Paradigm of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS ONE 2: e1538.
- Wisedchaisri, G., Wu, M., Rice, A.E., Roberts, D.M., Sherman, D.R., Hol, W.G. 2005. Structures of *Mycobacterium tuberculosis* DosR and DosR-DNA complex involved in gene activation during adaptation to hypoxic latency. Journal of Molecular Biology 354(3): 630-641.
- WHO.2007.Tuberculose: XDR-TB, os factos.Direcção Geral de Saúde, Divisão de Doenças Transmissíveis [available at <http://www.dgs.pt>]

- Zhang, Y., Hatch, K.A., Wernisch, L., and Bacon, J. 2008. A Bayesian Change point model for differential gene expression patterns of the DosR regulon of *Mycobacterium tuberculosis*. BMC Genomics 9: 87.
- Zink, A. R., Sola, C., Reischl, U., Grabner, W., Rastogi, N., Wolf, H., and Nerlich, A.G. 2003. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Complex DNAs from Egyptian Mummies by Spoligotyping. Journal of Clinical Microbiology 41(1): 359-367.

Anexos

Anexo I

Alinhamento do produto de amplificação da região RD174

		560		580		600	
H37Rv	CGGCCACGTC	ACGCCGAAC	CCTGATAGTG	TTCGCGTGCT	CCAGTCGATG	ATTTTCTGCA	509
157 HPV06 (C1)	CGGCCACGTC	ACGCCGAAC	CCTGATAGTG	TTCGCGTGCT	CCAGTCGATG	ATTTTCTGCA	600
		620		640		660	
H37Rv	CTACCCCGGC	CTTGCGGTTA	CTGGCCGAGC	GCGAAGCATA	CGCGGGCAAC	GCCGCCGCAG	569
157 HPV06 (C1)	CTACCCCGGC	CTTGCGGTTA	CTGGCCGAGC	GCGAAGCATA	CGCGGGCAAC	GCCGCCGCAG	659
		680		700		720	
H37Rv	GGACGGTCTC	GGCATCGATG	ATTGCCGACA	GGATGGCAGC	GGTGTGCGAG	ATTGCGCGTG	629
157 HPV06 (C1)							659
		740		760		780	
H37Rv	AATACCA GAT	CA CAATGGAT	GCCGTCCGCG	GATAGGCATG	CACGGCCTGC	ACACCGGCCA	689
157 HPV06 (C1)							659
		800		820		840	
H37Rv	CCTTGCCGAC	GGTGTCTCTG	ATCGCAACGG	CCCGTCCCGC	GTCGAAGTGA	AACCCGGTGG	749
157 HPV06 (C1)							659
		860		880		900	
H37Rv	CCTGCACACG	CATCCGCCCG	GCTGCATCGG	ATACAACGGT	CAGCTGGACC	TCGGCGTCAA	809
157 HPV06 (C1)							659
		920		940		960	
H37Rv	CTACAGTCGT	CACTCGTCGA	CCCTGGCGCC	AGCGGGCAGG	GGCGCCTCCT	CACCGATGCG	869
157 HPV06 (C1)							659
		980		1.000		1.020	
H37Rv	CCCGCGAGCC	TCGGCAACGA	CGTCGGCGAC	TGTCA GCCGG	GCCGACTCGG	CCGCCGCCTC	929
157 HPV06 (C1)							659
		1.040		1.060		1.080	
H37Rv	CGCGCGCCGG	GTTCCGCGCA	GGCCCCA CTC	CATCA CGGTC	ACCGACGCCC	GGCGAATGGG	989
157 HPV06 (C1)							659
		1.100		1.120		1.140	
H37Rv	CGCCGTACCC	AGCGCTTTGC	GCAGCGTTTC	GTAGGCGCTC	ACCCCGACCA	GTCCGGTGAG	1049
157 HPV06 (C1)							659
		1.160		1.180		1.200	
H37Rv	CACCGCCCCG	GCCGCTTAA	CCAA TAGCTC	ATGCGTAACC	ACGGTCA GTT	CTCCTTTGCT	1109
157 HPV06 (C1)							659
		1.220		1.240		1.260	
H37Rv	TTGTCCTGTA	ACCACAAGTC	GTGTCGTCTG	CTGCTCAGCT	ACCTGTCATC	TCGACCGCCT	1169
157 HPV06 (C1)							659
		1.280		1.300		1.320	
H37Rv	CCCCGGACGC	GGCGCGCTCG	GCGACACAGG	GTTGGTCGGT	ATCCACCGCG	AGAACGACCT	1229
157 HPV06 (C1)							659
		1.340		1.360		1.380	
H37Rv	GGACCAACTC	GCCCAAGGCT	CGCGCCAGGT	GA CTGTCGGC	CAGCGCATAC	CGAACCTGCC	1289
157 HPV06 (C1)							659
		1.400		1.420		1.440	
H37Rv	GGCCCTCATA	GGTTGCGACT	ACCA GCCCGC	AGCCCCGCAA	ACACGACAGA	TGGTTGGACA	1349
157 HPV06 (C1)							659
		1.460		1.480		1.500	
H37Rv	CATTGATCG	GGTCAACCCG	AGGTGCGCAG	CTAGCTGGCC	GGGATAGCAA	ACGCCATCCA	1409
157 HPV06 (C1)							659

			1.520		1.540		1.560	
H37Rv	GCAA CGCCAC	CA GAATCCGG	CA CCGCGTCG	GAT CA GCCAG	AGCCCGGCCG	AGT CGAGCCA	1469	
157 HPV06 (C1)							659	
		1.580		1.600		1.620		
H37Rv	GGGCCGA TTC	CCGCATCTCA	CA CGTCA GCA	TA GATCAAAT	AGTACACCAT	ATA CTGGTAT	1529	
157 HPV06 (C1)							659	
		1.640		1.660		1.680		
H37Rv	AA CA GCAAGA	GCTGAATTGT	ACATCCA TAG	CA GATATGAT	CGGCGCGCGT	CA CAA GCTTC	1589	
157 HPV06 (C1)							659	
		1.700		1.720		1.740		
H37Rv	CGGCCGCAGA	GCCGCCAA CT	CA CGATA TCG	TTAACCGATA	TCCCGAGCCG	ATAGCTGGCG	1649	
157 HPV06 (C1)							659	
		1.760		1.780		1.800		
H37Rv	GGCTCGGGTG	GTGGCCA GCG	GCGCTGCGAC	GAAAGGTGTG	ACCGTCA TGA	AA CAGACA CC	1709	
157 HPV06 (C1)							659	
		1.820		1.840		1.860		
H37Rv	ACCGGCGGCC	GTCGGCCGTC	GTCA CCTGCT	CGAGATCTCA	GCATCCGCAG	CCGGTGTGAT	1769	
157 HPV06 (C1)							659	
		1.880		1.900		1.920		
H37Rv	CGCGCTTTTC	GCGTGTAGTG	GGTCGCCGCC	CGAGCCCGGC	AAAGGCCGGC	CCGACACAAC	1829	
157 HPV06 (C1)							659	
		1.940		1.960		1.980		
H37Rv	CCCGGAACA G	GAAGTCCCGG	TCACCGCGCC	CGAGGACTTG	ATGCGCGAAC	ACGGA GTGCT	1889	
157 HPV06 (C1)							659	
		2.000		2.020		2.040		
H37Rv	CAAA CGCATC	CTGCTGATCT	ATCGCGA GGG	GATCCGCCGC	CTCCAAGCCG	ATGATCA GAG	1949	
157 HPV06 (C1)							659	
		2.060		2.080		2.100		
H37Rv	TCCCGCTCCA	GCACTGAACG	AAAGCGCGCA	GATCATTGCA	CGTTCA TCG	AGGACTACCA	2009	
157 HPV06 (C1)							659	
		2.120		2.140		2.160		
H37Rv	CGGACAGCTG	GAAGAGCAAT	ACGTCTTCCC	CAAGCTGGAA	CAAGCCGGCA	AGCTCACGGA	2069	
157 HPV06 (C1)							659	
		2.180		2.200		2.220		
H37Rv	CATCA CCTCG	GTCTTGCGCA	CCCA GCA TCA	GCGCGGCCGG	GTGCTCA CGG	ACCGGGTA CT	2129	
157 HPV06 (C1)							659	
		2.240		2.260		2.280		
H37Rv	CGCCGCCACC	ACTGCAGCGG	CTGCATTGCA	TCAGCCTGCG	CGAGACACCC	TGGCCCAAGA	2189	
157 HPV06 (C1)							659	
		2.300		2.320		2.340		
H37Rv	CATGGCAGCG	TACA TCCGAA	TGTTTGA GCC	GCATGAGGCG	CGCGAGGACA	CGGTCGTTTT	2249	
157 HPV06 (C1)							659	
		2.360		2.380		2.400		
H37Rv	CCCGGCGTTG	CGCGACGTGA	TGTCCGCTGT	CGAGTTTCGC	GACATGGCCG	AGACCTTTGA	2309	
157 HPV06 (C1)							659	
		2.420		2.440		2.460		
H37Rv	AGACGAGGAG	CACCGGCGCT	TTGGCGAGGC	CGGTTTTCAA	TCGGTGCTCG	ACAAGGTGCG	2369	
157 HPV06 (C1)							659	
		2.480		2.500		2.520		
H37Rv	CGATATCGAA	AAAA GCCTTG	GCATCTACGA	CCTGAGCCAG	TTACCCCCCA	GCTAAAGACA	2429	
157 HPV06 (C1)							659	
		2.540		2.560		2.580		
H37Rv	CTAA TGCCCT	TGGGTTAGGG	ACCA TCGCCT	CCTGACGCGA	TCGCGACAGC	TGGCTAACGT	2489	
157 HPV06 (C1)							659	
		2.600		2.620		2.640		
H37Rv	CGGTAGTACA	CCCA TGCAGA	GGGGA CGCCA	ATGTCAGCCC	AA CAAACGAA	CCTCGGAATC	2549	
157 HPV06 (C1)							659	
		2.660		2.680		2.700		
H37Rv	GTGGTCGGTG	TGGA TGGTTC	ACCCTGCTCG	CATACGGCAG	TCGAATGGGC	CGCGCGCGAT	2609	
157 HPV06 (C1)							659	
		2.720		2.740		2.760		
H37Rv	GCGCAGATGC	GCAA CGTTGC	GCTCCGCGTG	GTGCA GGTGCG	TGCCCCCGGT	AATAA CCGCC	2669	
157 HPV06 (C1)							659	
		2.780		2.800		2.820		
H37Rv	CCGGAAGGGT	GGGCATTTGA	GTATTCGCGG	TTTCAAGAAG	CCCAAAA GCG	CGAAATCGTC	2729	
157 HPV06 (C1)							659	
		2.840		2.860		2.880		
H37Rv	GAACA CTCGT	ACCTGGTCGC	CCAA GCGCAC	CAAATCGTCG	AA CAGGCCCA	CAAGGTGCGC	2789	
157 HPV06 (C1)							659	
		2.900		2.920		2.940		
H37Rv	CTCGAGGCAT	CCTCCTCAGG	TCGCGCCGCG	CAAATCA CCG	GCGAA GTGCT	GCA CGGCCAG	2849	
157 HPV06 (C1)							659	
		2.960		2.980		3.000		
H37Rv	ATAGTGCCCA	CGCTGGCCAA	CATCTCCAGG	CA GGTGCGGA	TGGTCGTGCT	GGGCTACCGA	2909	
157 HPV06 (C1)							659	

H37Rv	GGTCAGGGCG	CCGTAGCCGG	CGCCTTGCTG	GGATCGGTCA	GCTCAAGCCT	GGTTCGCCAC	2969
157 HPV06 (C1)							659
H37Rv	GCTCATGGCC	CTGTGCGCGT	AATACCCGAG	GAGCCGCGAC	CGGCGCGCCC	GCCGACGCGG	3029
157 HPV06 (C1)							659
H37Rv	CCGGTTGTGG	TGGGCATCGA	CGGCTCGCCC	ACCTCGGGAT	TGGCGGCCGA	GATCGCCTTC	3089
157 HPV06 (C1)							659
H37Rv	GACGAGGCAT	CGCGCCGCGG	CGTGGACTTG	GTGGCGCTGC	ACGCGTGGAG	CGACATGGGC	3149
157 HPV06 (C1)							659
H37Rv	CCCCTCGACT	TTCCTAGGCT	CAATTGGGCG	CCGATCGAAT	GGAGAAACCT	CGAAGACGAG	3209
157 HPV06 (C1)							659
H37Rv	CAGGAGAAAA	TGCTCGCCCG	GCCTCTGAGC	GGATGGCAAG	ACCGGTATCC	CGATGTCGTC	3269
157 HPV06 (C1)							659
H37Rv	GTGCACAAA	TCGTGGTGTG	CGATCGACCG	GCACCCCGCC	TGCTCGAATT	GGCACAAAAC	3329
157 HPV06 (C1)							659
H37Rv	GCTCAGCTTG	TGGTGGTTGG	CAGCCACGGC	CGCGGGGGGT	TCCCCGGCAT	GCATCTCGGC	3389
157 HPV06 (C1)							659
H37Rv	TCAGTCAGCA	GAGCGGTGGT	CAATTCCGGT	CAGGCTCCGG	TTATCGTCGC	CCGAATCCCC	3449
157 HPV06 (C1)							659
H37Rv	CAAGATCCGG	CAGTGCCGGC	CTGAGGGCCT	GTGCGATCTG	CTCGGGTGGT	GCCCACCGCG	3509
157 HPV06 (C1)							659
H37Rv	GCGGAAAGCC	CCGTCCGAAC	CGTGATTGGG	CAACGTCGGG	CCGGGCCAGC	AGCGCTGGAC	3569
157 HPV06 (C1)							659
H37Rv	CGTAGGTCCC	TGCAGTGGAT	GACTTACGGC	CCTGATCCAC	ACCGGCGACC	GTTAGGCAAG	3629
157 HPV06 (C1)							659
H37Rv	GTTGAGCCAA	CCGTCCGGTTG	AGCGTCTGGC	TGCGAGGTGA	GGTGATTGTC	GGCGTCAGTG	3689
157 HPV06 (C1)							659
H37Rv	TCTGCCACGA	CGGCTCATCA	TGGCTTGCCA	GCAATGAAG	TGGTGCTGCT	GCTGGAGAGC	3749
157 HPV06 (C1)							659
H37Rv	GATCCATATC	ACGGGCTGTC	CGACGGCGAG	GCCGCCCAAC	GACTAGAACG	CTTCGGGCCCC	3809
157 HPV06 (C1)							659
H37Rv	AACA CCTTGG	CGGTGGTAAC	GC GCGCTAGC	TTGCTGGCCC	GCATCCTGCG	GCAGTTTCAT	3869
157 HPV06 (C1)							659
H37Rv	CACCCGCTGA	TCTACGTTCT	GCTCGTTGCC	GGGACGATCA	CCGCCGGTCT	TAAGGAATTC	3929
157 HPV06 (C1)							659
H37Rv	GTTGACGCCG	CAGTGATCTT	CGGTGTGGTG	GTGATCAATG	CGATCGTGGG	TTTATTTCAA	3989
157 HPV06 (C1)							659
H37Rv	GAATCCAAGG	CAGAGGCCGC	ACTGCAGGGC	CTGCGCTCCA	TGGTGCA CAC	CCACGCCAAG	4049
157 HPV06 (C1)							659
H37Rv	GTGGTGCGCG	AGGGTCA CGA	GCACA CAATG	CCATCCGAAG	AGCTGGTTCC	CGGTGACCTT	4109
157 HPV06 (C1)							659
H37Rv	GTGCTGTTAG	CGGCCGGTGA	CAAGGTTCCC	GCCGATTTGC	GGCTGGTGGC	ACAGACCGGA	4169
157 HPV06 (C1)							659
H37Rv	TTGAGCGTGA	ACGAGTCAGC	ACTTACC GGC	GAGTCGACGC	CGGTTCA CAA	GGA CGAGGTG	4229
157 HPV06 (C1)					A	GGA CGAGGTG	670
H37Rv	GCGTTGCCGG	AGGGCACACC	GGTCGCTGAT	CGTCGCAATA	TCGCGTATTC	CGGCA CATTG	4289
157 HPV06 (C1)	GCGTTGCCGG	AGGGCACACC	GGTCGCTGAT	CGTCGCAATA	TCGCGTATTC	CGGCA CATTG	730
H37Rv	GTAACCGCGG	GCCATGGCGC	CGGGATCGTC	GTGCGGACCG	GCGCCGAAAC	CGA ACTCGGT	4349
157 HPV06 (C1)	GTAACCGCGG	GCCATGGCGC	CGGGATCGTC	GTGCGGACCG	GCGCCGAAAC	CGA ACTCGGT	790
H37Rv	GAGATTCATC	GGCTCGTTGG	GGCCGCCGAG	GTTGTCGCCA	CACCGCTGAC	CGCGAAGCTG	4409
157 HPV06 (C1)	GAGATTCATC	GGCTCGTTGG	GGCCGCCGAG	GTTGTCGCCA	CACCGCTGAC	CGCGAAGCTG	850

Anexo II

—

Alinhamento do produto de amplificação da região RD^{rio}

Uma vez que os genes Rv3346c e Rv3355c, que flanqueiam a região RD^{rio}, sofreram fusão da região central, e na impossibilidade de definir o ponto de quebra de que resultou este polimorfismo, o fragmento sequenciado foi alinhado com a região homóloga dos primers *forward* (sequência A) e *reverse* (sequência B) na estirpe de referência H37Rv.

Sequência A

130 HPV06 (Lisboa2)	H37Rv	GACCGTCACG	GTCGTACGA	AATCGATCCC	CTTGCTGCGC	ACCAACCAACA	GGCCGGCCCG
112 HPV06 (Lisboa3)		GACCGTCACG	GTCGTACGA	AATCGATCCC	CTTGCTGCGC	ACCAACCAACA	GGCCGGCCCG
157 HPV06 (C1)		GACCGTCACG	GTCGTACGA	AATCGATCCC	CTTGCTGCGC	ACCAACCAACA	GGCCGGCCCG
130 HPV06 (Lisboa2)	H37Rv	TTCCTCGGAC	AACACCAACC	GCAGCACCGC	CGCCACCCCA	ACGCCGATAC	CGATCAGCAG
112 HPV06 (Lisboa3)		TTCCTCGGAC	AACACCAACC	GCAGCACCGC	CGCCACCCCA	ACGCCGATAC	CGATCAGCAG
157 HPV06 (C1)		TTCCTCGGAC	AACACCAACC	GCAGCACCGC	CGCCACCCCA	ACGCCGATAC	CGATCAGCAG
130 HPV06 (Lisboa2)	H37Rv	CGCACACACG	CGCCAGAAAT	TAGCCCCCGC	CAGCACGAAC	CCACCCGCGA	AGATCGACCC
112 HPV06 (Lisboa3)		CGCACACACG	CGCCAGAAAT	TAGCCCCCGC	CAGCACGAAC	CCACCCGCGA	AGATCGACCC
157 HPV06 (C1)		CGCACACACG	CGCCAGAAAT	TAGCCCCCGC	CAGCACGAAC	CCACCCGCGA	AGATCGACCC
130 HPV06 (Lisboa2)	H37Rv	AACCAAGCAGG	ATCGGCCACT	GGCGGCCAAC	AGTGCGCCCG	AAAACGGCCC	TCACGGTCAT
112 HPV06 (Lisboa3)		AACCAAGCAGG	ATCGGCCACT	GGCGGCCAAC	AGTGCGCCCG	AAAACGGCCC	TCACGGTCAT
157 HPV06 (C1)		AACCAAGCAGG	ATCGGCCACT	GGCGGCCAAC	AGTGCGCCCG	AAAACGGCCC	TCACGGTCAT
130 HPV06 (Lisboa2)	H37Rv	CGCCGCTCAG	CCAGCTCCAC	GACATTGGTC	AACAAGAACG	CCCGGGTCAA	CGGGCCCAACG
112 HPV06 (Lisboa3)		CGCCGCTCAG	CCAGCTCCAC	GACATTGGTC	AACAAGAACG	CCCGGGTCAA	CGGGCCCAACG
157 HPV06 (C1)		CGCCGCTCAG	CCAGCTCCAC	GACATTGGTC	AACAAGAACG	CCCGGGTCAA	CGGGCCCAACG
130 HPV06 (Lisboa2)	H37Rv	CCGCCCGGAT	TGGGTGACAC	GTGGCCGGCG	AGCTCCACAC	CATCGGGATG	CACGTGCGCCG
112 HPV06 (Lisboa3)		CCGCCCGGAT	TGGGTGACAC	GTGGCCGGCG	AGCTCCACAC	CATCGGGATG	CACGTGCGCCG
157 HPV06 (C1)		CCGCCCGGAT	TGGGTGACAC	GTGGCCGGCG	AGCTCCACAC	CATCGGGATG	CACGTGCGCCG

Sequência B

H37Rv	GCATAACGCA	CACCAAAGGC	CGAGAGCGCG	GAAAACGCGAG	AACATCAATT	GGATCGGTTG
130 HPV06 (Lisboa2)	GCATAACGCA	CACGGAAGGC	CGAGAGCGCG	GAAAACGCGAG	AACATCAATT	GGATCGGTTG
112 HPV06 (Lisboa3)	GCATAACGCA	CACCAAAGGC	CGAGAGCGCG	GAAAACGCGAG	AACATCAATT	GGATCGGTTG
157 HPV06 (C1)	GCATAACGCA	CACCAAAGGC	CGAGAGCGCG	GAAAACGCGAG	AACATCAATT	GGATCGGTTG
H37Rv	CTAGCTTTGC	CGCACCGTGG	TCAGCCCGCG	CAGGATCGGT	CGGCAATGGC	ACCACCGGAG
130 HPV06 (Lisboa2)	CTAGCTTTGC	CGCACCGTGG	TCAGCCCGCG	CAGGATCGGT	CGGCAATGGC	ACCACCGGAG
112 HPV06 (Lisboa3)	CTAGCTTTGC	CGCACCGTGG	TCAGCCCGCG	CAGGATCGGT	CGGCAATGGC	ACCACCGGAG
157 HPV06 (C1)	CTAGCTTTGC	CGCACCGTGG	TCAGCCCGCG	CAGGATCGGT	CGGCAATGGC	ACCACCGGAG
H37Rv	CAGGCGAAAG	GTACCCGGTT	CTAGCCCGTC	CCCAACGGGT	CAATGGTGGA	TGCGATATAG
130 HPV06 (Lisboa2)	CAGGCGAAAG	GTACCCGGTT	CTAGCCCGTC	CCCAACGGGT	CAATGGTGGA	TGCGATATAG
112 HPV06 (Lisboa3)	CAGGCGAAAG	GTACCCGGTT	CTAGCCCGTC	CCCAACGGGT	CAATGGTGGA	TGCGATATAG
157 HPV06 (C1)	CAGGCGAAAG	GTACCCGGTT	CTAGCCCGTC	CCCAACGGGT	CAATGGTGGA	TGCGATATAG
H37Rv	ACCATGGCCG	CCGCGACCGT	CACGGTCGTC	ACGAAATCGA	TCCCCTTGCT	GGCACCACCC
130 HPV06 (Lisboa2)	ACCATGGCCG	CCGCGACCGT	CACGGTCGTC	ACGAAATCGA	TCCCCTTGCT	GGCACCACCC
112 HPV06 (Lisboa3)	ACCATGGCCG	CCGCGACCGT	CACGGTCGTC	ACGAAATCGA	TCCCCTTGCT	GGCACCACCC
157 HPV06 (C1)	ACCATGGCCG	CCGCGACCGT	CACGGTCGTC	ACGAAATCGA	TCCCCTTGCT	GGCACCACCC
H37Rv	AACAGGCCCG	CCCGTTCCCTC	GGACAACACC	AACCGCAGCA	CCGCCGCCAC	CCCAACGCCG
130 HPV06 (Lisboa2)	AACAGGCCCG	CCCGTTCCCTC	GGACAACACC	AACCGCAGCA	CCGCCGCCAC	CCCAACGCCG
112 HPV06 (Lisboa3)	AACAGGCCCG	CCCGTTCCCTC	GGACAACACC	AACCGCAGCA	CCGCCGCCAC	CCCAACGCCG
157 HPV06 (C1)	AACAGGCCCG	CCCGTTCCCTC	GGACAACACC	AACCGCAGCA	CCGCCGCCAC	CCCAACGCCG