



Ana Filipa Carvalho Marques Dias

Licenciatura em Biologia - Ramo Biologia Molecular e Genética
com Minor em Bioquímica,
Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

**Caracterização de estirpes de *Mycobacterium bovis*:
estudos de crescimento e de interacção com macrófagos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Ana Botelho, Investigadora Auxiliar, INRB, I.P. - LNIV

Júri:

Presidente: Prof. Doutor José Paulo Nunes de Sousa Sampaio

Arguente: Prof. Doutora Margarida Sofia Silva Santos Saraiva

Vogal: Prof. Doutora Ana Rosa Pombo Botelho



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2011



Ana Filipa Carvalho Marques Dias

Licenciatura em Biologia - Ramo Biologia Molecular e Genética
com Minor em Bioquímica,
Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

**Caracterização de estirpes de *Mycobacterium bovis*:
estudos de crescimento e de interacção com macrófagos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Ana Botelho, Investigadora Auxiliar, INRB, I.P. - LNIV

Júri:

Presidente: Prof. Doutor José Paulo Nunes de Sousa Sampaio

Arguente: Prof. Doutora Margarida Sofia Silva Santos Saraiva

Vogal: Prof. Doutora Ana Rosa Pombo Botelho



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2011

Caracterização de estirpes de *Mycobacterium bovis*: estudos de crescimento e de interacção com macrófagos

Copyright Ana Filipa Carvalho Marques Dias, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Ao Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV) e ao Instituto de Ciências da Vida e da Saúde (ICVS), por me terem recebido e tornado possível a realização do presente trabalho.

À Doutora Ana Botelho, minha orientadora, por me ter recebido no LNIV, por todo o empenho, disponibilidade e apoio demonstrados, bem como pelo esforço adicional dispensado na fase final de escrita da dissertação, factores imprescindíveis à realização deste trabalho.

À Doutora Margarida Correia-Neves, por me ter recebido no ICVS, proporcionado todo o apoio necessário à minha aprendizagem nesta instituição, pelo interesse demonstrado.

À Doutora Margarida Saraiva, pela forma como acompanhou de perto o trabalho que desenvolvi no ICVS, por toda a disponibilidade e grande apoio que me deu, pela boa disposição com que me acolheu.

À Doutora Mónica Cunha e Doutora Ana Amaro, pelo interesse demonstrado, pelas sugestões construtivas e apoio fundamental que me deram durante a realização deste trabalho.

À D. Maria da Conceição Baptista e D. Ana Vaz pela preciosa ajuda na preparação dos meios de cultura que foram utilizados neste trabalho.

À Dra. Ana Canto, Dra. Maria José Barahona, Doutor Patrick Freire e Doutor João Inácio, pela boa disposição e disponibilidade demonstradas.

Aos meus colegas do LNIV, pela amizade, companheirismo e momentos de convívio, pelo bom ambiente vivido no laboratório. À Inês Guinote e Pedro Costa ainda pelo apoio e sugestões dadas durante a escrita da dissertação.

Aos meus colegas do ICVS, pelo apoio demonstrado, em particular à Joana Alves e Pedro Ferreirinha pelos ensinamentos no âmbito da cultura de células, e por tomarem conta dos “meus macrófagos” como se fossem os “seus macrófagos” quando precisei de estar em Lisboa, e ainda à Joana Guedes e Maria Coelho pelos ensinamentos relativos aos ensaios de ELISA.

Aos meus amigos, pela amizade, forte motivação, pelos momentos de convívio com que me têm acompanhado.

Por último, e porque “os últimos são os primeiros”, um agradecimento muito especial à minha família. Aos meus pais e irmãos, pelo apoio incondicional que tornou possível a concretização deste trabalho, pela compreensão e constante incentivo, um imenso obrigado. À minha família nortenha, que tão bem me acolheu nos meses que passei no Minho.

Resumo

Mycobacterium bovis é o principal agente etiológico da tuberculose bovina, uma zoonose com elevada relevância a nível mundial. Uma vez no hospedeiro, *M. bovis* tem a capacidade de sobreviver e de se multiplicar no interior dos macrófagos, sendo a interacção entre a micobactéria e a célula hospedeira determinante no estabelecimento da infecção.

Neste trabalho foram estudadas duas estirpes de *M. bovis* epidemiologicamente relevantes: LNIV 11428/003/05 (SB0121) e LNIV 7407/000/04 (SB1175), na perspectiva de avaliar se a diferente frequência e dispersão dos perfis de spoligotyping SB0121 e SB1175 pode ser devida ao diferente sucesso das estirpes enquanto agentes patogénicos. Determinaram-se as curvas de crescimento e estudou-se a resistência a intermediários reactivos de oxigénio e azoto, em meio de cultura. O crescimento intracelular em macrófagos e o efeito da infecção na produção de citocinas foi também estudado. Em meio de cultura, o crescimento avaliado pela contagem de colónias foi idêntico para as duas estirpes. Contudo, pela leitura da densidade óptica, a estirpe LNIV 11428/003/05 apresentou uma taxa de crescimento 1,3 vezes superior. Esta estirpe mostrou também uma maior resistência ao peróxido de hidrogénio, e curiosamente, na presença de nitrito de sódio, para concentrações de 4 e 8 mM, apresentou uma maior susceptibilidade. A estirpe LNIV 11428/003/05 cresceu significativamente melhor nos macrófagos. Entre as 6 e as 24 horas após a infecção, a produção de TNF- α aumentou na infecção com a estirpe LNIV 11428/003/05, mas manteve-se idêntica com a estirpe LNIV 7407/000/04. Embora preliminares, estes resultados sugerem que a elevada prevalência e ampla distribuição geográfica do spoligotipo SB0121 em Portugal pode estar relacionada com uma maior capacidade de sobrevivência e crescimento destas estirpes nos macrófagos. Este estudo contribui para o conhecimento de um importante agente patogénico, e deve ser continuado com vista a compreender e justificar os resultados observados.

Termos-chave: *Mycobacterium bovis*, tuberculose bovina, intermediários reactivos de oxigénio, intermediários reactivos de azoto, macrófago, citocinas

Abstract

Mycobacterium bovis is the main etiological agent of bovine tuberculosis, a zoonotic disease with high relevance in the world. Once in the host, *M. bovis* has the ability to survive and replicate within macrophages, being the interaction of mycobacteria with host cell decisive in the establishment of infection.

In this work two epidemiologically relevant *M. bovis* strains were studied: LNIV 11428/003/05 (SB0121) and LNIV 7407/000/04 (SB1175) in order to evaluate if the different frequency and distribution of SB0121 and SB1175 spoligotypes can be explained by strains different success as pathogenic agents. Growth curves and resistance to reactive oxygen and nitrogen intermediates were determined in broth medium. In addition, intracellular growth within macrophages and effect of mycobacterial infection on cytokine production were also studied. In broth medium, strains growth was similar when evaluated by colony counting. However, strain LNIV 11428/003/05 demonstrated 1.3 times higher growth rate by optical density measures. This strain also showed greater resistance to hydrogen peroxide, and curiously, at 4 and 8 mM sodium nitrite, demonstrated higher susceptibility. Within macrophages LNIV 11428/003/05 strain replicated significantly better. The production of TNF- α in response to LNIV 11428/003/05 infection increased between 6 and 24 hours after infection, but remains similar in LNIV 7407/000/04 infection. These previous results suggest that high prevalence and wide geographical spread of SB0121 spoligotype in Portugal may be related with a greater ability of these strains to survive and grow within macrophages. This study contributes to our knowledge about an important pathogen, and should be continued in order to understand and justify the observed results.

Keywords: *Mycobacterium bovis*, bovine tuberculosis, reactive oxygen intermediates, reactive nitrogen intermediates, macrophage, cytokines

Índice Geral

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iii
Abstract	v
Índice Geral.....	vii
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas.....	xi
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	xiii
1. Introdução.....	1
1.1. Género <i>Mycobacterium</i> : características gerais e relevância.....	1
1.1.1. Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2
1.1.1.1. <i>Mycobacterium bovis</i>	4
1.2. Tuberculose bovina	4
1.2.1. Epidemiologia molecular – situação em Portugal.....	5
1.2.1.1. Spoligotyping (<i>Spacer Oligonucleotide Typing</i>)	6
1.2.1.2. MIRU-VNTR (<i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit - Variable Number Tandem Repeats</i>).....	7
1.2.2. Interação micobactéria - hospedeiro.....	8
1.2.2.1. Entrada das micobactérias nos macrófagos	9
1.2.2.2. Sobrevivência das micobactérias patogénicas no interior dos macrófagos – inibição da fusão do fagossoma com lisossomas	10
1.2.2.3. Reconhecimento das micobactérias pelos TLRs (<i>Toll-like Receptors</i>).....	11
1.2.2.4. Secreção de citocinas, estimulada pelo reconhecimento das micobactérias pelos TLRs	13
1.2.2.5. <i>Cross-talk</i> entre células do sistema imunitário – início da imunidade adquirida	14
1.2.2.6. Macrófagos: células efectoras envolvidas na eliminação das micobactérias.....	15
1.2.2.7. Sobrevivência das micobactérias patogénicas no interior dos macrófagos – mecanismos de defesa contra ROIs e RNIs	16
1.3. Objectivos.....	17
2. Materiais e Métodos	19
2.1. Estirpes de <i>Mycobacterium bovis</i> estudadas	19
2.2. Condições de crescimento e preparação de alíquotas de trabalho.....	19

2.3. Tipificação molecular.....	20
2.3.1. Extracção de DNA	20
2.3.2. MIRU-VNTR.....	20
2.4. Caracterização fenotípica: estudos de crescimento	22
2.4.1. Curva de crescimento.....	22
2.4.2. Resistência a intermediários reactivos de oxigénio e de azoto	22
2.5. Interação micobactéria - macrófago, <i>in vitro</i>	23
2.5.1. Preparação de culturas de macrófagos derivados da medula óssea de ratinho.....	23
2.5.2. Infecção de macrófagos.....	23
2.5.3. Observação microscópica da presença intracelular das micobactérias nos macrófagos ...	24
2.5.4. Avaliação do crescimento intracelular das micobactérias pelo método de contagem do número de CFUs	24
2.5.5. Avaliação do conteúdo em citocinas por ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)	24
2.6. Tratamento de resultados e análise estatística.....	25
3. Resultados e Discussão	27
3.1. Tipificação molecular por MIRU-VNTR.....	27
3.2. Caracterização fenotípica: estudos de crescimento	29
3.2.1. Curva de crescimento.....	29
3.2.2. Resistência a intermediários reactivos de oxigénio (ROIs) e de azoto (RNIs)	35
3.2.2.1. Resistência a ROIs	35
3.2.2.2. Resistência a RNIs	38
3.3. Interação micobactéria - macrófago, <i>in vitro</i>	43
3.3.1. Observação microscópica da presença intracelular das micobactérias nos macrófagos ...	43
3.3.2. Avaliação do crescimento intracelular das micobactérias pelo método de contagem do número de CFUs	45
3.3.3. Avaliação do conteúdo em citocinas por ELISA	46
4. Considerações finais.....	49
Bibliografia.....	51
Anexo I.....	65

Índice de Figuras

Secção 1

Figura 1.1	Representação esquemática da estrutura da parede celular das micobactérias patogénicas.	1
Figura 1.2	Representação esquemática da estrutura do <i>locus</i> DR, constituído por repetições directas conservadas, de 36 pb (rectângulos), intercaladas por sequências espaçadoras variáveis, de 34 a 41 pb.	6
Figura 1.3	Representação esquemática da entrada e reconhecimento das micobactérias pelos macrófagos.	12
Figura 1.4	Representação esquemática de diversas interações entre células e moléculas do sistema imunitário do hospedeiro, durante a infecção micobacteriana.	14

Secção 3

Figura 3.1	Electroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação por PCR do <i>locus</i> MIRU 26.	27
Figura 3.2	Curva de crescimento das estirpes <i>M. bovis</i> BCG Pasteur, LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04, determinada pela medição diária, durante aproximadamente 2 semanas, da densidade óptica ($\lambda=600\text{nm}$) das culturas em meio Middlebrook 7H9 suplementado.	29
Figura 3.3	Curva de crescimento das estirpes <i>M. bovis</i> BCG Pasteur, LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04, estabelecida pela determinação diária, durante aproximadamente 2 semanas, do número de CFU/mL nas culturas em meio Middlebrook 7H9 suplementado.	31
Figura 3.4	Curva de crescimento das estirpes <i>M. bovis</i> BCG Pasteur, LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04, desenhada a partir do gráfico apresentado na figura 3.3, com os valores de CFU/mL para a estirpe LNIV 7407/000/04 antecipados dois dias.	32
Figura 3.5	Curva de crescimento das estirpes <i>M. bovis</i> BCG Pasteur, LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04, desenhada a partir do gráfico apresentado na figura 3.2, com os valores de densidade óptica ($\lambda=600\text{nm}$) para a estirpe LNIV 7407/000/04 antecipados dois dias.	33
Figura 3.6	Viabilidade das estirpes <i>M. bovis</i> BCG Pasteur (A), LNIV 11428/003/05 (B) e LNIV 7407/000/04 (C), ao fim de 24 horas em meio líquido Middlebrook 7H9 com diferentes concentrações de H_2O_2 (1, 2, 4 e 8 mM).	36
Figura 3.7	Comparação da viabilidade das estirpes LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04, ao fim de 24h, na presença de diferentes concentrações de H_2O_2 (1, 2, 4 e 8 mM).	37
Figura 3.8	Viabilidade das estirpes <i>M. bovis</i> BCG Pasteur (A), LNIV 11428/003/05 (B) e LNIV 7407/000/04 (C), ao fim de 24 horas em meio líquido Middlebrook 7H9 com diferentes concentrações de NaNO_2 (1,5, 4, 8, 12, 16 e 32 mM).	39
Figura 3.9	Comparação da viabilidade das estirpes LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04, ao fim de 24h, na presença de diferentes concentrações de NaNO_2 (1,5, 4, 8, 12, 16 e 32 mM).	41

Figura 3.10	Observação microscópica da presença intracelular de <i>M. bovis</i> em macrófagos derivados de medula óssea de ratinho.	44
Figura 3.11	Crescimento intracelular das estirpes <i>M. bovis</i> BCG Pasteur, LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04, em macrófagos derivados de medula óssea de ratinho.	45
Figura 3.12	Produção do factor de necrose tumoral α , TNF- α , pelos macrófagos infectados com as estirpes <i>M. bovis</i> BCG Pasteur, LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04.	47

Índice de Tabelas

Secção 1

Tabela 1.1	Espécies do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e respectivos hospedeiros.	3
Tabela 1.2	Perfil de spoligotyping característico de <i>Mycobacterium bovis</i> e <i>Mycobacterium caprae</i> .	6

Secção 2

Tabela 2.1	Perfil de spoligotyping SB0121 e SB1175.	19
Tabela 2.2	Sequências dos <i>primers</i> utilizados para amplificação, por PCR, dos oito <i>loci</i> MIRU-VNTR: VNTR 3232, ETR-A, ETR-B, ETR-C, QUB 11a, QUB 11b, MIRU 4 e MIRU 26.	21

Secção 3

Tabela 3.1	Perfis alélicos obtidos para as estirpes LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04, pelo método de MIRU-VNTR.	28
------------	--	----

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

A	Adenina
APCs	Células apresentadoras de antígenos (do inglês, <i>Antigen-Presenting Cells</i>)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAARs	Bacilos álcool-ácido resistentes
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
C	Citosina
°C	Grau Celsius
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDMEM	Meio DMEM completo
<i>cfp10</i>	Gene que codifica para CFP-10
CFU	Unidade formadora de colónias (do inglês, <i>Colony Formation Unit</i>)
CO ₂	Dióxido de carbono
CpG	Citosina-fosfato-Guanina (do inglês, <i>Cytidine-phosphate-Guanosine</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	Desoxirribonucleótidos (do inglês, <i>deoxyribonucleoside triphosphates</i>)
DO	Densidade óptica
DR	<i>Direct Repeat locus</i>
DVR	<i>Direct Variant Repeat</i>
EEA1	<i>Early Endosome Autoantigen 1</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ESAT-6	<i>Early Secreted Antigenic Target 6</i>
<i>esat6</i>	Gene que codifica para ESAT-6
ETR	Designação dada a alguns <i>loci</i> MIRU-VNTR (do inglês, <i>Exact Tandem Repeat</i>)
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
Fc	Receptor para a fracção Fc das imunoglobulinas
FYVE	Fab1, YGLO23, Vps27 and EEA1 <i>domain</i>
G	Guanina
GC	Guanina e Citosina
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HO·	Radical hidroxilo
i.e.	isto é
ICVS	Instituto de Investigação em Ciências da Vida e da Saúde
IFN-γ	Interferão gama
Ig	Imunoglobulina

IL	Interleucina
iNOS	Sintetase de óxido nítrico indutível (do inglês, <i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>)
INRB	Instituto Nacional de Recursos Biológicos
KatG	Catalase-peroxidase
<i>katG</i>	Gene que codifica para KatG
kDa	<i>Kilodalton</i>
LAM	Lipoarabinomanano
LCCM	<i>L-929 Cell line Condition Medium</i>
LM	Lipomanano
LNIV	Laboratório Nacional de Investigação Veterinária
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
ManLAM	Lipoarabinomanano manose - <i>capped</i> (do inglês, <i>mannose-capped LAM</i>)
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MHC	Complexo <i>major</i> de histocompatibilidade (do inglês, <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
min	Minuto
MIRU	<i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit</i>
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro (do inglês, <i>messenger RNA</i>)
MTC	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (do inglês, <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>)
MyD88	<i>Myeloid Differentiation protein 88</i>
n°	Número
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NF-κB	<i>Nuclear Factor -κB</i>
NK	Célula <i>Natural Killer</i>
NLRs	<i>NOD-like Receptors</i>
nm	Nanómetros
NO	Óxido nítrico (do inglês, <i>Nitric Oxide</i>)
NOD	<i>Nucleotide-binding and Oligomerisation Domain</i>
<i>noxR1</i>	Gene de <i>M. tuberculosis</i> que lhe confere protecção contra RNIs
O ₂ ⁻	Radical anião superóxido
OADC	Ácido oleico, albumina bovina, dextrose e catalase
p	<i>p value</i>
PAMPs	Padrões moleculares presentes nos organismos patogénicos (do inglês, <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>)
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

PI3P	Fosfatidilinositol 3-fosfato
PILAM	Lipoarabinomanano fosfoinositido- <i>capped</i> (do inglês, <i>phosphoinositol-capped LAM</i>)
PIM	Fosfatidil inositol manósidos (do inglês, <i>phosphalidyl-inositol mannosides</i>)
PknG	Proteína cinase G (do inglês, <i>Protein kinase G</i>)
QUB	Designação dada a alguns <i>loci</i> MIRU-VNTR (do inglês, <i>Queen University of Belfast</i>)
RDs	Regiões de diferença (do inglês, <i>Regions of Difference</i>)
RNIs	Intermediários reactivos de azoto (do inglês, <i>Reactive Nitrogen Intermediates</i>)
ROIs	Intermediários reactivos de oxigénio (do inglês, <i>Reactive Oxygen Intermediates</i>)
rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal (do inglês, <i>ribosomal RNA</i>)
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
SapM	Proteína fosfatidilinositol 3-fosfato fosfatase
SB	<i>Spoligotype Bovis</i>
Sod	Superóxido dismutase
<i>sodA</i>	Gene que codifica para a SodA
<i>sodC</i>	Gene que codifica para a SodC
Spoligotyping	<i>Spacer Oligonucleotide Typing</i>
T	Timina
TACO	<i>Tryptophan-aspartate containing coat protein</i>
TbD1	<i>M. tuberculosis specific deletion 1</i>
T _C	Linfócito T <i>cytotoxic</i>
TCR	<i>T-cell Receptors</i>
TE	Tampão Tris-EDTA
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor β</i>
T _H	Linfócito T <i>helper</i>
TLRs	<i>Toll-like Receptors</i>
TNF-α	Factor de necrose tumoral α (do inglês, <i>tumor necrosis factor α</i>)
TRIF	<i>Toll-interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adaptor inducing IFNβ</i>
U	Unidades
V	Volts
VNTR	<i>Variable Number Tandem Repeats</i>
<i>vs</i>	<i>versus</i>
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μM	Micromolar
λ	Comprimento de onda
%	Porcentagem
=	Igual
<	Menor

1. Introdução

1.1. Género *Mycobacterium*: características gerais e relevância

O género *Mycobacterium* é o único membro da família *Mycobacteriaceae*, pertencente à ordem *Actinomycetales*, classe *Actinobacteria*, filo *Actinobacteria*, domínio *Bacteria* (Wayne e Kubica, 1986). Actualmente, inclui mais de 120 espécies descritas (Smith *et al.*, 2009a).

As bactérias do género *Mycobacterium*, conhecidas por micobactérias, apresentam a forma de bacilos (0,2-0,6 µm largura x 1,0-10 µm comprimento), sem curvatura ou com curvatura ligeira, não móveis e não formadores de esporos (Saviola e Bishai, 2006). Possuem uma parede celular de composição única e complexa (figura 1.1), rica em ácidos gordos de cadeia longa, com 60 a 90 átomos de carbono, designados ácidos micólicos. Estes ácidos micólicos conferem às células a propriedade de álcool-ácido resistência na coloração de Ziehl-Neelsen, que é característica do género, e dá a designação de bacilos álcool-ácido resistentes (BAARs) às micobactérias (Lévy-Frébault e Portaels, 1992). Os ácidos micólicos distribuem-se numa camada espessa e exterior, na qual também podem ser encontrados diversos glicolípidos, como o lipomanano (LM), o lipoarabinomanano (LAM), o lipoarabinomanano manose-*capped* (ManLAM), presente nas micobactérias patogénicas, e o lipoarabinomanano fosfoinositido-*capped* (PILAM), encontrado nas micobactérias não patogénicas (Bhamidi *et al.*, 2011; Briken *et al.*, 2004). A camada interior da parede celular é constituída pelo peptidoglicano, arabinogalactano e fosfatidil inositol manósidos (PIM) (Bhamidi *et al.*, 2011; Guerin *et al.*, 2010).

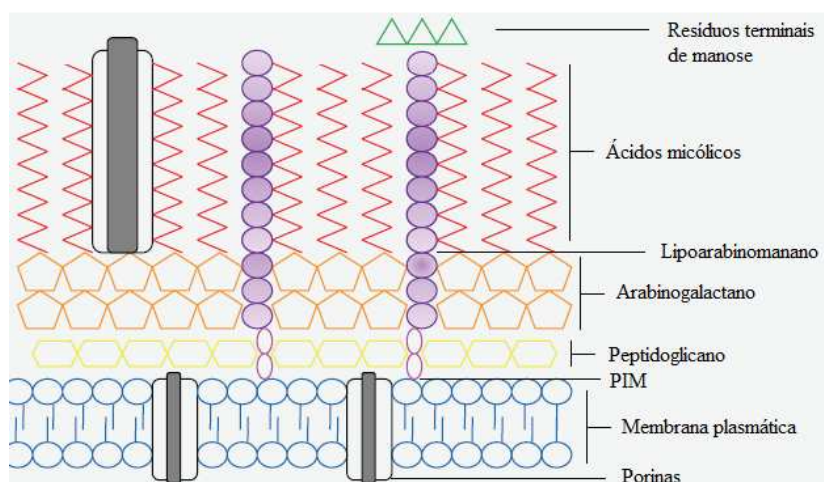


Figura 1.1. Representação esquemática da estrutura da parede celular das micobactérias patogénicas. A camada interior da parede celular é constituída pelo peptidoglicano, arabinogalactano e PIM; e a camada exterior pelos ácidos micólicos, e glicolípidos como o LAM e ManLAM. Adaptado de Kleinnijenhuis *et al.*, 2011.

O facto de as micobactérias terem a capacidade particular de reter o corante fucsina e de não se deixarem descorar pela acção do álcool-ácido, está na base da coloração pelo método de Ziehl-Neelsen. Já a coloração pelo método de Gram é dificultada pelo elevado conteúdo lipídico da parede celular destas bactérias, no entanto, se a porção lipídica das células for removida, as células intactas deixam de ser álcool-ácido resistentes e coram como Gram positivas (Madigan e Martinko, 2006). Outra particularidade das bactérias do género *Mycobacterium* diz respeito ao elevado conteúdo GC do seu genoma, que varia entre 61 e 71% (Lévy-Frédault e Portaels, 1992; Shinnick e Good, 1994).

As micobactérias são microrganismos aeróbios, que podem utilizar diversos compostos como fonte de carbono e de azoto, não precisando a grande maioria de factores de crescimento específicos ou vitaminas no meio de cultura (Hartmans *et al.*, 2006). A temperatura de crescimento varia entre os 30°C e os 52°C, dependendo da espécie (Allen, 1998).

As bactérias do género *Mycobacterium* são divididas em dois grandes grupos, tendo por base a taxa de crescimento: micobactérias de crescimento rápido, se formam colónias em meio sólido selectivo num período de 7 dias, e micobactérias de crescimento lento, se necessitam de mais de 7 dias. Embora sejam conhecidas excepções, as micobactérias de crescimento rápido normalmente aparecem como saprófitas em habitats naturais, sendo consideradas raramente patogénicas para os humanos, enquanto as micobactérias de crescimento lento surgem geralmente associadas a doenças em humanos e outros animais. São diversas as espécies do género *Mycobacterium* relevantes em medicina humana e veterinária (Hartmans *et al.*, 2006; Saviola e Bishai, 2006), sendo algumas micobactérias agrupadas em complexos (por exemplo, complexo *Mycobacterium avium* e complexo *Mycobacterium tuberculosis*), que incluem espécies que causam síndromes clínicas idênticas e apresentam uma elevada semelhança genética (Saviola e Bishai, 2006).

1.1.1. Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC, do inglês, *Mycobacterium tuberculosis complex*) é constituído por oito espécies de micobactérias de crescimento lento, que causam tuberculose nos humanos e outros animais: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium canettii* (van Soolingen *et al.*, 1997), *Mycobacterium caprae* (Aranaz *et al.*, 2003), *Mycobacterium pinnipedii* (Cousins *et al.*, 2003) e *Mycobacterium mungi* (Alexander *et al.*, 2010).

Os membros do MTC apresentam, a nível de sequência nucleotídica, uma semelhança superior a 99,9% (Sreevatsan *et al.*, 1997), com sequências de rRNA 16S idênticas (Boddinghaus *et al.*, 1990). No entanto, mostram diferenças fenotípicas e de patogenicidade, estando adaptados a hospedeiros distintos (Brosch *et al.*, 2000; Brosch *et al.*, 2002). Cada uma das espécies do complexo tem preferência por um hospedeiro específico: *M. tuberculosis*, *M. africanum* e *M. canettii* pelos humanos,

M. microti pelos roedores, *M. bovis* pelos bovinos, *M. caprae* pelos caprinos, *M. pinnipedii* pelas focas e *M. mungi* pelos mangustos listrados (Smith *et al.*, 2006; Alexander *et al.*, 2010). Contudo, a adaptação ao hospedeiro não é necessariamente estrita; algumas espécies já foram isoladas de mamíferos que não são considerados o seu hospedeiro primário (Smith *et al.*, 2009a). *M. bovis* é a espécie do MTC com maior gama de hospedeiros, sendo capaz de infectar uma grande variedade de espécies de mamíferos, domésticos e selvagens, bem como o Homem (O'Reilly e Daborn, 1995) (tabela 1.1). As espécies que têm como hospedeiro primário um animal que não o Homem, mas ocasionalmente causam doença nos humanos, são consideradas espécies zoonóticas. *M. tuberculosis* é o membro do MTC responsável pela grande maioria dos casos de tuberculose humana, sendo o principal agente etiológico desta patologia (Brosch *et al.*, 2000).

Tabela 1.1. Espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e respectivos hospedeiros.

Espécie	Hospedeiro Primário	Hospedeiros Ocasionais
<i>M. tuberculosis</i>	Homem	Bovinos (Ocepek <i>et al.</i> , 2005)
<i>M. africanum</i>	Homem	Bovinos (Rahim <i>et al.</i> , 2007)
<i>M. microti</i>	Roedores	Homem (Xavier Emmanuel <i>et al.</i> , 2007); gatos (Smith <i>et al.</i> , 2009b); bovinos (Jahans <i>et al.</i> , 2004); suínos (Taylor <i>et al.</i> , 2006)
<i>M. bovis</i>	Bovinos	Homem e outros primatas; caprinos; suínos; cães; gatos; búfalos; texugos; veados (O'Reilly e Daborn, 1995)
<i>M. canettii</i>	Homem	–
<i>M. caprae</i>	Caprinos	Homem (Rodríguez <i>et al.</i> , 2009); bovinos; javalis (Duarte <i>et al.</i> , 2008)
<i>M. pinnipedii</i>	Focas	Homem (Kiers <i>et al.</i> , 2008); outros mamíferos em jardins zoológicos (Moser <i>et al.</i> , 2008)
<i>M. mungi</i>	Mangustos listrados	–

A identificação de regiões genómicas variáveis nos membros do MTC, nomeadamente das regiões de diferença (RDs, do inglês, *Regions of Difference*) (Behr *et al.*, 1999; Gordon *et al.*, 1999), permitiu o estudo da evolução do complexo: deleções sucessivas e irreversíveis de RDs definem a evolução dos membros do MTC, aparecendo *M. bovis* no final da filogenia (Brosch *et al.*, 2002).

1.1.1.1. *Mycobacterium bovis*

O genoma de *M. bovis* é constituído por um único cromossoma circular, sequenciado integralmente pela primeira vez em 2003, por Garnier e colaboradores. Com 4.345.492 pb, o cromossoma de *M. bovis* (*M. bovis* AF2122/97) (Garnier *et al.*, 2003) é mais pequeno que o de *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998), possuindo diversas deleções, que estão na base da redução do tamanho do genoma, e contendo apenas um *locus* que se encontra ausente na maioria das estirpes de *M. tuberculosis*, o *locus* TbD1 (do inglês *M. tuberculosis specific deletion 1*) (Garnier *et al.*, 2003). A deleção da RD4 é característica de todas as estirpes de *M. bovis* (Brosch *et al.*, 2002), e a deleção da RD1 é característica de todas as estirpes *M. bovis* BCG (*Bacille Calmette-Guérin*), estirpes atenuadas de *M. bovis* (Mahairas *et al.*, 1996). A perda da RD1 contribui para a atenuação da virulência das estirpes *M. bovis* BCG; esta região inclui os genes *esat6* e *cfp10* que codificam para importantes proteínas antigénicas (Mustafa *et al.*, 2008), e a sua reintrodução resulta num significativo aumento de virulência (Pym *et al.*, 2002). Por não ser virulento, *M. bovis* BCG tem sido utilizado na vacinação contra a tuberculose humana (Mahairas *et al.*, 1996).

M. bovis é o principal agente etiológico da tuberculose bovina. Trata-se de uma bactéria intracelular facultativa, que é capaz de sobreviver e de se multiplicar no interior dos macrófagos (Aldwell *et al.*, 2001; Hope *et al.*, 2004), a sua principal célula hospedeira (Pieters, 2001), mas também de outros fagócitos, como as células dendríticas (Hope *et al.*, 2004; Denis e Buddle, 2008).

M. bovis cresce preferencialmente a 37°C; é uma micobactéria de crescimento lento, que demora três a quatro semanas a formar colónias em meio sólido, e com tendência a formar agregados em meio líquido, devido à natureza hidrofóbica da sua parede (Hartmans *et al.*, 2006; Saviola e Bishai, 2006). Aquando da sua manipulação em laboratório, deve-se ter em atenção que *M. bovis* é um agente biológico de nível III, e que portanto devem ser tomadas todas as devidas precauções de modo a evitar a infeção humana (World Organisation for Animal Health, 2010).

1.2. Tuberculose bovina

A tuberculose bovina é uma zoonose com elevada relevância a nível mundial. Trata-se de uma doença que, para além de ter um grande impacte sócio-económico, uma vez que causa perdas na produção e portanto afecta o comércio de animais e produtos animais, constitui uma preocupação para a saúde pública, devido ao seu potencial zoonótico. Assim, na maioria dos países desenvolvidos têm sido implementados programas de erradicação, que têm reduzido, e em certos casos mesmo eliminado, a doença nos bovinos. O facto de *M. bovis* ter a capacidade de infectar outras espécies animais, domésticas e selvagens, que se podem comportar como reservatórios (hospedeiros de manutenção) da doença, capazes de a reintroduzir em explorações livres de tuberculose, tem complicado o controlo e a

erradicação da tuberculose bovina em diversos países (Cousins, 2001; The Center for Food Security & Public Health, 2009; Thoen *et al.*, 2009). Em Portugal, está implementado um programa de erradicação da tuberculose bovina, suportado legalmente pelos Decretos-Lei nº 272/2000 de 8 de Novembro e nº 31/2005 de 14 de Fevereiro. Resumidamente, é feito o rastreio regular dos efectivos bovinos pela prova de intradermotuberculinização comparada, conseqüente abate sanitário dos animais com suspeita de infecção, e colheita de amostras para diagnóstico laboratorial. A tuberculose bovina é uma doença de declaração obrigatória, sendo os efectivos bovinos e as áreas objecto de classificação sanitária obrigatória. Nos últimos anos, a prevalência de animais infectados em Portugal tem permanecido baixa e vindo a diminuir, tendo-se registado em 2008 uma prevalência animal de 0,03% (vs 0,13% em 2003). Curiosamente, em 2009 verificou-se uma subida inesperada, tendo quase duplicado o número de animais infectados (Direcção Geral de Veterinária, 2010; 2011a). Recentemente, foi criado um plano de controlo e erradicação da tuberculose em caça maior, que obriga a uma avaliação da infecção dos veados e javalis caçados em Portugal (Direcção Geral de Veterinária, 2011b).

Embora *M. bovis* seja o principal agente etiológico da tuberculose bovina, também *M. caprae* é, ocasionalmente, isolado em lesões suspeitas de tuberculose, em bovinos (Duarte *et al.*, 2010).

1.2.1. Epidemiologia molecular – situação em Portugal

O conhecimento preciso da epidemiologia da tuberculose bovina, nomeadamente a compreensão da transmissão da doença entre os bovinos e a compreensão do papel desempenhado por outras espécies domésticas e selvagens na manutenção da doença em explorações livres de tuberculose, é essencial para conseguir a erradicação da doença.

A tipificação molecular, ou genotipagem, dos isolados de *M. bovis*, i.e. a discriminação intra-específica dos isolados (discriminação para além da espécie), tem-se revelado importante no estudo da epidemiologia da tuberculose bovina, uma vez que permite determinar, nomeadamente, se estirpes de *M. bovis* isoladas de animais em explorações geograficamente próximas são geneticamente idênticas, se a transmissão da doença ocorre de um hospedeiro para outro, e se determinadas regiões geográficas são fontes de infecção frequentes (Durr *et al.*, 2000; Milian-Suazo *et al.*, 2008). As técnicas de tipificação molecular mais utilizadas para os membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, e portanto para *M. bovis*, são o spoligotyping (*Spacer Oligonucleotide Typing*) e a análise de MIRU-VNTR (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit - Variable Number Tandem Repeats*). Ambas as técnicas se baseiam na amplificação, por PCR, de regiões polimórficas do genoma, com a vantagem de não exigirem a purificação de DNA. Por assentarem em regiões independentes do genoma, as duas técnicas, uma vez utilizadas em conjunto, permitem confirmar ou refutar suspeitas de ligações epidemiológicas entre isolados.

Apesar de estirpes de uma mesma espécie apresentarem caracteristicamente certas sequências espaçadoras ausentes, diferem na presença ou ausência de outras sequências espaçadoras específicas, e portanto no perfil de spoligotyping. Deste modo, a técnica de spoligotyping permite a simultânea detecção e tipificação de estirpes do MTC (Kamerbeek *et al.*, 1997).

No primeiro estudo de genotipagem por spoligotyping realizado em Portugal, para isolados de *M. bovis* provenientes de várias espécies animais encontradas em diferentes regiões geográficas do país, foram identificados 28 perfis de spoligotyping distintos. O perfil SB0121 revelou-se nitidamente predominante, sendo encontrado em todas as regiões geográficas portuguesas onde existe tuberculose bovina (Duarte *et al.*, 2008). Estudos posteriores, para isolados adicionais de *M. bovis*, vieram identificar novos perfis de spoligotyping, e confirmar a elevada prevalência - aproximadamente 25% dos isolados estudados entre 2002 e 2009, e ampla distribuição geográfica do perfil SB0121 em Portugal (Matos *et al.*, 2010). Relativamente à distribuição pelas diferentes espécies animais, o perfil SB0121 é encontrado não só em bovinos, mas também em animais selvagens, como veados. Ao contrário do perfil de spoligotyping SB0121, alguns perfis são pouco frequentes em Portugal, tendo sido isolados uma única vez. Alguns destes, pelo menos dentro do nosso conhecimento, até à data foram isolados apenas em Portugal - é o caso por exemplo dos perfis SB1093 e SB1175 (Duarte *et al.*, 2008; Matos *et al.*, 2010). Enquanto o perfil SB1093 difere do SB0121 pela ausência de apenas uma sequência espaçadora, o perfil SB1175 é claramente distinto do SB0121, apresentando, comparativamente, diversas sequências espaçadoras ausentes (Duarte *et al.*, 2008).

1.2.1.2. MIRU-VNTR (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit - Variable Number Tandem Repeats*)

O genoma das micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* apresenta diversos *loci* com sequências de DNA com 40 a 100 pb denominadas *mycobacterial interspersed repetitive units* (MIRUs), i.e. sequências repetidas em *tandem*, dispersas pelo genoma em regiões intergénicas (Supply *et al.*, 1997; Supply *et al.*, 2000). No cromossoma de *M. tuberculosis* H37Rv foram identificados 41 *loci* MIRU, dos quais 12 apresentam polimorfismos no número de repetições em *tandem*, sendo designados *loci variable number tandem repeats* (VNTR) (Supply *et al.*, 2000). A tipificação molecular por MIRU-VNTR baseia-se na análise destes polimorfismos, e portanto na determinação do número de repetições em *tandem* destes *loci* MIRU-VNTR (Supply *et al.*, 2001).

A genotipagem por MIRU-VNTR de isolados de *M. bovis* portugueses revelou-se particularmente útil para diferenciar estirpes com o mesmo perfil de spoligotyping. Por exemplo, o perfil SB0121 representa um grupo heterogéneo, com estirpes geneticamente diversas. Em conjunto, a

genotipagem por spoligotyping e MIRU-VNTR permitiu identificar genótipos idênticos em áreas próximas, sugerindo uma fonte comum de contaminação; bem como confirmar a transmissão de *M. bovis* entre bovinos e animais selvagens em Portugal (Duarte *et al.*, 2010).

1.2.2. Interação micobactéria - hospedeiro

A transmissão de *M. bovis* entre bovinos ocorre, na maioria dos casos, pela inalação de aerossóis produzidos por animais infectados, e em certos casos pela ingestão directa do organismo, por exemplo através do leite ou de pastagens contaminadas, sendo a transmissão pelas vias congénita e cutânea rara (The Center for Food Security & Public Health, 2009). A entrada de *M. bovis* no organismo hospedeiro tem como consequência o desenvolvimento de uma resposta imunitária por parte do animal, que compreende o reconhecimento e a resposta à presença da micobactéria.

O sistema imunitário dos mamíferos é um sistema de defesa, que engloba duas componentes: a imunidade inata e a imunidade adquirida ou adaptativa, responsáveis, nomeadamente, pela protecção do organismo contra a invasão por parte de microrganismos patogénicos. A imunidade inata constitui uma primeira linha de defesa contra a infecção e inclui mecanismos que não são específicos para um agente patogénico particular, mas que envolvem células, e moléculas, que reconhecem moléculas peculiares frequentemente encontradas nos agentes patogénicos. Entre os mecanismos inatos encontra-se a fagocitose, restrita apenas a alguns tipos de células: monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (Kindt *et al.*, 2007). Algumas células do sistema imune inato expressam constitutivamente uma variedade de receptores (PRRs, do inglês, *Pattern Recognition Receptors*) envolvidos no reconhecimento de padrões moleculares presentes nos organismos patogénicos (PAMPs, do inglês, *Pathogen Associated Molecular Patterns*) (Kawai e Akira, 2010). Desempenham ainda um papel importante na imunidade inata uma variedade de compostos, como as proteínas do sistema de complemento e as citocinas. A activação da imunidade inata produz sinais que estimulam a imunidade adquirida que, por sua vez, responde à presença dos patogénios de forma específica (Kindt *et al.*, 2007). Na imunidade adquirida, a imunidade mediada por células T desempenha um papel fundamental nas infecções por *M. bovis* (Pollock *et al.*, 2001). Os linfócitos T expressam a nível da membrana plasmática diversas moléculas, nomeadamente as glicoproteínas CD4 ou CD8, e os receptores TCR (do inglês, *T-cell Receptors*), que reconhecem antígenios ligados a moléculas do complexo *major* de histocompatibilidade (MHC, do inglês, *Major Histocompatibility Complex*). As células T que expressam CD4 reconhecem apenas os antígenios ligados a moléculas do MHC classe II (MHC II), e em geral funcionam como linfócitos T *helper* (T_H), enquanto as células T que expressam CD8 reconhecem apenas os antígenios ligados a moléculas do MHC classe I (MHC I), e normalmente funcionam como linfócitos T *cytotoxic* (T_C). As células T_H são activadas por citocinas, ou pelo reconhecimento de um antígeno ligado a moléculas MHC II, encontradas exclusivamente nas células

apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês, *Antigen-Presenting Cells*), nomeadamente macrófagos e células dendríticas, que depois de fagocitarem os patógenos expõem à superfície porções antigénicas destes microrganismos. Uma vez activadas, as células T_H dividem-se, dando origem a um clone de células efectoras específicas para esse antígeno, capazes de secretar várias citocinas, que por sua vez vão activar outras células que participam na resposta imune. Numa resposta T_H1 é produzido um perfil de citocinas que suporta a inflamação e activa principalmente células T e macrófagos, enquanto numa resposta T_H2 são activadas principalmente células B e respostas imunes que dependem de anticorpos. Os dois tipos de imunidade, inata e adaptativa, cooperam de modo a produzir uma resposta imune combinada e mais eficiente contra a invasão por parte de microrganismos patogénicos (Kindt *et al.*, 2007).

O sucesso das micobactérias patogénicas, nomeadamente de *M. bovis*, tem sido atribuído à sua capacidade particular para se adaptar ao ambiente adverso encontrado nos macrófagos (Houben *et al.*, 2006). Estudos recentes sugerem que os macrófagos e células dendríticas desempenham um papel complementar na resposta imune contra *M. bovis* (Denis e Buddle, 2008).

As consequências da infecção micobacteriana dependem, por um lado, da virulência da estirpe que tem acesso ao hospedeiro e, por outro lado, da própria resistência do hospedeiro a esta invasão (Pieters, 2001).

1.2.2.1. Entrada das micobactérias nos macrófagos

Uma vez no organismo hospedeiro, as micobactérias são eficientemente fagocitadas pelos macrófagos, que expressam, ao nível da membrana plasmática, receptores que se ligam às micobactérias e conseqüentemente medeiam a sua entrada na célula. Pelo menos *in vitro*, estão envolvidos na fagocitose das micobactérias pelos macrófagos receptores para o complemento, receptores para a manose, receptores *scavenger*, receptores Fc e receptores para proteínas surfactantes pulmonares, entre outros (Pieters, 2001; Korbelt *et al.*, 2008) (figura 1.3), sendo o receptor para o complemento de tipo 3 um dos principais receptores envolvidos na internalização destes bacilos (Schlesinger *et al.*, 1990; Houben *et al.*, 2006). *In vivo*, a importância relativa destas interações ainda não está estabelecida. Alguns destes receptores são PRRs que reconhecem directamente padrões moleculares micobacterianos e medeiam um reconhecimento dito não opsonico. É o caso, por exemplo, dos receptores para a manose, que reconhecem o ManLAM presente na parede celular das micobactérias patogénicas (Schlesinger *et al.*, 1994). Outros receptores, pelo contrário, ligam-se indirectamente às micobactérias, através de opsoninas, moléculas do próprio hospedeiro, que por sua vez se encontram ligadas às bactérias - reconhecimento opsonico. São exemplos os receptores Fc, que reconhecem bactérias ligadas à IgG, a opsonina (Pieters, 2001).

O colesterol presente na membrana plasmática dos macrófagos também desempenha um papel essencial na entrada das micobactérias nas células, ocorrendo a internalização destas bactérias em domínios ricos em colesterol (Gatfield e Pieters, 2000).

Uma vez internalizadas pelos macrófagos, as micobactérias ocupam o fagossoma (Pieters, 2001).

1.2.2.2. Sobrevivência das micobactérias patogênicas no interior dos macrófagos – inibição da fusão do fagossoma com lisossomas

No processo normal de fagocitose, após a internalização de bactérias em fagossomas, ocorre a fusão dos mesmos com lisossomas e a consequente formação de fagolisossomas, nos quais as bactérias são eficientemente destruídas (Kindt *et al.*, 2007). As micobactérias patogênicas, uma vez no fagossoma e uma vez viáveis, conseguem impedir a fusão do fagossoma com os lisossomas, estabelecendo, deste modo, no interior dos macrófagos, um nicho no qual são capazes de sobreviver intracelularmente (Houben *et al.*, 2006).

Uma das estratégias utilizadas pelas micobactérias patogênicas para impedir a fusão do fagossoma com os lisossomas compreende a eliminação do fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) dos fagossomas (Sundaramurthy e Pieters, 2007). O PI3P é um lípido, sintetizado na membrana do fagossoma, que se liga a proteínas que contêm o domínio FYVE, nomeadamente à proteína EEA1 (do inglês, *Early Endosome Autoantigen 1*), necessária à maturação dos fagossomas (Wurmser *et al.*, 1999). As micobactérias patogênicas secretam a proteína SapM, uma fosfatidilinositol 3-fosfato fosfatase que degrada o PI3P existente (Saleh e Belisle, 2000; Vergne *et al.*, 2005). Para além disso, o ManLAM é um análogo do PI3P, que parece competir com o PI3P pela ligação ao domínio FYVE (Fratti *et al.*, 2003), ou alternativamente interferir com as ondas de PI3P na membrana do fagossoma (Chua e Deretic, 2004). Assim, as micobactérias patogênicas previnem a ligação do PI3P à proteína EEA1, e portanto bloqueiam a maturação dos fagossomas. Uma outra estratégia utilizada por estas micobactérias envolve a proteína TACO (do inglês, *Tryptophan-aspartate containing coat protein*) do hospedeiro. Durante o processo de fagocitose, esta proteína é recrutada para a face citoplasmática do fagossoma, e normalmente é libertada antes de ocorrer a fusão do fagossoma com os lisossomas. As micobactérias patogênicas são capazes de activamente recrutar e reter a nível da membrana do fagossoma a proteína TACO e, deste modo, prevenir a maturação dos fagossomas ao assegurar que a proteína não é libertada (Ferrari *et al.*, 1999). Para além destas estratégias, as micobactérias patogênicas inibem ainda a fusão do fagossoma com os lisossomas ao secretarem para o fagossoma a proteína cinase G (PknG, do inglês, *Protein kinase G*), capaz de inibir esta fusão (Walburger *et al.*, 2004).

Ao bloquearem a formação dos fagolisossomas, as micobactérias evitam um conjunto de mecanismos que operam nos lisossomas, nomeadamente uma variedade de enzimas hidrolíticas, prevenindo assim a sua degradação, e consequentemente apresentação antigénica ao sistema imune do hospedeiro (Sundaramurthy e Pieters, 2007).

Recentemente, van der Wel e colaboradores (van der Wel *et al.*, 2007) obtiveram resultados que constituem uma nova evidência de mecanismo de evasão imune ao fagolisossoma, nos quais fagossomas com micobactérias patogénicas se fundiram com lisossomas ocorrendo a consequente formação de fagolisossomas, de onde as micobactérias se translocaram progressivamente para o citoplasma, e aí se replicaram.

1.2.2.3. Reconhecimento das micobactérias pelos TLRs (*Toll-like Receptors*)

Enquanto alguns PRRs estão envolvidos no processo de fagocitose, outros estão envolvidos no reconhecimento dos organismos patogénicos enquanto organismos “perigosos” que são. Entre estes PRRs destacam-se os TLRs (do inglês, *Toll-like Receptors*), receptores transmembranares expressos principalmente em células apresentadoras de antígenos, como os macrófagos e células dendríticas (Kawai e Akira, 2010).

Os PAMPs presentes na parede celular das micobactérias activam preferencialmente o TLR2 e, em menor grau, o TLR4 (Quesniaux *et al.*, 2004; Akira *et al.*, 2006). O TLR2 geralmente forma heterodímeros com o TLR1 ou o TLR6, e está envolvido no reconhecimento de lipoproteínas triaciladas ou diaciladas, respectivamente (Kawai e Akira, 2010). Os PAMPs micobacterianos reconhecidos pelo TLR2 incluem a lipoproteína 19-kDa associada à parede celular das micobactérias (Brightbill *et al.*, 1999), bem como o LAM (Underhill *et al.*, 1999). O TLR4 reconhece um factor micobacteriano sensível ao calor, que ainda se encontra por definir (Korbel *et al.*, 2008). As micobactérias são ainda reconhecidas pelo TLR9, que ao contrário dos TLR2 e TLR4, que se encontram na membrana plasmática, se localiza exclusivamente em vesículas intracelulares, como os fagossomas, onde reconhece motivos de DNA CpG bacterianos não metilados (Kawai e Akira, 2010) (figura 1.3).

O reconhecimento dos PAMPs micobacterianos pelos TLRs resulta na activação de vias de sinalização, dependentes de MyD88 ou dependentes de TRIF, que culminam na activação e translocação nuclear de NF-κB (Quesniaux *et al.*, 2004, Kawai e Akira, 2010). NF-κB é um factor de transcrição envolvido na expressão de diversos genes que codificam para citocinas, nomeadamente citocinas pró-inflamatórias (Kawai e Akira, 2010) (figura 1.3). Para além dos TLRs, os NLRs (do inglês, *Nucleotide-binding and Oligomerisation Domain -like Receptors*), particularmente o NOD1 e NOD2, são também PRRs capazes de reconhecer PAMPs micobacterianos e iniciar respostas imunes inatas pró-inflamatórias (Korbel *et al.*, 2008).

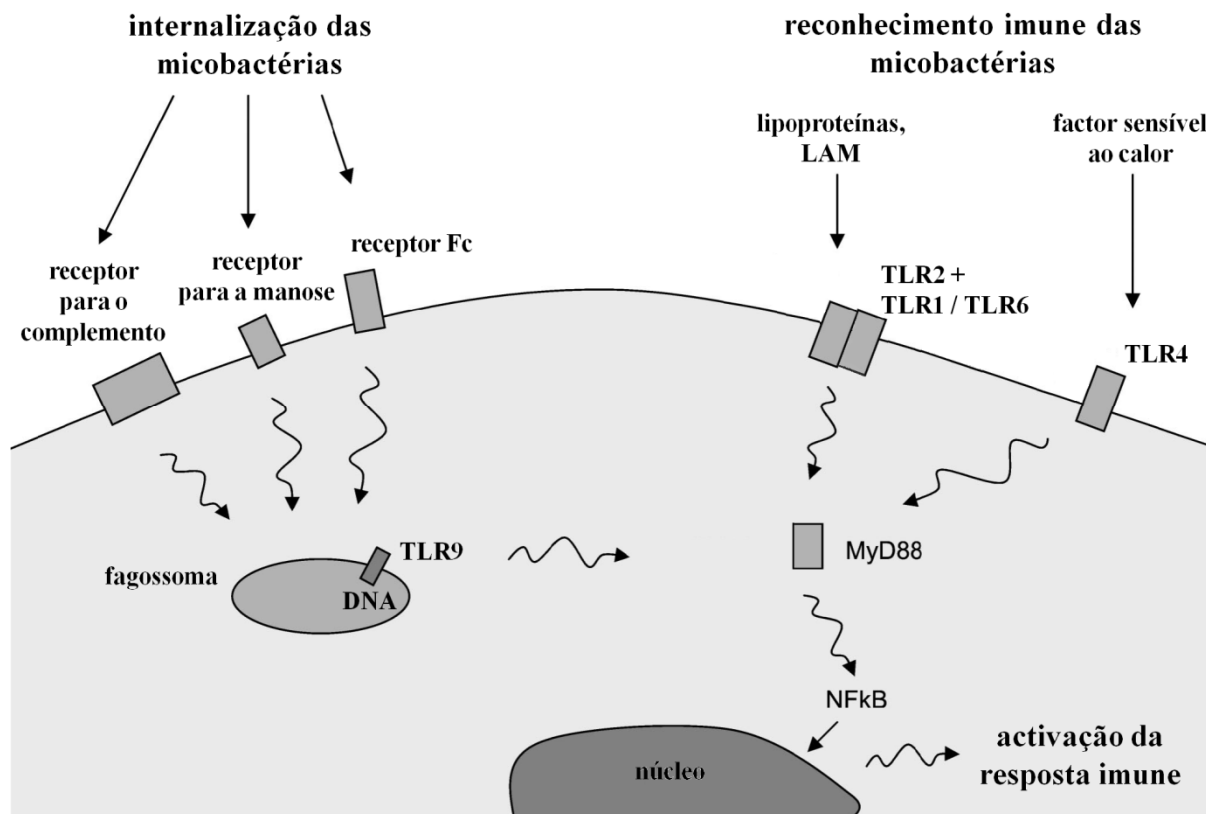


Figura 1.3. Representação esquemática da entrada e reconhecimento das micobactérias pelos macrófagos. *In vitro*, são diversos os receptores que medeiam a fagocitose das micobactérias, que passam a ocupar o fagossoma. O reconhecimento de PAMPs micobacterianos variados pelos TLRs resulta na activação de vias de sinalização, que vão levar à activação da resposta imune contra as micobactérias. Adaptado de van Crevel *et al.*, 2002.

A activação do TLR2 pelos PAMPs micobacterianos parece também constituir uma estratégia utilizada pelas micobactérias para sobreviver nos macrófagos, escapando à resposta imune, nomeadamente através da inibição da expressão de moléculas MHC II, e portanto da apresentação antigénica às células T CD4⁺ (Noss *et al.*, 2001; Pai *et al.*, 2003; Pecora *et al.*, 2009; Yoshida *et al.*, 2009). A proteína ESAT-6 (do inglês, *Early Secreted Antigenic Target 6*) de *M. tuberculosis* está também associada a uma menor resposta imune inata por parte do hospedeiro por inibir a sinalização pelo TLR2; a interacção directa entre esta proteína e o receptor transmembranar inibe a sinalização que culmina na activação de NF- κ B, necessário à activação de respostas imunes inatas (Pathak *et al.*, 2007).

1.2.2.4. Secreção de citocinas, estimulada pelo reconhecimento das micobactérias pelos TLRs

Em resposta ao reconhecimento das micobactérias pelos TLRs, os macrófagos e células dendríticas produzem citocinas pró-inflamatórias, nomeadamente IL-12 (Ladel *et al.*, 1997; Bafica *et al.*, 2005), IL-23 (Gerosa *et al.*, 2008), IL-18 (Schneider *et al.*, 2010) e TNF- α (Valone *et al.*, 1988; Underhill *et al.*, 1999), e citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (Jang *et al.*, 2004).

As citocinas são proteínas ou glicoproteínas envolvidas na comunicação célula a célula. Uma vez secretadas, as citocinas ligam-se a receptores específicos presentes na membrana plasmática das células alvo, desencadeando vias de transdução de sinal, que vão alterar a expressão génica na célula alvo (Kindt *et al.*, 2007).

A interleucina-12 (IL-12) é uma citocina dimérica, que pode ser expressa como homodímero: constituída por duas subunidades idênticas IL-12p40, ou como heterodímero: com a subunidade IL-12p35 (Trinchieri 1995; Cooper *et al.*, 2011). A IL-12 desempenha um papel essencial na protecção do hospedeiro contra a infecção, na medida em que estimula os linfócitos T_H e induz uma resposta imune T_H1, caracterizada pela produção de interferão gama (IFN- γ). Para além de estimular os linfócitos T_H, a IL-12 estimula ainda as células NK (do inglês, *Natural Killer*), células do sistema imune inato, que também secretam IFN- γ (Trinchieri, 1995).

A interleucina-23 (IL-23) é outra citocina dimérica, expressa como heterodímero: constituída pelas subunidades IL-12p40 e IL-23p19. Idêntica à IL-12, a IL-23 também está envolvida na estimulação da produção de IFN- γ pelas células T_H1 (Oppmann *et al.*, 2000). Esta citocina é ainda importante para a manutenção dos linfócitos T_H17, e portanto para a indução de uma resposta T_H17, caracterizada pela produção da interleucina-17 (IL-17) (Harrington *et al.*, 2005; Khader e Cooper, 2008).

A interleucina-18 (IL-18) actua em sinergia com a IL-12 na estimulação dos linfócitos T_H e indução da resposta imune T_H1, bem como na estimulação das células NK (Nakanishi *et al.*, 2001; Schneider *et al.*, 2010).

O factor de necrose tumoral α , TNF- α (do inglês, *tumor necrosis factor α*), é extremamente importante na defesa do organismo hospedeiro contra a infecção. Esta citocina é uma potente activadora dos próprios macrófagos (Reljic *et al.*, 2010). O TNF- α está ainda envolvido na indução da apoptose dos macrófagos em resposta à infecção micobacteriana (Keane *et al.*, 1997), e desempenha igualmente um papel fundamental na formação de granulomas (Saunders e Britton, 2007).

A interleucina-10 (IL-10) está envolvida na prevenção de uma reacção inflamatória excessiva. Esta citocina actua nos macrófagos, interferindo com a sua capacidade de activar a resposta T_H1 (Moore *et al.*, 2001).

Durante a infecção por parte de *M. bovis*, os macrófagos de bovino produzem preferencialmente TNF- α , sendo também a produção das citocinas IL-12, IL-18 e IL-10 influenciada pela infecção (Hope *et al.*, 2004; Denis e Buddle, 2008).

1.2.2.5. Cross-talk entre células do sistema imunitário – início da imunidade adquirida

Os macrófagos, as principais células envolvidas na imunidade inata contra as micobactérias, são também fundamentais para a iniciação da imunidade adquirida contra estas bactérias. Os dois tipos de imunidade, inata e adquirida, cooperam de modo a controlar a infecção por *M. bovis* (Aldwell *et al.*, 2001).

As citocinas secretadas pelos macrófagos e células dendríticas, como consequência do reconhecimento das micobactérias pelos TLRs determinam o desenvolvimento de uma resposta imunitária do tipo T_H1 e T_H17 (figura 1.4).

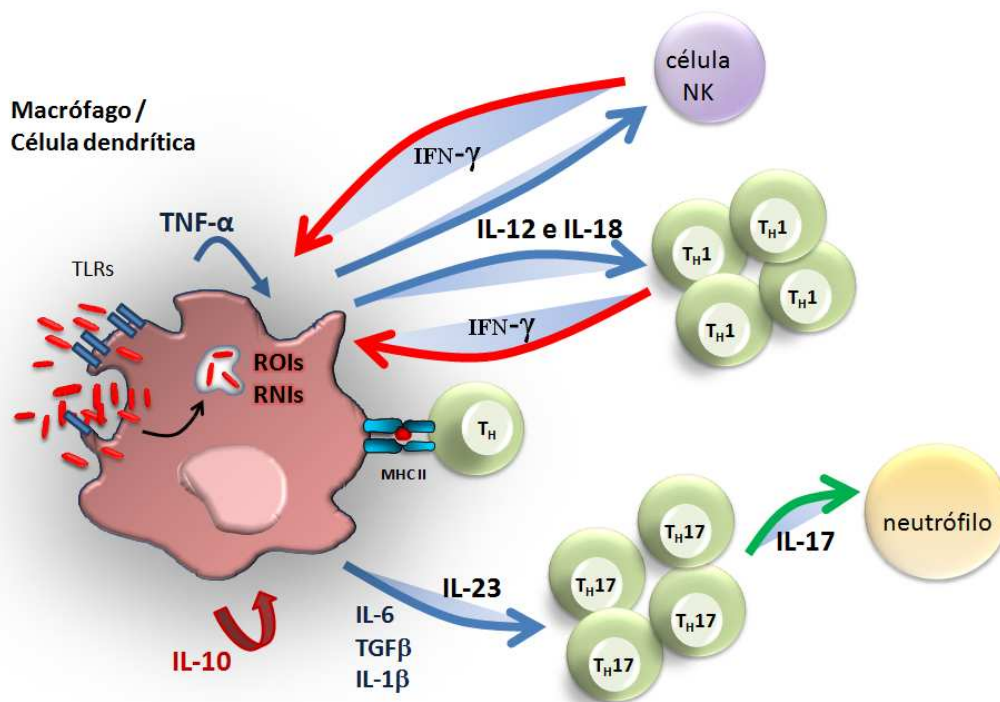


Figura 1.4. Representação esquemática de diversas interações entre células e moléculas do sistema imunitário do hospedeiro, durante a infecção micobacteriana.

A IL-12, em sinergia com a IL-18, estimula os linfócitos T_H e induz uma resposta T_H1, caracterizada pela produção de IFN- γ . As células NK também secretam IFN- γ após instrução destas citocinas. O IFN- γ é responsável pela activação dos macrófagos, que se tornam células efectoras

envolvidas na eliminação das micobactérias do organismo hospedeiro (Korbel *et al.*, 2008). O TNF- α , produzido pelos próprios macrófagos, é também um potente activador destas células. Ambas as citocinas, IFN- γ e TNF- α , actuam em sinergia na activação dos macrófagos (Reljic *et al.*, 2010), desempenhando um papel fundamental na defesa do organismo contra a infecção micobacteriana. A IL-10 controla a resposta T_H1, prevenindo assim uma inflamação excessiva (Moore *et al.*, 2001). A IL-23 é importante para a manutenção da resposta T_H17, caracterizada pela produção de IL-17. Esta é uma citocina pró-inflamatória, que induz a resposta imune mediada por neutrófilos (Matsuzaki e Umemura, 2007).

1.2.2.6. Macrófagos: células efectoras envolvidas na eliminação das micobactérias

Depois de serem activados, os macrófagos produzem intermediários reactivos de oxigénio (ROIs, do inglês, *Reactive Oxygen Intermediates*) e intermediários reactivos de azoto (RNIs, do inglês, *Reactive Nitrogen Intermediates*) - componentes da imunidade inata com uma potente actividade antimicrobiana (Kindt *et al.*, 2007).

Os macrófagos utilizam o complexo NADPH oxidase, presente na membrana do fagossoma, para formar ROIs. Este complexo assegura a produção do radical anião superóxido (O₂⁻) no interior do fagossoma, através da redução univalente do oxigénio. O O₂⁻ pode sofrer dismutação espontânea e formar peróxido de hidrogénio (H₂O₂), que por sua vez se pode combinar com o O₂⁻ e formar o radical hidroxilo (HO[•]) (Robinson, 2008; Flannagan *et al.*, 2009). Estes ROIs são extremamente tóxicos, e capazes de provocar danos graves nos componentes bacterianos, como o DNA e proteínas (Flannagan *et al.*, 2009).

Após a infecção micobacteriana, nomeadamente por *M. bovis*, o IFN- γ induz a expressão da enzima citoplasmática sintetase de óxido nítrico indutível (iNOS, do inglês, *inducible Nitric Oxide Synthase*) nos macrófagos (Jordao *et al.*, 2008). Esta enzima (Widdison *et al.*, 2007) catalisa a oxidação da L-arginina, com a formação de L-citrulina e óxido nítrico (NO, do inglês, *Nitric Oxide*). *In vitro*, os macrófagos de ratinho e de bovino, infectados com *M. bovis* e estimulados com IFN- γ , mostram um aumento da produção de NO (Flesch e Kaufmann, 1991; Carpenter *et al.*, 1998; Wedlock *et al.*, 1999; Denis e Buddle, 2008). O NO é um gás, que se pode difundir para o interior do fagossoma, e reagir com radicais produzidos pela NADPH oxidase, originando outros RNIs (Flannagan *et al.*, 2009). Estes intermediários são também extremamente tóxicos, podendo alterar o DNA, lípidos e proteínas bacterianas (Chan *et al.*, 2001; Flannagan *et al.*, 2009). O NO é produzido nos macrófagos na ordem dos μ M (Wedlock *et al.*, 1999; Jordao *et al.*, 2008).

Alguns estudos *in vitro* têm mostrado que as estirpes de *M. tuberculosis* diferem na susceptibilidade aos ROIs (Manca *et al.*, 1999; Firmani e Riley, 2002; Newton *et al.*, 2006) e RNIs (O'Brien *et al.*, 1994; Rhoades e Orme, 1997; Firmani e Riley, 2002; Brugmann e Firmani, 2005). Já para estirpes de *M. bovis*, estes estudos são pouco comuns.

1.2.2.7. Sobrevivência das micobactérias patogénicas no interior dos macrófagos – mecanismos de defesa contra ROIs e RNIs

Uma vez que os ROIs e RNIs têm uma potente actividade antimicrobiana, não é surpreendente que diversos organismos, nomeadamente as micobactérias, tenham desenvolvido mecanismos para se proteger destes intermediários, favorecendo a sua sobrevivência na célula hospedeira.

M. tuberculosis expressa uma catase-peroxidase, KatG, codificada por *katG*, que degrada o H₂O₂; bem como as superóxido dismutases, SodA e SodC, codificadas por *sodA* e *sodC*, respectivamente, que catalisam a dismutação do O₂⁻ em H₂O₂ e oxigénio (Kusunose *et al.*, 1976; Wu *et al.*, 1998; Bartos *et al.*, 2004). Estas enzimas neutralizam os ROIs, podendo conferir protecção contra o stress oxidativo gerado nos macrófagos, no entanto, diversos estudos revelam resultados controversos. *M. bovis* expressa também a catase-peroxidase KatG (Bartos *et al.*, 2004) e superóxido dismutases (Kang *et al.*, 1998). No que diz respeito aos RNIs, em *M. tuberculosis* foi identificado o gene *noxRI*, que confere protecção contra estes intermediários (Ehrt *et al.*, 1997). Diversos estudos em *M. tuberculosis* têm revelado outros genes, enzimas, e antioxidantes que conferem protecção contra os ROIs e RNIs.

1.3. Objectivos

A grande maioria das estirpes de *Mycobacterium bovis* isoladas em Portugal nos últimos anos, a partir de bovinos e de outros hospedeiros ocasionais, como javalis e veados, têm sido caracterizadas por spoligotyping. Constatou-se que o spoligotipo SB0121 é nitidamente predominante, sendo encontrado em diversos hospedeiros e em todas as regiões geográficas onde existe tuberculose bovina e que, pelo contrário, o spoligotipo SB1175, claramente distinto do spoligotipo SB0121, é raro, tendo sido isolado uma única vez. Será que a diferente frequência e dispersão destes perfis de spoligotyping pode ser explicada pelo diferente sucesso, enquanto agentes patogénicos, das estirpes pertencentes a cada spoligotipo?

O presente trabalho teve como principal objectivo o estudo de uma estirpe representante do spoligotipo SB0121 e da única estirpe do spoligotipo SB1175. Neste contexto, definiram-se os seguintes objectivos específicos:

- ✓ Optimizar os procedimentos experimentais utilizados para estudar as estirpes de *M. bovis* quanto ao seu comportamento *in vitro* em meio de cultura e em cultura de macrófagos;
- ✓ Caracterizar o crescimento em meio de cultura;
- ✓ Determinar a resistência / susceptibilidade a ROIs e RNIs;
- ✓ Avaliar o crescimento intracelular em macrófagos;
- ✓ Avaliar a produção de citocinas pelos macrófagos infectados com cada uma das estirpes.

De um modo geral, estes estudos são frequentes para estirpes de *Mycobacterium tuberculosis*, dada a grande importância desta bactéria em medicina humana; o conhecimento da interacção entre a micobactéria e o hospedeiro é fundamental para o controlo efectivo da tuberculose. No entanto, para *M. bovis*, e apesar da tuberculose bovina ter um grande impacto sócio-económico e constituir uma preocupação para a saúde pública, estes estudos são pouco frequentes. Neste sentido, com o presente trabalho pretende-se simultaneamente contribuir para o conhecimento deste agente patogénico e da sua interacção com a célula hospedeira.

2. Materiais e Métodos

O trabalho descrito foi realizado no Laboratório de Bacteriologia, da Unidade de Sanidade Animal do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (INRB, I.P. - LNIV) (secções 2.2 a 2.4), e no Departamento de Microbiologia e Infecção, do Instituto de Investigação em Ciências da Vida e da Saúde (ICVS) da Escola de Ciências da Saúde da Universidade do Minho (secção 2.5).

2.1. Estirpes de *Mycobacterium bovis* estudadas

Procedeu-se ao estudo de duas estirpes virulentas de *Mycobacterium bovis* da colecção de estirpes de micobactérias do LNIV (LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04). Estas duas estirpes já se encontravam tipificadas por spoligotyping, tendo sido escolhida a estirpe LNIV 11428/003/05 por possuir o perfil SB0121, de elevada prevalência e ampla distribuição geográfica em Portugal, e encontrado não só em bovinos mas também em animais selvagens; e a estirpe LNIV 7407/000/04 por possuir o perfil SB1175, claramente distinto do perfil SB0121 (tabela 2.1), e isolado exclusivamente e uma única vez em Portugal, a partir de um bovino. Ambas as estirpes foram isoladas de bovinos da região do Alentejo. Estudou-se ainda uma estirpe laboratorial de referência, *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur, da colecção de micobactérias do Trudeau Institute (gentilmente cedida pelo ICVS). *M. bovis* BCG tem sido, e continua a ser, utilizado na vacinação contra a tuberculose humana.

Tabela 2.1. Perfil de spoligotyping SB0121 e SB1175. Os quadrados negros representam a presença e os quadrados brancos a ausência de cada uma das 43 sequências espaçadoras. Adaptado de Duarte *et al.*, 2008.

SB0121	
SB1175	

2.2. Condições de crescimento e preparação de alíquotas de trabalho

As estirpes de *M. bovis* do LNIV foram inoculadas em meio líquido Middlebrook 7H9 (BD Difco™) suplementado com 10% de OADC (solução com ácido oleico, albumina bovina, dextrose e catalase) (BD BBL™), 0,2% de glicerol (BD Difco™) e 0,05% de Tween80 (Sigma) (adiante designado por meio Middlebrook 7H9 suplementado), e incubadas a 37°C, até à fase exponencial de

crescimento. A partir destas culturas em meio líquido, efectuaram-se diluições seriadas de base 10, em NaCl 0,85% Tween80 0,05%, que foram inoculadas em meio sólido Middlebrook 7H10 (BD Difco™) suplementado com 10% de OADC (BD BBL™) e 0,5% de glicerol (BD Difco™) (adiante designado por meio Middlebrook 7H10 suplementado). As placas foram seladas e incubadas a 37°C durante três semanas. Para cada estirpe, transferiu-se uma colónia isolada para meio Middlebrook 7H9 suplementado, e incubou-se 37°C, até à fase exponencial de crescimento. Prepararam-se múltiplas alíquotas, que foram guardadas a -80°C. Para determinar o número aproximado de unidades formadoras de colónias por mL (CFU/mL, do inglês *Colony Formation Unit* / mL) das alíquotas, descongelaram-se três alíquotas por estirpe, efectuaram-se diluições seriadas de base 10, em NaCl 0,85% Tween80 0,05%, que foram inoculadas em meio sólido Middlebrook 7H10 suplementado. As placas foram seladas e incubadas a 37°C durante três semanas, até à contagem do número de CFUs, à lupa.

A estirpe *M. bovis* BCG Pasteur foi adquirida preservada em glicerol, em alíquotas a -80°C, já quantificadas (CFU/mL).

2.3. Tipificação molecular

2.3.1. Extracção de DNA

A extracção de DNA foi realizada, por fervura, a partir de culturas em meio líquido Middlebrook 7H9 suplementado. Resumidamente, centrifugou-se 500 µL de cultura a 3500 rpm durante 5 min e ressuspendeu-se o *pellet* em 50 a 100 µL de tampão TE, de acordo com a dimensão do mesmo. Incubou-se a 95°C, em banho de água, durante 45min, e centrifugou-se a 3500 rpm durante 1 min. Recolheu-se o sobrenadante, que foi guardado a -20°C até ser utilizado.

2.3.2. MIRU-VNTR

Para a tipificação molecular por MIRU-VNTR, procedeu-se à amplificação, por PCR, de oito *loci* MIRU-VNTR seleccionados (Duarte *et al.*, 2010): VNTR 3232, ETR-A, ETR-B, ETR-C, QUB 11a, QUB 11b, MIRU 4 e MIRU 26, com os pares de *primers* descritos na tabela 2.2.

Tabela 2.2. Sequências dos *primers* utilizados para amplificação, por PCR, dos oito *loci* MIRU-VNTR: VNTR 3232, ETR-A, ETR-B, ETR-C, QUB 11a, QUB 11b, MIRU 4 e MIRU 26.

<i>Locus</i>	<i>Primers (5' - 3')</i>	Referências
VNTR 3232	3232F - CGG CGA TGG TGC CGC CAT G	Duarte <i>et al.</i> , 2010
	3232R - CTT GGT GAA GGC CCC GAT G	
ETR-A	ETRaF - AAA TCG GTC CCA TCA CCT TCT TAT	Frothingham e Meeker-O'Connell, 1998
	ETRaR - CGA AGC CTG GGG TGC CCG CGA TTT	
ETR-B	ETRbF - GCG AAC ACC AGG ACA GCA TCA TG	
	ETRbR - GGC ATG CCG GTG ATC GAG TGG	
ETR-C	ETRcF - CGA GAG TGG CAG TGG CGG TTA TCT	Van Deutekon <i>et al.</i> , 2005
	ETRcR - AAT GAC TTG AAC GCG CAA ATT GTG A	
QUB 11a	11aF - CCC ATC CCG CTT AGC ACA TTC GTA	Skuce <i>et al.</i> , 2002
	11aR - TTC AGG GGG GAT CCG GGA	
QUB 11b	11bF - CGT AAG GGG GAT GCG GGA AAT AGG	
	11bR - CGA AGT GAA TGG TGG CAT	
MIRU 4	4F - GCG CGA GAG CCC GAA CTG C	Supply <i>et al.</i> , 2001
	4R - GCG CAG CAG AAA CGT CAG C	
MIRU 26	26F - TAG GTC TAC CGT CGA AAT CTG TGA C	
	26R - CAT AGG CGA CCA GGC GAA TAG	

Num volume final de 25 μ L, prepararam-se as misturas de reacção para cada um dos *locus*, com: tampão de *Taq* DNA polimerase 1x (Promega), $MgCl_2$ (Promega) em concentração variável, 100 μ M de dNTPs (Promega), 0,4 μ M de cada um dos *primers* (Invitrogen), 0,5 U de enzima *Taq* DNA polimerase (Promega) e 2,5 μ L da solução de DNA diluída 1/10 em tampão TE. Para os *loci* MIRU 4 e MIRU 26 a concentração de $MgCl_2$ utilizada foi de 3 mM, e para os restantes *loci* foi de 1,5 mM. Incluiu-se um controlo positivo (DNA da estirpe de referência *M. tuberculosis* H37Ra (ATTC 25177)) e um controlo negativo (água bidestilada estéril). A reacção de amplificação foi efectuada num termociclador Mastercycler ep gradient S (Eppendorf), nas seguintes condições: 40 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 min, hibridação a 59°C durante 1 min e extensão a 72°C durante 1,5 min, precedidos de um período de 15 min de desnaturação inicial a 94°C, e seguidos de um período de 10 min de extensão final a 72°C.

O resultado do PCR foi avaliado por electroforese em gel de agarose (Lonza) 3%, a 120 V durante 3 a 5 horas, utilizando o marcador de pesos moleculares HyperLadderTM IV (Bioline). O número de repetições em *tandem* presente em cada *locus* foi determinado tendo por base a tabela em anexo (Anexo I), que relaciona o peso molecular dos produtos de amplificação com o número de repetições.

2.4. Caracterização fenotípica: estudos de crescimento

2.4.1. Curva de crescimento

Para a determinação da curva de crescimento, foram preparados, a partir de alíquotas guardadas a -80°C , pré-inóculos em meio Middlebrook 7H9 suplementado. Cada uma das estirpes foi inoculada, a partir de um pré-inóculo em fase exponencial de crescimento, em novo meio Middlebrook 7H9 suplementado. As culturas foram incubadas a 37°C , durante um período aproximado de duas semanas. Diariamente, efectuou-se a leitura espectrofotométrica da densidade óptica ($\lambda=600\text{nm}$) da cultura, num espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-1203; e procedeu-se à determinação do número aproximado de CFU/mL na cultura: efectuaram-se diluições seriadas de base 10, em NaCl 0,85% Tween80 0,05%, que foram inoculadas em meio sólido Middlebrook 7H10 suplementado, ou Middlebrook 7H11 suplementado no caso de *M. bovis* BCG. As placas foram seladas e incubadas a 37°C durante três semanas, até à contagem do número de CFUs, à lupa. Para cada uma das estirpes, foram realizadas, no mínimo, três experiências independentes.

2.4.2. Resistência a intermediários reactivos de oxigénio e de azoto

Na determinação da resistência a intermediários reactivos de oxigénio e de azoto, foram igualmente preparados, a partir de alíquotas guardadas a -80°C , pré-inóculos em meio Middlebrook 7H9 suplementado. Tendo por base a relação observada nas curvas de crescimento anteriormente determinadas, entre a densidade óptica ($\lambda=600\text{nm}$) e o número de CFUs, para cada uma das estirpes, inocularam-se aproximadamente 3×10^6 CFU/mL em 1 mL de meio líquido 7H9 sem catalase, contendo diferentes concentrações de H_2O_2 (0, 1, 2, 4 e 8 mM) (Merck) e NaNO_2 pH = 5,4 (0, 1,5, 4, 8, 12, 16 e 32 mM) (Merck). As culturas foram incubadas a 37°C durante 24h. Ao fim deste tempo, efectuaram-se diluições seriadas de base 10, em NaCl 0,85% Tween80 0,05%, que foram inoculadas em meio sólido Middlebrook 7H10 suplementado, ou Middlebrook 7H11 suplementado no caso de *M. bovis* BCG. As placas foram seladas e incubadas a 37°C durante três semanas, até à contagem do número de CFUs, à lupa. Para cada uma das estirpes, realizou-se um mínimo de três experiências independentes.

2.5. Interação micobactéria - macrófago, *in vitro*

2.5.1. Preparação de culturas de macrófagos derivados da medula óssea de ratinho

Para a extração de células hematopoiéticas da medula de ratinho foram sacrificados ratinhos C57BL/6 *wild-type*, fêmeas de aproximadamente 14 semanas, obtidos a partir do Laboratório Charles River (Barcelona, Espanha). Após sacrificar os ratinhos por asfixia com CO₂, removeu-se o fêmur e a tíbia de ambos os membros posteriores. Cortaram-se as duas extremidades de cada osso, e efectuou-se o *flush* da medula óssea com meio DMEM (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco, Invitrogen) suplementado com 1% piruvato de sódio (Gibco, Invitrogen), 1% tampão HEPES (Gibco, Invitrogen), 1% glutamina (Gibco, Invitrogen) e 10% FBS (do inglês, *Fetal Bovine Serum*) (Gibco, Invitrogen) (adiante designado por meio cDMEM). A suspensão celular foi passada através de um *cell strainer*, e de seguida centrifugada a 1200 rpm durante 6 min. O *pellet* foi ressuscitado em meio cDMEM, e a suspensão celular incubada, em placa de *Petri*, a 37°C com 5% CO₂, durante 4h. Ao fim deste tempo, recolheram-se apenas as células não aderentes. Esta suspensão celular foi centrifugada a 1200 rpm durante 6 min, e o *pellet* ressuscitado em meio cDMEM. O número de células extraídas foi determinado por contagem em câmara de Neubauer, utilizando o corante *Trypan blue*.

Em placas de 24 poços Nucleon delta surface plates (Nunc), plaquearam-se 0,5 x 10⁶ células/mL por poço, em meio cDMEM suplementado com 10% LCCM (do inglês, L-929 *Cell line Condition Medium*), num volume final de 1mL. As placas foram incubadas a 37°C com 5% CO₂ (dia 0). Ao dia 4, adicionou-se 0,1 mL de LCCM a cada poço; e ao dia 7, substituiu-se o meio por novo meio cDMEM suplementado com 10% LCCM. No dia 10, procedeu-se à infecção dos macrófagos.

Quando se pretendeu fixar as células para posterior coloração, colocou-se uma lamela no fundo de cada poço, antes de se plaquearem as 0,5 x 10⁶ células/mL.

2.5.2. Infecção de macrófagos

Depois de se removerem as células não aderentes, para qualquer uma das estirpes, efectuou-se a infecção dos macrófagos segundo uma multiplicidade de 2 micobactérias por macrófago (2:1), num volume final de 200µL; e incubou-se a 37°C com 5% CO₂ durante 4 horas. Ao fim deste tempo, cada poço foi lavado três vezes com meio DMEM e uma última vez com meio cDMEM suplementado com 10% LCCM, e depois usado para observação microscópica dos bacilos ou quantificação da carga bacteriana ao dia 0, ou novamente incubado a 37°C com 5% CO₂ para posterior observação microscópica dos bacilos ou quantificação da carga bacteriana (aos dias 2, 4 e 7).

2.5.3. Observação microscópica da presença intracelular das micobactérias nos macrófagos

Aos dias 0, 2 e 4 após a infecção, retirou-se o meio de cada poço, e fixaram-se as células com paraformaldeído 2%, durante 20 min. Após três lavagens sucessivas com PBS, as placas foram seladas e guardadas a 4°C, até serem utilizadas.

As lamelas foram coradas com o corante Ziehl-Neelsen, durante 20 min, e lavadas com uma solução de álcool-ácido. A contracoloração para macrófagos foi efectuada com a solução azul do *kit* Hemacolor® (Merck), as lamelas foram mergulhadas no corante 6 vezes.

As imagens foram obtidas num microscópio Axioplan 2, Carl Zeiss, Inc., e registadas com uma câmara digital (AxioCam, Carl Zeiss, Inc.).

2.5.4. Avaliação do crescimento intracelular das micobactérias pelo método de contagem do número de CFUs

Aos dias 0, 2 e 4 após a infecção, as células foram lisadas com 10 µL/mL de saponina (Sigma), durante 10 min. Depois de homogeneizados os lisados, realizaram-se diluições seriadas de base 10, em PBS, que foram inoculadas em meio sólido Middlebrook 7H10 suplementado, ou Middlebrook 7H11 suplementado no caso de *M. bovis* BCG. As placas foram seladas e incubadas a 37°C durante 3 semanas, até à contagem do número de CFUs, à lupa.

Para cada uma das estirpes, realizaram-se três experiências independentes, e em cada uma, pelo menos, cinco determinações do número de CFU/mL.

2.5.5. Avaliação do conteúdo em citocinas por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Às 6 e às 24 horas após a infecção dos macrófagos, recolheram-se os sobrenadantes da cultura celular. Estes sobrenadantes foram filtrados e guardados a -80°C, até serem analisados por ELISA, para determinação da concentração de TNF- α e IL-10. Para o efeito, utilizaram-se os *kits* Mouse TNF alpha ELISA Ready-SET-Go® (eBioscience) e Mouse IL-10 ELISA Ready-SET-Go® (eBioscience), tendo sido o procedimento efectuada segundo instruções do fabricante. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços F96 Maxisorp (Nunc), e a leitura das absorvâncias foi efectuada no leitor de microplacas BioRad modelo 680. Os resultados foram analisados com o programa Microplate

manager 5.2.1 (BioRad). Como controlo, analisaram-se também sobrenadantes de culturas celulares de macrófagos não infectados.

Para cada uma das condições, realizaram-se três experiências independentes, e em cada uma, três determinações da concentração das citocinas.

2.6. Tratamento de resultados e análise estatística

Os resultados obtidos na tipificação molecular por MIRU-VNTR são apresentados como perfis alélicos: sequência de números, em que cada número corresponde ao número de repetições em *tandem* presente num determinado *locus*.

A resistência aos intermediários reactivos de oxigénio e de azoto encontra-se expressa como percentagem de sobrevivência, calculada por comparação com as culturas que não foram expostas ao H₂O₂ ou NaNO₂, respectivamente (sobrevivência de 100%).

Os gráficos apresentados na secção 3 (Resultados e Discussão), foram desenhados no GraphPad 5. Os resultados são apresentados como médias de valores, e respectivo desvio padrão. Na análise estatística foi utilizado o teste *t* de *Student*, tendo sido as médias consideradas significativamente diferentes para $p < 0,05$.

3. Resultados e Discussão

3.1. Tipificação molecular por MIRU-VNTR

A tipificação molecular dos isolados de *M. bovis* tem-se revelado importante no estudo da epidemiologia da tuberculose bovina, por permitir estudar a transmissão da doença entre os bovinos e compreender o papel desempenhado por outros hospedeiros na manutenção da doença (Durr *et al.*, 2000; Milian-Suazo *et al.*, 2008). Por possibilitarem uma tipificação mais pormenorizada que a que seria obtida apenas por spoligotyping, as técnicas de spoligotyping e MIRU-VNTR são utilizadas em conjunto.

No presente trabalho, as estirpes virulentas de *M. bovis* LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04, previamente caracterizadas por spoligotyping, foram tipificadas por MIRU-VNTR. Na figura 3.1 está apresentada, como exemplificativa, a electroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação por PCR de um dos *locus* MIRU-VNTR estudados.

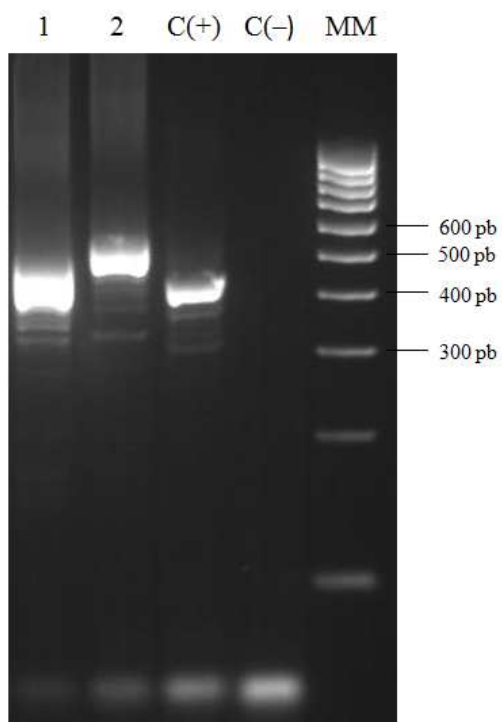


Figura 3.1. Electroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação por PCR do *locus* MIRU 26. 1: *M. bovis* LNIV 7407/000/04, 2: *M. bovis* LNIV 11428/003/05, C(+): controlo positivo - *M. tuberculosis* H37Ra (ATTC 25177), C(-): controlo negativo - água bidestilada estéril, MM: marcador de pesos moleculares HyperLadder™ IV (Bioline).

Com o conhecimento do peso molecular dos produtos de amplificação por PCR de cada um dos *locus*, e tendo por base a tabela presente em anexo (Anexo I), determinou-se o número de repetições em *tandem* presente nos oito *loci* estudados (tabela 3.1).

Tabela 3.1. Perfis alélicos obtidos para as estirpes LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04, pelo método de MIRU-VNTR. (Nota: os perfis alélicos estão descritos segundo a seguinte ordem de *loci*: VNTR 3232, ETR-A, ETR-B, ETR-C, QUB 11a, QUB 11b, MIRU 4 e MIRU 26.)

Estirpe	Spoligotipo	Perfil alélico							
LNIV 11428/003/05	SB0121	5	7	5	4	12	4	3	5
LNIV 7407/000/04	SB1175	5	3	5	4	11	2	4	4

As duas estirpes apresentam o mesmo número de repetições em *tandem* para alguns dos *loci* (VNTR 3232, ETR-B e ETR-C), mas possuem perfis alélicos distintos.

Os isolados portugueses de *M. bovis* com o perfil de spoligotyping SB0121, quando são tipificados por MIRU-VNTR, revelam-se particularmente heterogéneos, não existindo nenhum perfil alélico que seja consideravelmente predominante e que, por isso, represente melhor o spoligotipo (Duarte *et al.*, 2010). O perfil alélico determinado para a estirpe LNIV 11428/003/05 ainda não tinha sido anteriormente descrito, para o spoligotipo SB0121, ou outro, constituindo deste modo um perfil adicional que contribui para a heterogeneidade do spoligotipo SB0121.

O perfil de spoligotyping SB1175 foi encontrado em Portugal uma única vez (Duarte *et al.*, 2008; Matos *et al.*, 2010), pelo que, o perfil alélico determinado para a estirpe LNIV 7407/000/04 é representativo deste spoligotipo. Uma vez que também ainda não tinha sido descrito noutros isolados de *M. bovis* portugueses (Duarte *et al.*, 2010; Matos, 2009), o perfil alélico determinado é igualmente característico do spoligotipo.

3.2. Caracterização fenotípica: estudos de crescimento

As estirpes LNIV 11428/003/05 (SB0121) e LNIV 7407/000/04 (SB1175), bem como a estirpe de referência *M. bovis* BCG Pasteur, foram caracterizadas pela determinação da curva de crescimento e da resistência a intermediários reactivos de oxigénio e de azoto, em meio líquido Middlebrook 7H9.

3.2.1. Curva de crescimento

O crescimento de uma população microbiana pode ser acompanhado através da avaliação, indirecta ou directa, do número de células em cultura, e posteriormente representado num gráfico, designado por curva de crescimento, que apresenta a estimativa do número de células em cultura em função do tempo.

A curva de crescimento das estirpes *M. bovis* BCG Pasteur, LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04, foi determinada pela medição indirecta e directa do crescimento micobacteriano: através da leitura da densidade óptica ($\lambda=600\text{nm}$) (figura 3.2), e da determinação do número de CFUs (figura 3.3), respectivamente. As culturas em meio líquido Middlebrook 7H9, mantidas a 37°C , foram estudadas diariamente, durante aproximadamente 2 semanas.

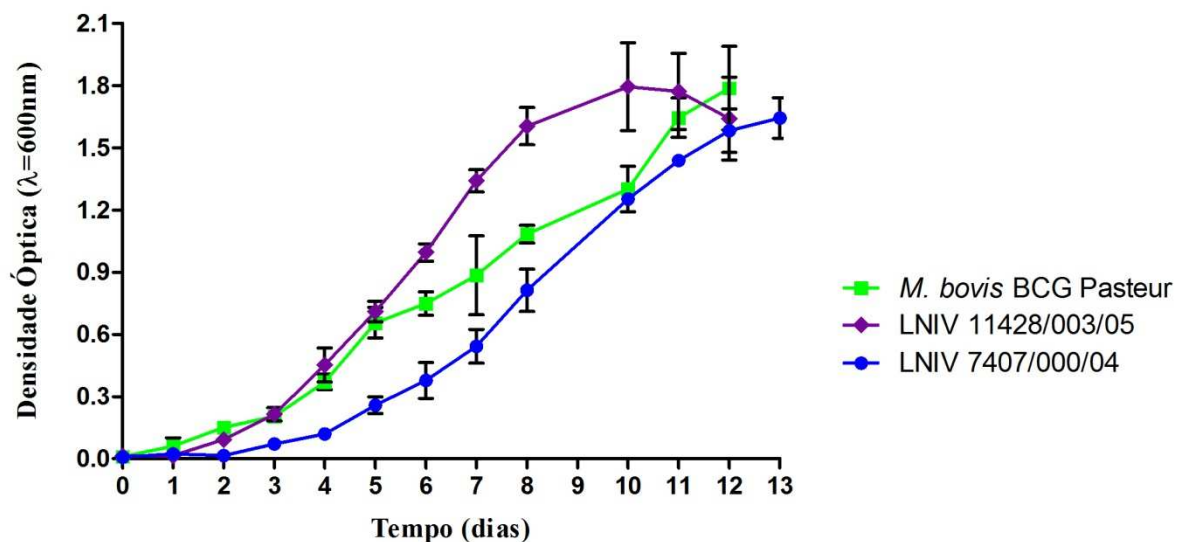


Figura 3.2. Curva de crescimento das estirpes *M. bovis* BCG Pasteur, LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04, determinada pela medição diária, durante aproximadamente 2 semanas, da densidade óptica ($\lambda=600\text{nm}$) das culturas em meio Middlebrook 7H9 suplementado. Os resultados apresentados dizem respeito à média de um mínimo de 3 experiências independentes para cada estirpe; as barras de erro representam o desvio padrão.

Na figura 3.2, observa-se que as curvas de crescimento das estirpes *M. bovis* BCG Pasteur e LNIV 7407/000/04 apresentam apenas as fases *lag* e exponencial de crescimento, enquanto a curva da estirpe LNIV 11428/003/05 mostra também o início da fase estacionária. A fase *lag* demora cerca de dois dias para as estirpes *M. bovis* BCG Pasteur e LNIV 11428/003/05, já para a estirpe LNIV 7407/000/04 prolonga-se até aproximadamente ao dia 4, sugerindo que esta última estirpe teve mais dificuldade em se adaptar às condições de crescimento.

A taxa de crescimento de cada uma das estirpes foi calculada, através da determinação do declive da recta que acompanha a fase exponencial de crescimento. Para a estirpe *M. bovis* BCG Pasteur o declive foi calculado entre os dias 5 e 10, para a estirpe LNIV 11428/003/05 entre os dias 3 e 8, e para a estirpe LNIV 7407/000/04 entre os dias 6 e 10, por serem os intervalos de tempo nos quais se observa que o crescimento microbiano evolui de um modo constante ao longo do tempo. A estirpe que apresenta a maior taxa de crescimento é a LNIV 11428/003/05, com um valor 1,3 vezes superior ao observado para a estirpe LNIV 7407/000/04, e 2,2 vezes superior ao observado para a estirpe *M. bovis* BCG Pasteur. A estirpe LNIV 7407/000/04 tem uma taxa de crescimento 1,7 vezes maior que a da estirpe *M. bovis* BCG Pasteur, que apresenta a menor taxa de crescimento. A partir dos valores das taxas de crescimento, foi também calculado o tempo de geração de cada uma das estirpes. A estirpe LNIV 11428/003/05 duplicou o número de células em cultura em aproximadamente dois dias e a estirpe LNIV 7407/000/04 em aproximadamente três dias, enquanto a estirpe *M. bovis* BCG Pasteur cresceu mais lentamente, demorando cerca de cinco dias a duplicar o número de células em cultura. Estes valores sugerem que as duas estirpes virulentas LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04 apresentam alguma vantagem fisiológica, comparativamente a *M. bovis* BCG Pasteur, que lhes permite, nas mesmas condições experimentais, crescer mais rapidamente em meio líquido Middlebrook 7H9.

A estirpe LNIV 11428/003/05 aparenta entrar em fase estacionária por volta do dia 10, e embora para a estirpe LNIV 7407/000/04 a fase estacionária não seja visível na curva de crescimento determinada, a diminuição do declive entre o dia 12 e 13 sugere a aproximação desta fase. A densidade óptica ($\lambda=600\text{nm}$) máxima atingida pelas culturas das diferentes estirpes, no período de tempo estudado, foi idêntica, e próxima de 1,8.

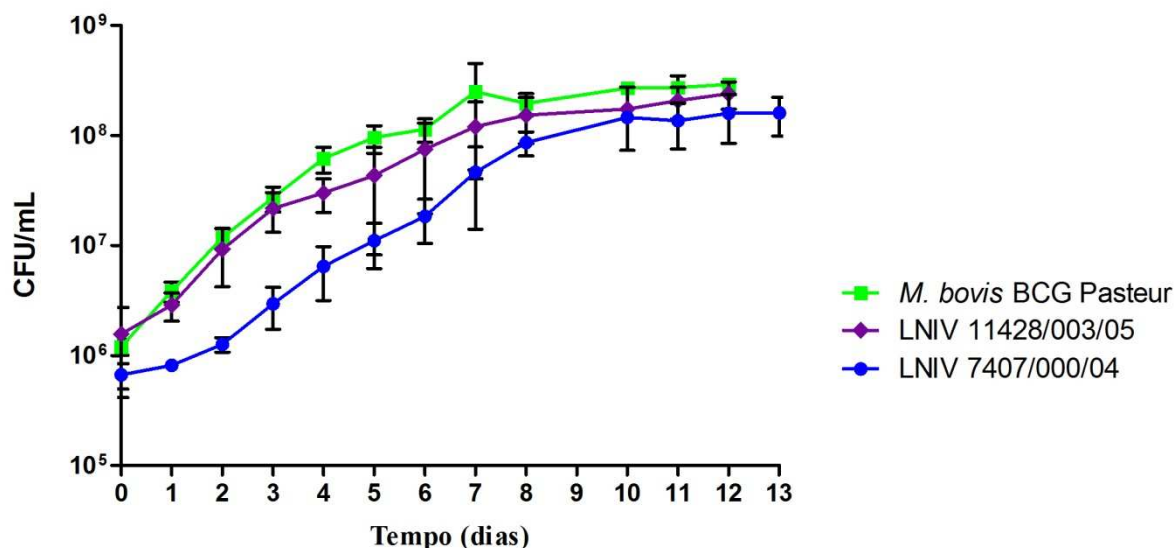


Figura 3.3. Curva de crescimento das estirpes *M. bovis* BCG Pasteur, LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04, estabelecida pela determinação diária, durante aproximadamente 2 semanas, do número de CFU/mL nas culturas em meio Middlebrook 7H9 suplementado. Os resultados apresentados dizem respeito à média de um mínimo de 3 experiências independentes para cada estirpe; as barras de erro representam o desvio padrão.

Na figura 3.3, observa-se que apenas a curva de crescimento da estirpe LNIV 7407/000/04 apresenta fase *lag*. Esta fase é pouco longa, demorando aproximadamente dois dias. As curvas das estirpes *M. bovis* BCG Pasteur e LNIV 11428/003/05 iniciam-se na fase exponencial de crescimento. A duração da fase *lag* de uma curva de crescimento é variável, dependendo, nomeadamente, das características do inóculo e das condições de crescimento. Neste estudo, para cada uma das estirpes, o inóculo foi retirado de uma cultura em fase exponencial de crescimento, transferido para meio de cultura idêntico, e mantido nas mesmas condições de crescimento que o pré-inóculo. Deste modo, era de esperar que as micobactérias em cultura já se encontrassem aptas a crescer naquelas condições, nomeadamente a sintetizar as proteínas necessárias à duplicação celular, o que está de acordo com uma fase *lag* curta, ou mesmo ausente. Na determinação da curva de crescimento, a densidade óptica das culturas ao dia 0 foi ligeiramente diferente para as três estirpes (DO_{600nm} *M. bovis* BCG Pasteur = 0,010; DO_{600nm} LNIV 11428/003/05 = 0,013; DO_{600nm} LNIV 7407/000/04 = 0,007). Por serem valores muito próximos (DO_{600nm} aproximada de 0,01), esta diferença não foi considerada relevante. No entanto, verifica-se que se traduziu numa diferença considerável no número de CFU/mL. O facto de, ao dia 0, o número de CFU/mL para a estirpe LNIV 7407/000/04 ter sido inferior, pode explicar a fase *lag* que se observa na curva de crescimento desta estirpe, e que se encontra ausente para as outras duas estirpes. Assim, de forma a mais facilmente se poder comparar o comportamento das diferentes estirpes, procurou-se normalizar o número de CFU/mL no início da experiência. Verificou-se que na curva de crescimento da estirpe LNIV 7407/000/04, só ao dia 2 é que o número de CFU/mL na cultura

se aproxima do encontrado ao dia 0 nas curvas das estirpes *M. bovis* BCG Pasteur e LNIV 11428/003/05. Como tal, redesenhou-se o gráfico da figura 3.3, tendo sido todos os valores de CFU/mL, para a estirpe LNIV 7407/000/04, antecipados dois dias (figura 3.4).

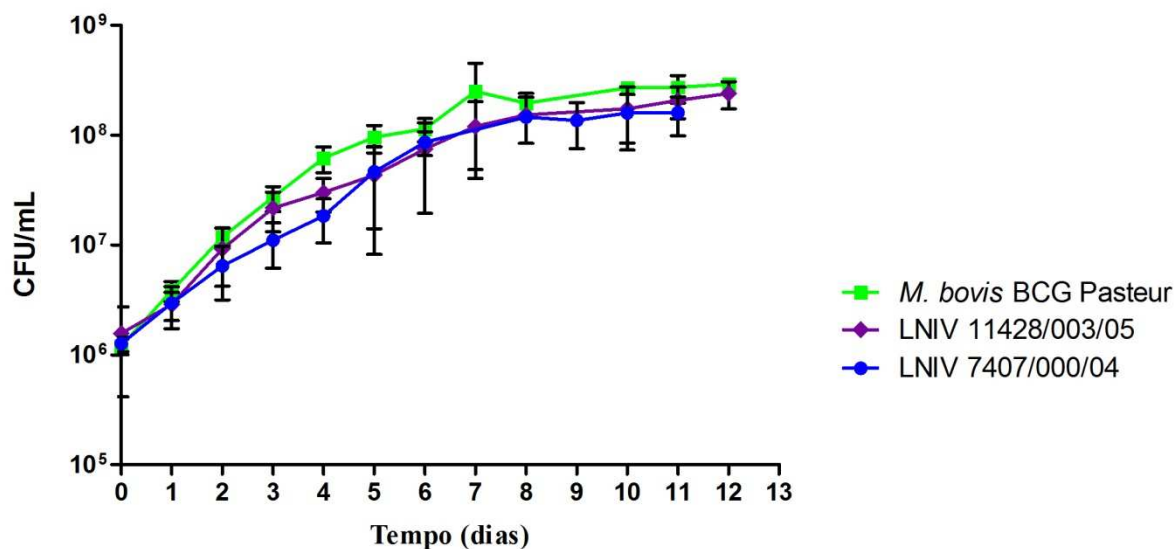


Figura 3.4. Curva de crescimento das estirpes *M. bovis* BCG Pasteur, LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04, desenhada a partir do gráfico apresentado na figura 3.3, com os valores de CFU/mL para a estirpe LNIV 7407/000/04 antecipados dois dias.

Tendo em conta as figuras 3.3 e 3.4, estirpes que aparentemente se comportavam de forma distinta, afinal comportam-se de forma idêntica, no que diz respeito à evolução do número de CFU/mL em meio de cultura, com o decorrer do tempo. A taxa de crescimento de cada uma das estirpes foi determinada, como anteriormente. A estirpe *M. bovis* BCG Pasteur é a que apresenta a maior taxa de crescimento, 1,5 vezes superior à da estirpe LNIV 11428/003/05 e 1,4 vezes superior à da estirpe LNIV 7407/000/04. A estirpe *M. bovis* BCG Pasteur, que pela leitura da densidade óptica ($\lambda=600\text{nm}$) aparentava ter um crescimento mais lento do que o das outras duas estirpes, revelou-se em termos do número de CFU/mL, a estirpe com o crescimento mais rápido.

Na figura 3.3 pode ainda observar-se que, para as três estirpes estudadas, as culturas entram em fase estacionária aproximadamente uma semana após o início da fase exponencial de crescimento. Nesta fase, o número de CFU/mL mantém-se constante, e deve notar-se que é próximo para qualquer uma das estirpes, permanecendo na ordem de grandeza dos 10⁸ CFU/mL de cultura. Nas curvas de crescimento determinadas não é visível a fase de morte. Com o intuito de eventualmente se observar esta fase, as culturas devem ser acompanhadas por um período de tempo mais longo, através da determinação dos CFU/mL.

A pequena diferença de densidade óptica ($\lambda=600\text{nm}$) das culturas das diferentes estirpes no início da experiência, que como já foi mencionado, se reflectiu num número de CFU/mL ao dia 0 inferior para a estirpe LNIV 7407/000/04, pode também constituir uma justificação para o facto de a curva de crescimento desta estirpe, apresentada na figura 3.2, mostrar, comparativamente às outras duas estirpes, uma fase *lag* mais demorada. Assim, à semelhança do que foi feito para o gráfico da figura 3.3, redesenhou-se o gráfico da figura 3.2, tendo-se também antecipado em dois dias o valor da densidade óptica ($\lambda=600\text{nm}$) para a estirpe LNIV 7407/000/04 (figura 3.5).

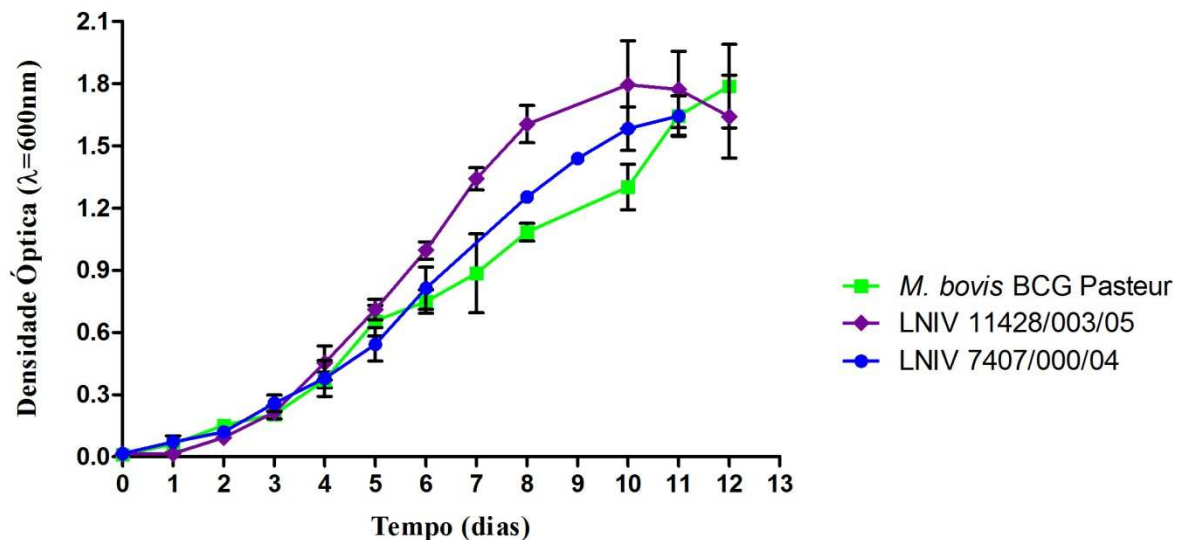


Figura 3.5. Curva de crescimento das estirpes *M. bovis* BCG Pasteur, LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04, desenhada a partir do gráfico apresentado na figura 3.2, com os valores de densidade óptica ($\lambda=600\text{nm}$) para a estirpe LNIV 7407/000/04 antecipados dois dias.

Na figura 3.5, observa-se que a partir do dia 5, e durante a fase exponencial de crescimento, as três estirpes apresentam um comportamento distinto, no que diz respeito à evolução da densidade óptica, com o decorrer do tempo. Como já foi referido, a estirpe LNIV 11428/003/05 é a que apresenta um crescimento mais rápido, seguindo-se a estirpe LNIV 7407/000/04 e, por fim, com o crescimento mais lento, a estirpe *M. bovis* BCG Pasteur. Pelo contrário, na figura 3.4, é a estirpe *M. bovis* BCG Pasteur que apresenta o crescimento mais rápido, com as outras duas estirpes a crescer mais lentamente. Uma possível justificação para esta diferença observada nos dois tipos de abordagem é a eventual secreção de macromoléculas, ou a maior formação de agregados celulares em meio de cultura líquido, por parte das estirpes LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04, mas principalmente por parte da estirpe LNIV 11428/003/05, que apresenta a taxa de crescimento ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) mais elevada. As macromoléculas no meio extracelular, bem como os agregados celulares, dispersam mais o feixe de luz incidente, e portanto há uma menor transmissão da luz através da suspensão celular, que se traduz

num aumento do valor de densidade óptica. Para confirmar a maior formação de agregados celulares, as culturas devem ser observadas por microscopia.

O facto de as duas metodologias utilizadas para a determinação das curvas de crescimento terem originado resultados que não são concordantes, reforça a ideia de que na análise dos resultados obtidos é muito importante ter em consideração qual o método utilizado e quais as suas características que podem influenciar, e de que modo, os resultados.

A medição indirecta do crescimento microbiano através da leitura espectrofotométrica da densidade óptica das culturas tem a vantagem de ser mais rápida, comparativamente à determinação do número de CFU/mL em cultura que, para as micobactérias em estudo, exige que se aguardem três semanas até à contagem das colónias. No entanto, apresenta a desvantagem de não permitir a distinção entre células viáveis e não viáveis, podendo por isso, dar uma informação menos rigorosa do número de células capazes de se dividir em cultura. Para além disto, a medição da densidade óptica apresenta a desvantagem de ser afectada por diversas condições que alteram a transmissão da luz incidente, nomeadamente a formação de estruturas como agregados, podendo dar informação sobre um crescimento apenas aparente. A medição directa do crescimento micobacteriano através da determinação do número de CFU/mL em cultura tem a desvantagem, como já foi referido, de ser mais demorada; contudo, permite avaliar as células viáveis em cultura, i.e., as células que têm a capacidade de se dividir, e portanto contribuir para o crescimento da população microbiana. O facto de mais de uma célula poder dar origem a apenas uma unidade formadora de colónias, contribuindo assim para a subestimação do número de células em cultura, é um problema associado a esta metodologia, particularmente no caso das micobactérias que, devido à natureza hidrofóbica da sua parede, têm tendência para formar agregados celulares em meio líquido. Com o intuito de minimizar a formação de agregados celulares foi adicionado detergente (Tween80) ao meio de cultura líquido, bem como à solução em que foram feitas as diluições seriadas. Poder-se-ia também ter passado o pré-inóculo através de uma agulha em seringa, no entanto, a consequente eventual formação de aerossóis tornaria a manipulação destes microrganismos patogénicos mais arriscada. As colónias que foram observadas à lupa não apresentaram grande heterogeneidade em tamanho, não sugerindo à partida a presença de agregados quando as bactérias foram inoculadas em meio sólido, pelo menos com um número variado de células.

Independentemente do método utilizado, as curvas de crescimento determinadas mostram que as diferentes estirpes de *M. bovis* estudadas crescem de modo distinto em meio de cultura Middlebrook 7H9. Este é ainda um estudo preliminar, que deve ser complementado, com vista a compreender e justificar os comportamentos observados para as diferentes estirpes.

3.2.2. Resistência a intermediários reactivos de oxigénio (ROIs) e de azoto (RNIs)

A produção de intermediários reactivos de oxigénio e de azoto constitui um mecanismo de defesa do organismo hospedeiro contra a invasão microbiana; *M. bovis*, uma vez no fagossoma, é sujeito à presença destes compostos.

3.2.2.1. Resistência a ROIs

A sobrevivência das estirpes *M. bovis* BCG Pasteur, LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04, foi determinada ao fim de 24 horas na presença de diferentes concentrações de H₂O₂ (figura 3.6), pelo método de contagem do número de CFUs.

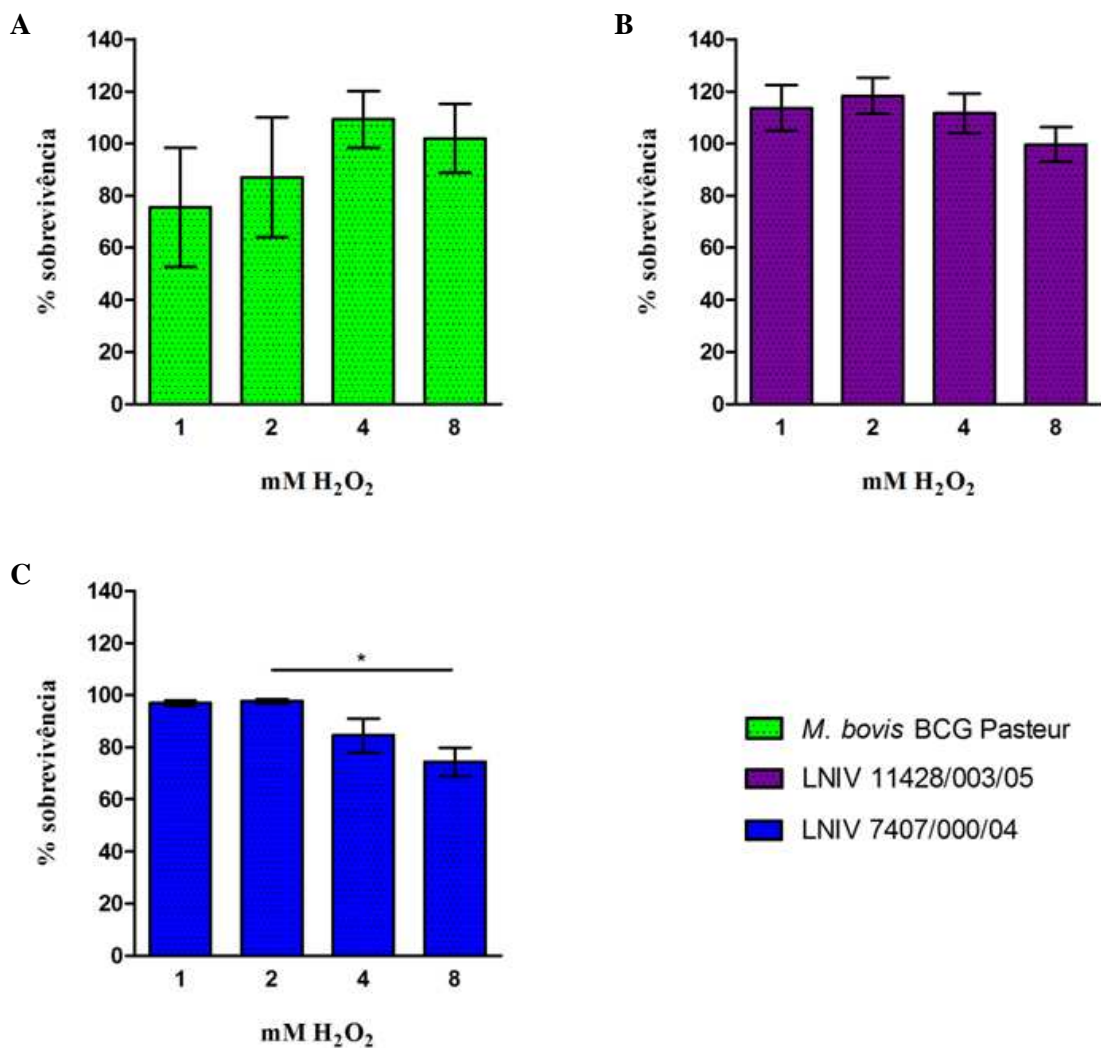


Figura 3.6. Viabilidade das estirpes *M. bovis* BCG Pasteur (A), LNIV 11428/003/05 (B) e LNIV 7407/000/04 (C), ao fim de 24 horas em meio líquido Middlebrook 7H9 com diferentes concentrações de H₂O₂ (1, 2, 4 e 8 mM). Os resultados apresentados dizem respeito à média de um mínimo de 3 experiências independentes para cada estirpe; as barras de erro representam o desvio padrão; as médias foram consideradas significativamente diferentes para $p < 0,05$ (*).

A estirpe LNIV 11428/003/05 revelou-se resistente às concentrações de H₂O₂ estudadas, a viabilidade em cultura manteve-se elevada mesmo com aumento da concentração de H₂O₂ no meio, não tendo na verdade atingido valores muito inferiores a 100%.

A estirpe LNIV 7407/000/04, pelo contrário, mostrou alguma sensibilidade ao H₂O₂. Para 1 e 2 mM de H₂O₂ a sobrevivência desta estirpe foi muito próxima de 100%, no entanto, em meio com 4 e 8 mM de H₂O₂ houve uma diminuição da sobrevivência, que se verificou significativa para os 8 mM, comparativamente a 1 e 2 mM.

Para a estirpe *M. bovis* BCG Pasteur, contrariamente ao esperado, não se observou uma diminuição da sobrevivência com o aumento da concentração do H₂O₂ no meio de cultura; a

viabilidade desta estirpe não variou significativamente para as diferentes concentrações de H₂O₂ estudadas, mantendo-se elevada na presença do composto. Num estudo idêntico, realizado por Firmani e Riley (Firmani e Riley, 2002), a estirpe *M. bovis* BCG estudada, para 5 mM de H₂O₂ apresentou uma sobrevivência de aproximadamente 40%. No entanto, deve ter-se em consideração que os autores não referem qual a estirpe de *M. bovis* BCG utilizada, e que nem todas as condições experimentais foram idênticas (como o tempo de incubação com o H₂O₂, por exemplo).

Para as mesmas, ou idênticas, concentrações de H₂O₂ utilizadas neste estudo, outros estudos semelhantes mostram diminuições de sobrevivência notavelmente mais acentuadas, em estirpes de *M. tuberculosis* (Firmani e Riley, 2002; Newton *et al.*, 2006).

Uma vez que os resultados obtidos para a estirpe *M. bovis* BCG Pasteur não se assemelham aos encontrados por outros autores, optou-se por comparar a viabilidade das duas estirpes de campo em estudo para cada uma das concentrações de H₂O₂, sem se considerar a estirpe BCG (figura 3.7).

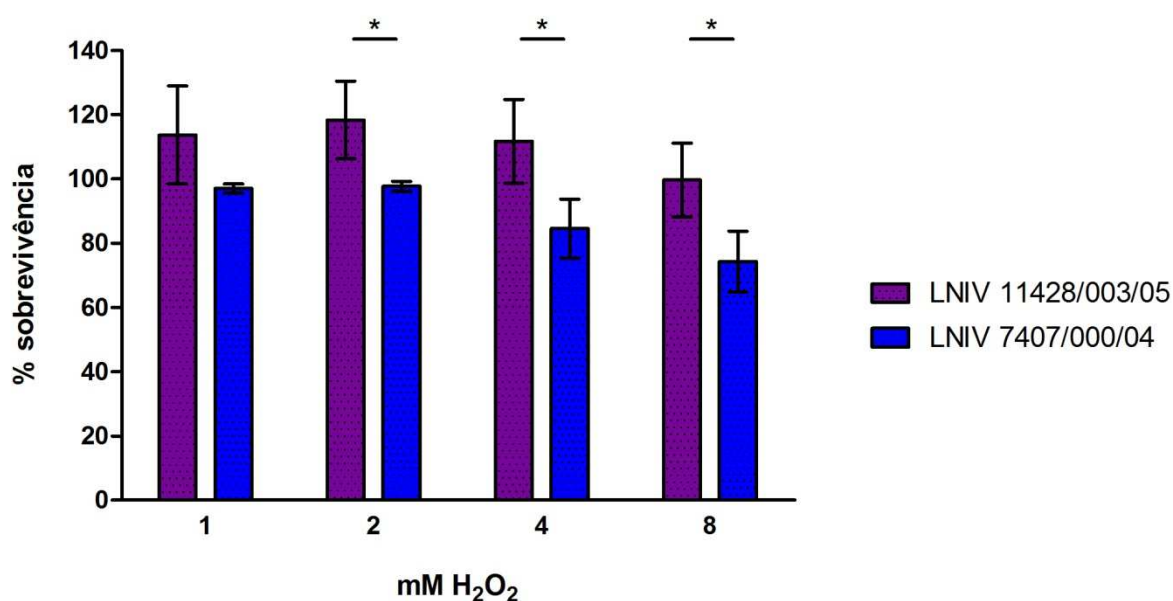


Figura 3.7. Comparação da viabilidade das estirpes LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04, ao fim de 24h, na presença de diferentes concentrações de H₂O₂ (1, 2, 4 e 8 mM). Os resultados apresentados dizem respeito à média de um mínimo de 3 experiências independentes para cada estirpe; as barras de erro representam o desvio padrão; as médias foram consideradas significativamente diferentes para $p < 0,05$ (*).

Para qualquer uma das concentrações estudadas, a estirpe LNIV 11428/003/05 apresentou uma percentagem de sobrevivência superior à encontrada para a estirpe LNIV 7407/000/04, mostrando deste modo, comparativamente, uma maior resistência ao peróxido de hidrogénio.

O facto de a estirpe LNIV 7407/000/04 apresentar alguma susceptibilidade ao H_2O_2 pode, eventualmente, contribuir para um menor sucesso desta estirpe. No entanto, são necessários mais estudos para compreender a tolerância desta estirpe, bem como das outras estirpes em estudo, aos intermediários reactivos de oxigénio.

Neste estudo foi avaliada a viabilidade na presença de H_2O_2 exógeno, que é um composto químico relativamente instável uma vez que se degrada rapidamente. A viabilidade das estirpes pode também ser avaliada na presença de paraquat. Este é um reagente que entra na bactéria e se combina com o oxigénio, levando à formação de anião superóxido, que é depois convertido em H_2O_2 e outros ROIs, pelo que também pode ser utilizado para determinar a capacidade de uma estirpe para eliminar ROIs. Uma alternativa a este tipo de estudos, com vista a investigar se os ROIs contribuem para a inibição do crescimento destas estirpes é, por exemplo, comparar a viabilidade intracelular das estirpes em macrófagos activados, tratados, e não tratados, com enzimas que sabe que neutralizam os ROIs, ou outros compostos que removem múltiplos ROIs (Kish, 2006).

3.2.2.2. Resistência a RNIs

A sobrevivência das estirpes *M. bovis* BCG Pasteur, LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04, foi igualmente determinada ao fim de 24 horas na presença de diferentes concentrações de $NaNO_2$ (figura 3.8), pelo método de contagem do número de CFUs.

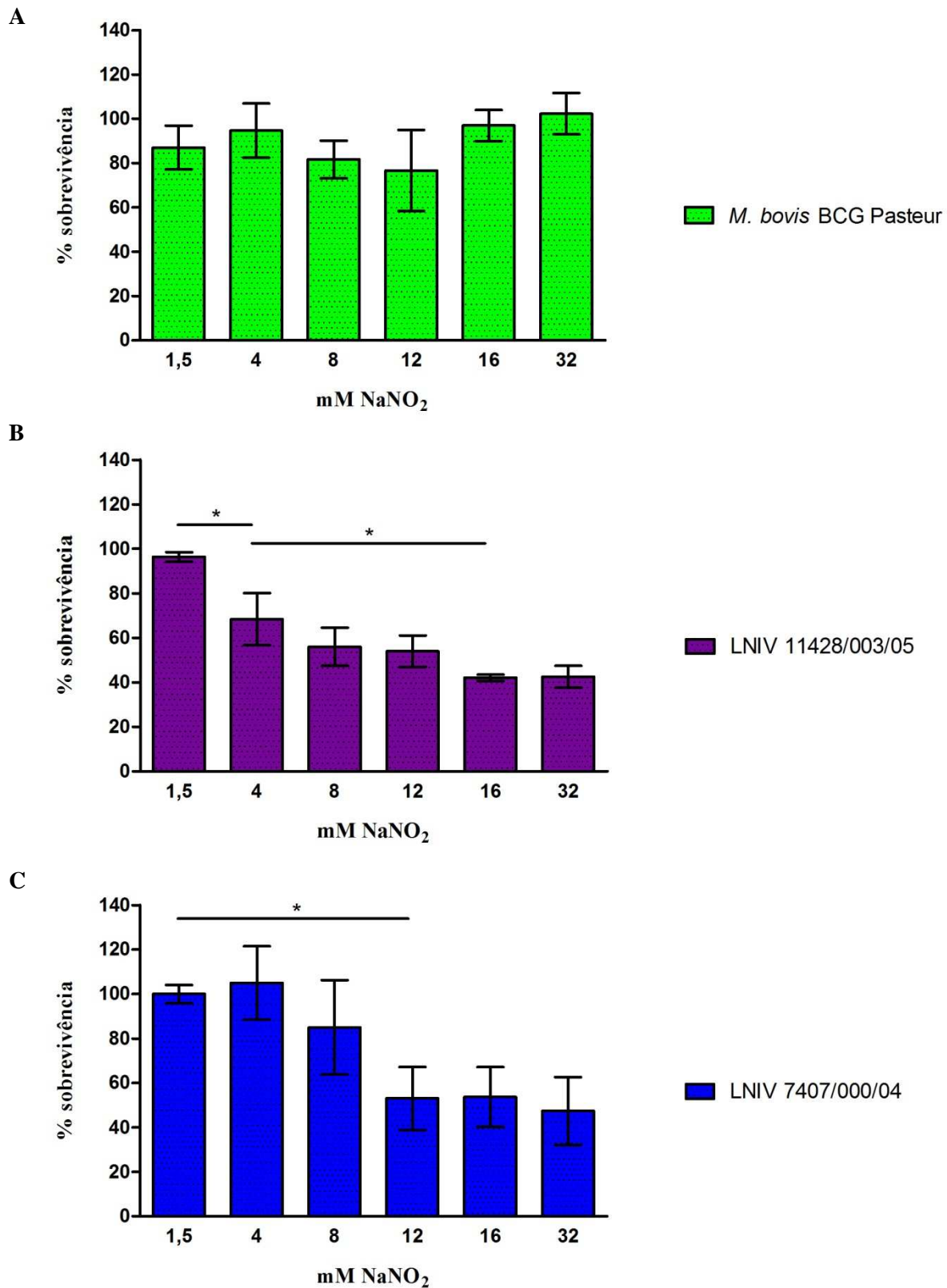


Figura 3.8. Viabilidade das estirpes *M. bovis* BCG Pasteur (A), LNIV 11428/003/05 (B) e LNIV 7407/000/04 (C), ao fim de 24 horas em meio líquido Middlebrook 7H9 com diferentes concentrações de NaNO₂ (1,5, 4, 8, 12, 16 e 32 mM). Os resultados apresentados dizem respeito à média de um mínimo de 3 experiências independentes para cada estirpe; as barras de erro representam o desvio padrão; as médias foram consideradas significativamente diferentes para $p < 0,05$ (*).

Para a estirpe LNIV 11428/003/05, para concentrações iguais e superiores a 4 mM de nitrito de sódio observou-se uma diminuição da viabilidade em cultura; para 1,5 mM a sobrevivência foi próxima dos 100%. Com 4 mM de nitrito de sódio no meio, a sobrevivência desta estirpe rondou os 70%, e entre os 4 e os 12 mM, apesar de as diferenças não serem significativas entre si, observou-se uma diminuição gradual da sobrevivência. Para 16 mM a viabilidade encontrada foi inferior a 50%, não tendo diminuído significativamente para 32 mM de nitrito de sódio. De um modo global, observou-se uma diminuição da viabilidade da estirpe LNIV 11428/003/05 com o aumento da concentração de nitrito de sódio no meio de cultura, mostrando a sua susceptibilidade à presença do composto.

A estirpe LNIV 7407/000/04 apresenta uma sobrevivência próxima dos 100% em meio com 1,5 mM de nitrito de sódio; e para 4 mM parece haver um aumento na sobrevivência, no entanto esta não é uma diferença significativa. Para concentrações iguais e superiores a 8 mM já se observa uma diminuição da viabilidade desta estirpe em cultura, que se torna significativa para 12 mM de nitrito de sódio. Estes resultados mostram que o crescimento da estirpe LNIV 7407/000/04 foi afectado pela presença do nitrito de sódio no meio cultura, revelando igualmente a sua susceptibilidade ao composto.

A viabilidade da estirpe *M. bovis* BCG Pasteur não variou significativamente com o aumento da concentração de nitrito de sódio no meio de cultura; a sua sobrevivência manteve-se elevada. Estes resultados não traduzem o esperado. Com efeito, no já mencionado estudo de Firmani e Riley (Firmani e Riley, 2002), a estirpe *M. bovis* BCG estudada, para 3 e 6 mM de nitrito de sódio, apresentou uma sobrevivência próxima de 30%; no entanto, mais uma vez, deve ser tido em consideração que os autores do trabalho não referem qual a estirpe de *M. bovis* BCG utilizada, e que nem todas as condições experimentais foram idênticas (tempo de incubação com o NaNO_2 , por exemplo). Num outro estudo, realizado por Florio e colaboradores (Florio *et al.*, 2006), a estirpe *M. bovis* BCG Pasteur apresentou também uma grande diminuição da percentagem de sobrevivência ao fim de 24 horas em meio com 5 e 25 mM de um composto que leva à formação de RNIs, contudo, novamente, a experiência não foi idêntica, na sua totalidade, à realizada neste trabalho (nomeadamente no composto utilizado).

Assim sendo, e apesar de existirem algumas diferenças nos trabalhos, visto que os resultados aqui obtidos para a estirpe *M. bovis* BCG Pasteur não se assemelham aos encontrados por outros autores, optou-se por comparar a viabilidade das duas estirpes de campo em estudo, para cada uma das concentrações de NaNO_2 , sem ter em consideração a estirpe *M. bovis* BCG (figura 3.9).

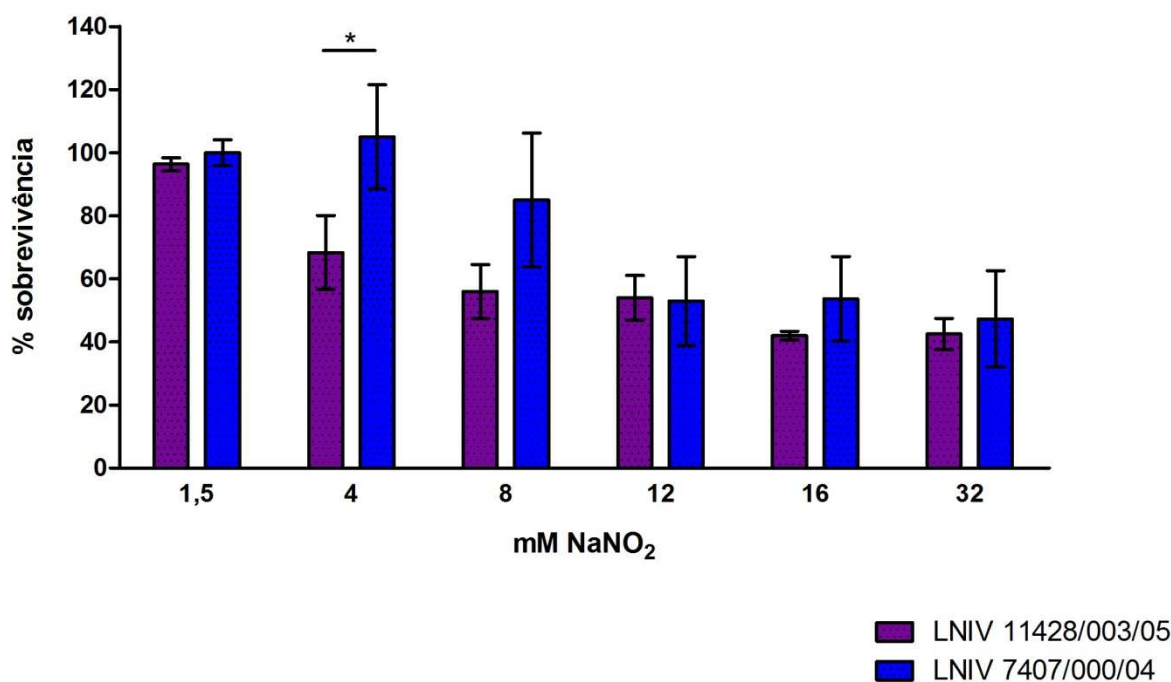


Figura 3.9. Comparação da viabilidade das estirpes LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04, ao fim de 24h, na presença de diferentes concentrações de NaNO₂ (1,5, 4, 8, 12, 16 e 32 mM). Os resultados apresentados dizem respeito à média de um mínimo de 3 experiências independentes para cada estirpe; as barras de erro representam o desvio padrão; as médias foram consideradas significativamente diferentes para $p < 0,05$ (*).

O crescimento das duas estirpes, LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04, na presença de 1,5 mM de nitrito de sódio foi idêntico, e semelhante ao encontrado no controlo, a sobrevivência foi muito próxima dos 100%; ambas as estirpes se revelaram resistentes a esta concentração de nitrito de sódio. Já para uma concentração de 4 mM, a estirpe LNIV 11428/003/05 cresceu significativamente menos que a estirpe LNIV 7407/000/04, cuja sobrevivência se manteve elevada. Também no meio com 8 mM de nitrito de sódio, foi a estirpe LNIV 11428/003/05 que apresentou uma sobrevivência menor. Para concentrações mais elevadas, as estirpes comportaram-se de modo idêntico, mostrando-se igualmente susceptíveis. Curiosamente, para as concentrações nas quais são encontradas diferenças no crescimento das duas estirpes, é a estirpe LNIV 11428/003/05, que pertence ao spoligotipo SB0121, de elevada prevalência e ampla distribuição geográfica em Portugal (Duarte *et al.*, 2008; Matos *et al.*, 2010), que apresenta uma percentagem de sobrevivência inferior, e portanto uma maior susceptibilidade.

No seu conjunto, os resultados obtidos sugerem que as duas estirpes virulentas em estudo, LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04, se comportam de modo distinto na presença de H₂O₂ e NaNO₂. A estirpe LNIV 11428/003/05 apresentou, comparativamente, uma maior resistência ao peróxido de hidrogénio para qualquer uma das concentrações estudadas, no entanto, mostrou uma maior susceptibilidade para 4 e 8 mM de nitrito de sódio.

No futuro, deve ser estudada outra estirpe laboratorial de referência (como seja a estirpe H37Rv), para a qual em estudos anteriores já tenha sido determinada a sua resistência aos ROIs e RNIs, de modo a aferir e controlar melhor as condições experimentais.

Estes são ainda resultados prévios; mais estudos são necessários para compreender o comportamento destas estirpes na presença de ROIs e RNIs, e qual a importância desse comportamento para a diferente frequência e dispersão dos perfis de spoligotyping em estudo.

3.3. Interação micobactéria - macrófago, *in vitro*

M. bovis é uma bactéria intracelular facultativa, que tem como principal célula hospedeira os macrófagos; a interação desta micobactéria com os macrófagos é determinante no estabelecimento da infecção. Assim, as estirpes de campo, LNIV 11428/003/05 (SB0121) e LNIV 7407/000/04 (SB1175), bem como a estirpe de referência *M. bovis* BCG Pasteur, foram caracterizadas quanto ao seu crescimento intracelular nos macrófagos, tendo sido igualmente estudado o efeito resultante da infecção com estas estirpes, na produção de citocinas por parte dos macrófagos.

3.3.1. Observação microscópica da presença intracelular das micobactérias nos macrófagos

A presença intracelular das estirpes *M. bovis* BCG Pasteur, LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04 em macrófagos derivados de medula óssea de ratinho, foi observada, nos dias 0, 2 e 4 após a infecção, por microscopia - após a coloração das micobactérias e macrófagos. Na figura 3.10 encontra-se uma imagem representativa do observado. Ao dia 7 após a infecção observou-se que os macrófagos em cultura se encontravam lisados, e portanto não se procedeu à fixação das células e posterior coloração, uma vez que nestas condições muitos bacilos certamente se localizam extracelularmente.

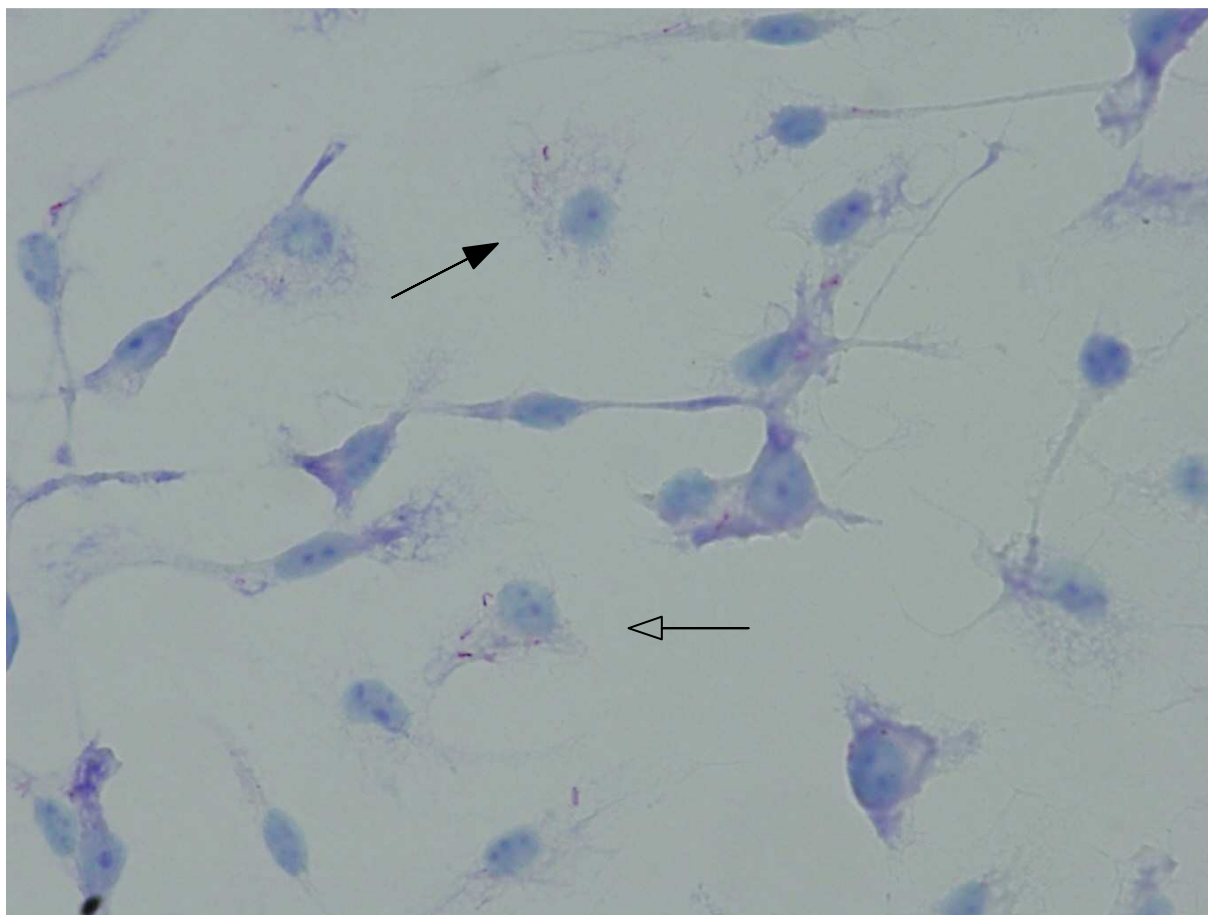


Figura 3.10. Observação microscópica da presença intracelular de *M. bovis* em macrófagos derivados de medula óssea de ratinho. As micobactérias foram coradas pelo método de coloração Ziehl-Neelsen, e os macrófagos com a solução azul do *kit* Hemacolor. Seta fechada: macrófago infectado com apenas um bacilo. Seta aberta: macrófago infectado com mais que um bacilo. Imagem obtida num microscópio Axioplan 2, Carl Zeiss, Inc., com a objectiva de 60x.

As micobactérias, os bacilos corados de cor-de-rosa, localizam-se no interior dos macrófagos, o que mostra que o procedimento de infecção realizado lidou efectivamente com a infecção das células hospedeiras, que internalizaram as micobactérias. Pela observação da figura 3.10 pode ainda constatar-se que nem todos os macrófagos contêm bacilos, pelo que não houve uma infecção de 100% das células, o que já era esperado visto que foi utilizada uma multiplicidade de infecção baixa, de 2 micobactérias por macrófago (2:1). Entre os macrófagos que se encontram infectados, uns contêm apenas uma micobactéria, enquanto outros contêm mais que uma micobactéria.

3.3.2. Avaliação do crescimento intracelular das micobactérias pelo método de contagem do número de CFUs

O sucesso das micobactérias patogênicas, nomeadamente de *M. bovis*, tem sido atribuído à sua capacidade particular para se adaptar ao ambiente adverso encontrado nos macrófagos (Houben *et al.*, 2006).

No presente trabalho, foi avaliada a sobrevivência e crescimento intracelular das estirpes *M. bovis* BCG Pasteur, LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04, em macrófagos derivados de medula óssea de ratinho, ao dia 0, dia 2 e dia 4 após a infecção, pelo método de contagem do número de CFUs (figura 3.11).

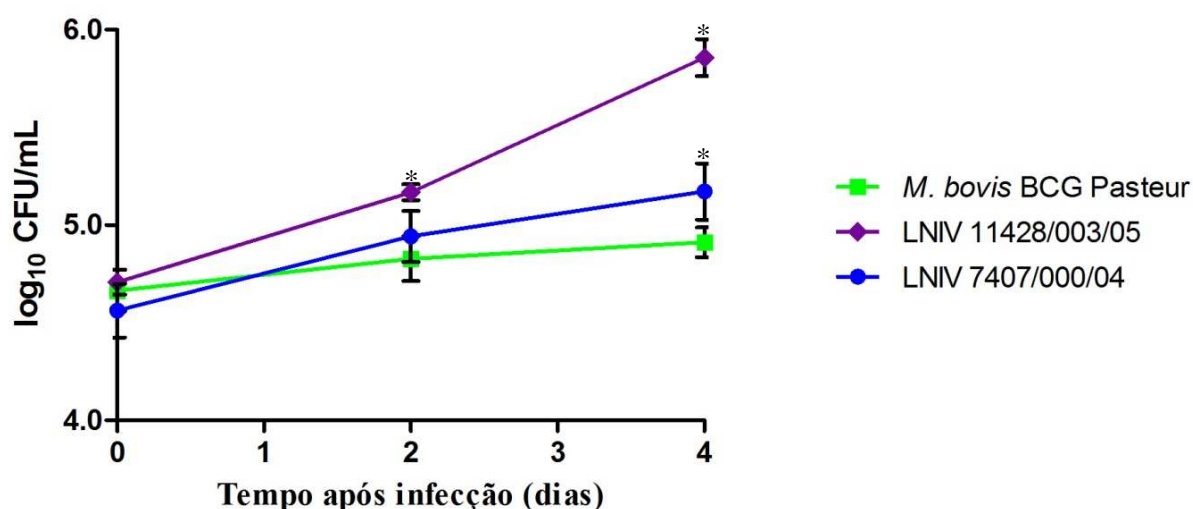


Figura 3.11. Crescimento intracelular das estirpes *M. bovis* BCG Pasteur, LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04, em macrófagos derivados de medula óssea de ratinho. O número de CFUs foi determinado aos dias 0, 2 e 4 após a infecção. Os resultados apresentados dizem respeito à média de, pelo menos, 5 determinações do número de CFU/mL; as barras de erro representam o desvio padrão; as médias foram consideradas significativamente diferentes para $p < 0,05$ (*). O gráfico é representativo de três experiências independentes.

Para o dia 0, que corresponde a 4 horas após a infecção, o valor de log₁₀ CFU/mL é idêntico para qualquer uma das estirpes, mostrando que a invasão dos macrófagos por cada uma destas estirpes, em termos de CFUs fagocitados, foi semelhante. Ao dia 2, o crescimento intracelular da estirpe LNIV 11428/003/05 é significativamente superior ao das estirpes LNIV 7407/000/04 e *M. bovis* BCG Pasteur, que por sua vez, não apresentam diferenças significativas entre si no que diz respeito ao crescimento no interior dos macrófagos. Já ao dia 4, as duas estirpes virulentas, LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04, mostram um crescimento intracelular significativamente superior ao da estirpe

não virulenta *M. bovis* BCG Pasteur, apresentado também a estirpe LNIV 11428/003/05 um crescimento significativamente superior ao da estirpe LNIV 7407/000/04.

O crescimento intracelular destas micobactérias era também para ser determinado ao dia 7 após a infecção, no entanto, observou-se que ao fim deste tempo os macrófagos se encontravam lisados. Embora não tenha sido quantificada, observou-se que a lise nos macrófagos infectados com *M. bovis* BCG Pasteur era menor que a observada para as outras estirpes, o que está de acordo com o maior crescimento das estirpes virulentas de *M. bovis* versus *M. bovis* BCG Pasteur.

Os resultados apresentados mostram que as diferentes estirpes de *M. bovis* estudadas diferem na sua capacidade para crescer nos macrófagos. As duas estirpes virulentas, LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04, isoladas a partir de bovinos, de facto crescem melhor nos macrófagos, por comparação com a estirpe não virulenta *M. bovis* BCG Pasteur, o que sugere que a célula hospedeira controla menos bem a infecção por parte das micobactérias virulentas. Esta diferença observada na capacidade de estirpes virulentas e não virulentas de *M. bovis* para crescer intracelularmente nos macrófagos, já foi anteriormente mencionada em macrófagos de bovino (Aldwell *et al.*, 1996; Wedlock *et al.*, 1999; Aldwell *et al.*, 2001; Hope *et al.*, 2004).

A estirpe LNIV 11428/003/05 é a que apresenta um maior crescimento intracelular nos macrófagos, e portanto, a que se encontra melhor adaptada à sobrevivência e crescimento no interior da célula hospedeira. Esta estirpe é também a que possui o perfil de spoligotyping SB0121, que como já foi referido é nitidamente predominante em Portugal e encontrado em todas as regiões geográficas portuguesas onde existe tuberculose bovina (Duarte *et al.*, 2008; Matos *et al.*, 2010). Estes resultados apontam para a possibilidade de a elevada prevalência e ampla distribuição geográfica deste spoligotipo em Portugal, estar relacionada com uma melhor capacidade de sobrevivência e crescimento destas estirpes no interior dos macrófagos do hospedeiro animal, que favorece o estabelecimento da infecção.

Com o intuito de assegurar que as variações observadas no crescimento das diferentes estirpes se devem apenas ao crescimento intracelular nos macrófagos, e não dependem de crescimento extracelular, deve-se na continuação deste estudo avaliar a morte celular por necrose em cada infecção.

3.3.3. Avaliação do conteúdo em citocinas por ELISA

Em resposta à presença das micobactérias, os macrófagos secretam diversas citocinas que, no seu conjunto, determinam o resultado da infecção (Cooper *et al.*, 2011).

Neste trabalho, optou-se por avaliar a secreção de uma citocina pró-inflamatória e de uma citocina anti-inflamatória, tendo-se escolhido o TNF- α e a IL-10, respectivamente. O TNF- α é descrito

como extremamente importante na defesa do hospedeiro contra a infecção, e a IL-10 como citocina relevante na modulação da resposta à presença das micobactérias.

Os sobrenadantes das culturas celulares dos macrófagos infectados com as estirpes *M. bovis* BCG Pasteur, LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04, foram recolhidos às 6h e às 24h após a infecção, e estudados por ELISA, para determinação do conteúdo em TNF- α e em IL-10. De entre os vários ensaios que foram realizados para a IL-10, só num, e apenas para uma das experiências independentes, é que houve desenvolvimento da reacção. Visto que com os dados relativos a apenas uma experiência independente não se podem tirar conclusões, estes resultados não vão ser apresentados ou analisados. Os resultados obtidos para o TNF- α encontram-se apresentados na figura 3.12.

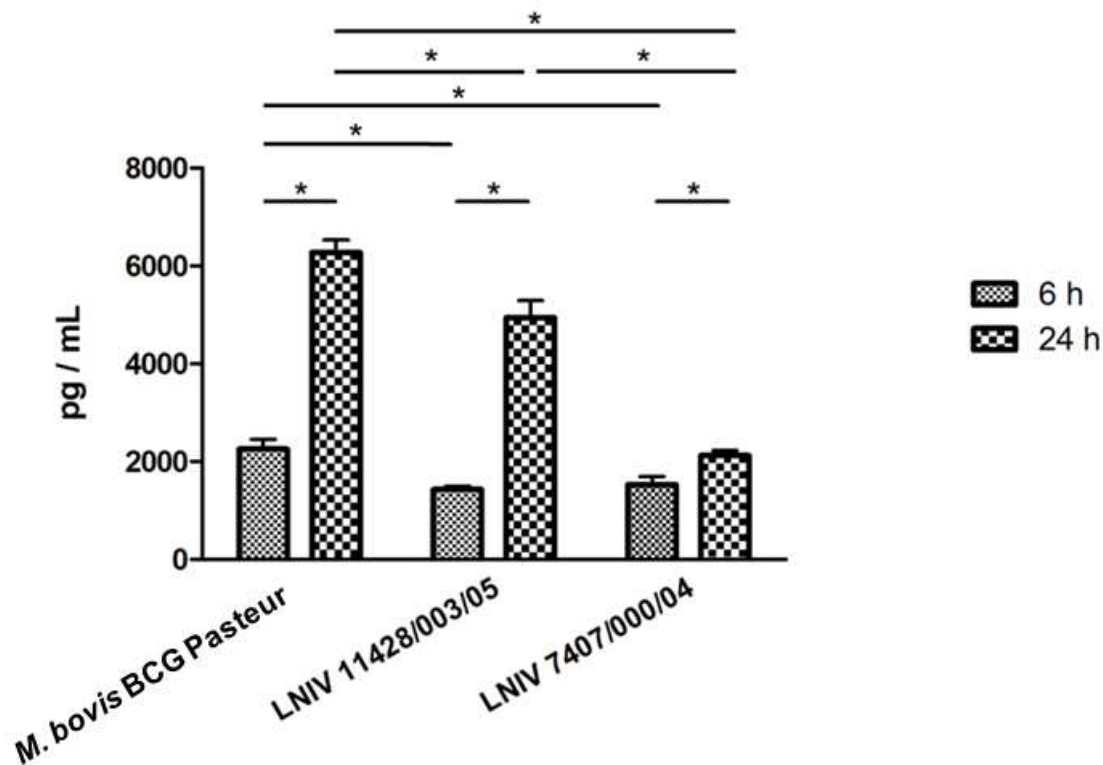


Figura 3.12. Produção do factor de necrose tumoral α , TNF- α , pelos macrófagos infectados com as estirpes *M. bovis* BCG Pasteur, LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04. Os sobrenadantes foram recolhidos às 6h e às 24h após a infecção, e o seu conteúdo em TNF- α foi determinado por ELISA. Os resultados apresentados dizem respeito à média de 3 determinações da concentração de TNF- α nos sobrenadantes; as barras de erro representam o desvio padrão; as médias foram consideradas significativamente diferentes para $p < 0,05$ (*). O gráfico é representativo de três experiências independentes. Nota: como se observou alguma variabilidade nos valores de concentração de TNF- α determinados nas três experiências, procedeu-se a uma análise meramente qualitativa dos dados.

A presença de TNF- α foi detectada nas culturas celulares dos macrófagos infectados com qualquer uma das estirpes de *M. bovis* estudadas; já nas culturas de macrófagos não infectados, utilizadas como controlo, não foi detectada esta citocina. Estes resultados mostram que os macrófagos produzem, e secretam, TNF- α em resposta à presença destas micobactérias. A produção de TNF- α por macrófagos infectados com estirpes de *M. bovis* já foi anteriormente descrita em diversos estudos (Wedlock *et al.*, 1999; Hope *et al.*, 2004; Denis e Buddle, 2008).

Para as estirpes *M. bovis* BCG Pasteur e LNIV 11428/003/05, a concentração de TNF- α detectada nos sobrenadantes recolhidos 6h após a infecção é significativamente inferior à concentração encontrada nos sobrenadantes recolhidos às 24 horas. Portanto, a secreção de TNF- α pelos macrófagos infectados com estas estirpes ocorre durante, e após, as primeiras 6 horas que seguem a infecção. No que diz respeito à estirpe LNIV 7407/000/04, embora a concentração de TNF- α detectada às 6 horas seja significativamente diferente da detectada às 24 horas, os valores encontrados são muito próximos, não se observando um aumento considerável da secreção desta citocina após as 6 horas. Uma possível justificação para esta variação pequena é estar a ocorrer morte celular dos macrófagos infectados com esta estirpe após as seis primeiras horas que seguem a infecção, e portanto existir um menor número de células em cultura a secretar TNF- α . No caso de se confirmar, a morte celular, por apoptose, dos macrófagos infectados com a estirpe LNIV 7404/000/04, pode também constituir uma explicação para um menor crescimento intracelular desta estirpe, comparativamente à outra estirpe virulenta estudada. Já está descrito que a apoptose dos macrófagos infectados com micobactérias pode constituir uma estratégia para limitar o crescimento destas bactérias no interior da sua principal célula hospedeira, e contribuir deste modo para a defesa do hospedeiro (Fratuzzi *et al.*, 1999).

A produção de TNF- α induzida pelas estirpes LNIV 11428/003/05 e LNIV 7407/000/04 às 6h após a infecção foi idêntica, e apesar de ter sido significativamente inferior à induzida pela estirpe não virulenta *M. bovis* BCG Pasteur, a concentração de TNF- α detectada nos sobrenadantes das três estirpes foi na verdade aproximada. Já para as 24 horas após a infecção, a produção desta citocina induzida pelas duas estirpes virulentas foi inferior, comparativamente à estirpe *M. bovis* BCG Pasteur. Em particular, na infecção com a estirpe LNIV 7407/000/04 foi detectada uma concentração de TNF- α menor. Estes resultados mostram que, numa fase inicial da infecção, as estirpes virulentas de *M. bovis* em estudo induziram uma menor produção de TNF- α por parte dos macrófagos infectados, por comparação com a estirpe *M. bovis* BCG Pasteur. Estes resultados são curiosos na medida em que o TNF- α é uma citocina pró-inflamatória, que desempenha um papel importante na defesa do hospedeiro contra a infecção. Estudos idênticos, relativos ao efeito da infecção de macrófagos, com estirpes virulentas e não virulentas de *M. bovis*, na expressão de mRNA TNF- α e produção de TNF- α por estas células, mostram resultados distintos, nos quais as estirpes virulentas induzem uma maior expressão de mRNA TNF- α e produção da citocina, que a estirpe *M. bovis* BCG (Aldwell *et al.*, 1996; Wedlock *et al.*, 1999; Hope *et al.*, 2004).

4. Considerações finais

A tuberculose bovina é uma doença animal de grande importância; para além de ter um grande impacto sócio-económico, constitui uma preocupação para a saúde pública devido ao seu potencial zoonótico. Em Portugal têm sido feitos esforços no sentido de erradicar a doença, nomeadamente pela implementação do programa de erradicação da tuberculose bovina e, mais recentemente, do plano de controlo e erradicação da tuberculose em caça maior. Adicionalmente, a grande maioria das estirpes de *Mycobacterium bovis* isoladas nos últimos anos, a partir de bovinos e outros hospedeiros ocasionais, como veados e javalis, têm sido caracterizadas epidemiologicamente, através da genotipagem por spoligotyping e MIRU-VNTR. Nestes estudos, constatou-se que o spoligotipo SB0121 é nitidamente predominante, sendo encontrado em diversos hospedeiros e em todas as regiões geográficas onde existe tuberculose bovina e que, pelo contrário, o spoligotipo SB1175, claramente distinto do spoligotipo SB0121, foi isolado exclusivamente e uma única vez em Portugal, a partir de um bovino. Tendo por base estas evidências, o presente trabalho teve como principal objectivo o estudo de uma estirpe representativa do spoligotipo SB0121 e da única estirpe do spoligotipo SB1175, na perspectiva de avaliar se a diferente frequência e dispersão destes perfis de spoligotyping pode ser explicada pelo diferente sucesso, enquanto agentes patogénicos, das estirpes pertencentes a cada spoligotipo. Afinal a compreensão da patogenicidade por *M. bovis* é também fundamental para o desenvolvimento de estratégias com vista a combater a doença.

A abordagem experimental focou-se na determinação da curva de crescimento e estudo da resistência ao stress oxidativo e nitrosativo em meio líquido, bem como na avaliação da capacidade destas estirpes para se multiplicarem em macrófagos e no efeito da infecção na produção de citocinas.

A utilização de dois métodos distintos para a determinação da curva de crescimento revelou-se importante uma vez que, por si só, os métodos originaram resultados que não são concordantes mas, no seu conjunto, e tendo por base as características de cada um, levantaram questões importantes. O facto de as estirpes virulentas terem apresentado, comparativamente à estirpe *M. bovis* BCG, um crescimento mais lento pela contagem dos CFUs mas mais rápido pela leitura da densidade óptica, em particular a estirpe LNIV 11428/003/05 (SB0121), é um aspecto que deve ser futuramente averiguado.

Igualmente interessante, será dar continuidade aos estudos de resistência aos intermediários reactivos de oxigénio e azoto, e tentar perceber o papel desempenhado por estes compostos na infecção por estas estirpes e qual a sua real importância para a protecção do organismo hospedeiro. Afinal as duas estirpes virulentas apresentaram comportamentos distintos, e a estirpe LNIV 11428/003/05 (SB0121), que apresentou maior resistência ao peróxido de hidrogénio, apresentou maior susceptibilidade ao nitrito de sódio. Também importante será incluir outra estirpe laboratorial de referência, para a qual noutros estudos já tenha sido determinada a sua resistência aos ROIs e RNIs.

No que diz respeito aos estudos de interação entre micobactérias e macrófagos, optou-se por trabalhar com macrófagos derivados de medula óssea de ratinho, que são frequentemente utilizados em estudos de infecção com *M. tuberculosis*. A estirpe LNIV 11428/003/05 (SB0121) foi a que apresentou um maior crescimento intracelular, revelando uma melhor adaptação à sobrevivência no interior da célula hospedeira. Estes resultados, embora prévios, sugerem que a elevada prevalência e ampla distribuição geográfica do spoligotipo SB0121 pode estar relacionada com uma maior capacidade de sobrevivência e crescimento destas estirpes nos macrófagos, que favorece o estabelecimento da infecção. A produção de TNF- α entre as 6 e as 24 horas após a infecção aumentou na infecção com a estirpe LNIV 11428/003/05 (SB0121), mas manteve-se idêntica com a estirpe LNIV 7407/000/04 (SB1175). Em trabalhos futuros será interessante avaliar a morte celular dos macrófagos durante a infecção com cada uma das estirpes e, neste contexto, garantir que as variações observadas no crescimento intracelular não dependem de crescimento extracelular, e ainda, estudar a possibilidade de a pequena variação na produção de TNF- α entre as 6 e as 24 horas após a infecção, e o menor crescimento intracelular, para a estirpe LNIV 7404/000/04 (SB1175), se dever à morte celular dos macrófagos infectados.

No seu global, este estudo constitui uma primeira abordagem no que diz respeito ao comportamento de *M. bovis* e à sua interação com as células hospedeiras, que deve ser continuado com vista a compreender e justificar os resultados observados. Ainda importante será estudar um maior número de estirpes, e incluir neste estudo outros spoligotipos igualmente relevantes.

Bibliografia

- Akira, S., Uematsu, S. e Takeuchi, O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 124:783-801.
- Aldwell, F.E., Wedlock, D.N. e Buddle, B.M. 1996. Bacterial metabolism, cytokine mRNA transcription and viability of bovine alveolar macrophages infected with *Mycobacterium bovis* BCG or virulent *M. bovis*. *Immunology and Cell Biology*. 74:45-51.
- Aldwell, F.E., Wedlock, D.N., Slobbe, L.J., Griffin, J.F., Buddle, B.M. e Buchan G.S. 2001. In vitro control of *Mycobacterium bovis* by macrophages. *Tuberculosis*. 81:115-123.
- Alexander, K.A., Laver, P.N., Michel, A.L., Williams, M., van Helden, P.D., Warren, R.M. e van Pittius, N.C.G. 2010. Novel *Mycobacterium Tuberculosis* Complex Pathogen, *M. mungi*. *Emerging Infectious Diseases*. 16:1296-1299.
- Allen, B.W. 1998. Mycobacteria: General Culture and Methodology and Safety Considerations. *In Mycobacteria Protocols* (T. Parish e N.G. Stoker eds), 1ª ed., pp 15-30, Humana Press, New Jersey.
- Aranaz, A., Cousins, D., Mateos, A. e Dominguez, L. 2003. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz *et al.* 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53:1785-1789.
- Bafica, A., Scanga, C.A., Feng, C.G., Leifer, C., Cheever, A. e Sher, A. 2005. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Experimental Medicine*. 202:1715-1724.
- Bartos, M., Falkinham, J.O. e Pavlik, I. 2004. Mycobacterial catalases, peroxidases, and superoxide dismutases and their effects on virulence and isoniazid-susceptibility in mycobacteria – a review. *Veterinari Medicina*. 49:161-170.
- Behr, M.A., Wilson, M.A., Gill, W.P., Salamon, H., Schoolnik, G.K., Rane, S. e Small, P.M. 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science*. 284:1520-1523.

- Bhamidi, S., Scherman, M.S., Jones, V., Crick, D.C., Belisle, J.T., Brennan, P.J. e McNeil, M.R. 2011. Detailed structural and quantitative analysis reveals the spatial organization of the cell walls of in vivo grown *Mycobacterium leprae* and in vitro grown *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Biological Chemistry*. 286:23168-23177.
- Boddinghaus, B., Rogall, T., Flohr, T., Blocker, H. e Bottger, E. 1990. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *Journal of Clinical Microbiology*. 28:1751-1759.
- Brightbill, H.D., Libraty, D.H., Krutzik, S.R., Yang, R.B., Belisle, J.T., Bleharski, J.R., Maitland, M., Norgard, M.V., Plevy, S.E., Smale, S.T., Brennan, P.J., Bloom, B.R., Godowski, P.J. e Modlin, R.L. 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*. 285:732-736.
- Briken, V., Porcelli, S.A., Besra, G.S. e Kremer, L. 2004. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Molecular Microbiology*. 53:391-403.
- Brosch, R., Gordon, S.V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L.M., Pym, A.S., Samper, S., Van Soolingen, D. e Cole, S.T. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PNAS*. 99:3684-3689.
- Brosch, R., Gordon, S.V., Pym, A., Eiglmeier, K., Garnier, T. e Cole, S.T. 2000. Comparative genomics of the mycobacteria. *International Journal of Medical Microbiology*. 290:143-152.
- Brugmann, W.B. e Firmani, M.A. 2005. Low concentrations of nitric oxide exert a hormetic effect on *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. *Journal of Clinical Microbiology*. 43:4844-4846.
- Caimi, K., Romano, M.I., Alito, A., Zumarraga, M., Bigi, F. e Cataldi, A. 2001. Sequence analysis of the direct repeat region in *Mycobacterium bovis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 39:1067-1072.
- Carpenter, E., Fray, L. e Gormley, E. 1998. Antigen-specific lymphocytes enhance nitric oxide production in *Mycobacterium bovis* BCG-infected bovine macrophages. *Immunology and Cell Biology*. 76:363-368.

Chan, E.D., Chan, J. e Schluger, N.W. 2001. What is the role of nitric oxide in murine and human host defense against tuberculosis? Current knowledge. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 25:606-612.

Chua, J. e Deretic, V. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* reprograms waves of phosphatidylinositol 3-phosphate on phagosomal organelles. *The Journal of Biological Chemistry*. 279:36982-36992.

Cole, S.T., Brosch, R. e Parkhill, J. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 393:537-544.

Cooper, A.M., Mayer-Barber, K.D. e Sher, A. 2011. Role of innate cytokines in mycobacterial infection. *Mucosal Immunology*. 4:252-260.

Cousins, D.V. 2001. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Revue Scientifique et Technique*. 20:71-85.

Cousins, D.V., Bastida, R., Cataldi, A., Quse, V., Redrobe, S., Dow, S., Duignan, P., Murray, A., Dupont, C., Ahmed, N., Collins, D.M., Butler, W.R., Dawson, D., Rodriguez, D., Loureiro, J., Romano, M.I., Alito, A., Zumarraga, M. e Bernardelli, A. 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53:1305-1314.

Denis, M. e Buddle, B.M. 2008. Bovine dendritic cells are more permissive for *Mycobacterium bovis* replication than macrophages, but release more IL-12 and induce better immune T-cell proliferation. *Immunology and Cell Biology*. 86:185-191.

Direcção Geral de Veterinária (DGV). 2010. Programa de erradicação da tuberculose bovina.

Direcção Geral de Veterinária (DGV). 2011a. Programa de erradicação da tuberculose bovina.

Direcção Geral de Veterinária (DGV). 2011b. Programa de controlo e erradicação da tuberculose em caça maior.

Duarte, E.L., Domingos, M., Amado, A. e Botelho, A. 2008. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. *Veterinary Microbiology*. 130: 415-421.

- Duarte, E.L., Domingos, M., Amado, A., Cunha, M.V. e Botelho, A. 2010. MIRU-VNTR typing adds discriminatory value to groups of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* strains defined by spoligotyping. *Veterinary Microbiology*. 143:299-306.
- Durr, P.A., Clifton-Hadley, R.S. e Hewinson, R.G. 2000. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis II. Applications of genotyping. *Revue Scientifique et Technique*. 19:689-701.
- Ehrt, S., Shiloh, M.U., Ruan, J., Choi, M., Gunzburg, S., Nathan, C., Xie, Q. e Riley, L.W. 1997. A novel antioxidant gene from *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Experimental Medicine*. 186:1885-1896.
- Erler, W., Martin, G., Sachse, K., Naumann, L., Kahlau, D., Beer, J., Bartos, M., Nagy, G., Cvetnic, Z., Zolnir-Dovc, M. e Pavlik, I. 2004. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* isolates from central Europe. *Journal of Clinical Microbiology*. 42:2234-2238.
- Ferrari, G., Langen, H., Naito, M. e Pieters, J. 1999. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell*. 97:435-447.
- Firmani, M.A. e Riley, L.W. 2002. *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 is resistant to reactive nitrogen and oxygen intermediates in vitro. *Infection and Immunity*. 70: 3965–3968.
- Flannagan, R.S., Cosío, G. e Grinstein, S. 2009. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature Reviews. Microbiology*. 7:355-366.
- Flesch, I.E. e Kaufmann, S.H. 1991. Mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma interferon-activated bone marrow macrophages: role of reactive nitrogen intermediates. *Infection and Immunity*. 59:3213-3218.
- Florio, W., Batoni, G., Esin, S., Bottai, D., Maisetta, G., Favilli, F., Brancatisano, F.L. e Campa, M. 2006. Influence of culture medium on the resistance and response of *Mycobacterium bovis* BCG to reactive nitrogen intermediates. *Microbes and Infection*. 8:434-441.
- Fratazzi, C., Arbeit, R.D., Carini, C., Balcewicz-Sablinska, M.K., Keane, J., Kornfeld, H. e Remold, H.G. 1999. Macrophage apoptosis in mycobacterial infections. *Journal of Leukocyte Biology*. 66:763-764.

Fratti, R.A., Chua, J., Vergne, I. e Deretic, V. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. PNAS. 100:5437-5442.

Frothingham, R. e Meeker-O'Connell, W. A. 1998. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiology. 144:1189-1196.

Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J.C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., Duthoy, S., Grondin, S., Lacroix, C., Monsempe, C., Simon, S., Harris, B., Atkin, R., Doggett, J., Mayes, R., Keating, L., Wheeler, P.R., Parkhill, J., Barrell, B.G., Cole, S.T., Gordon, S.V. e Hewinson, R.G. 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. PNAS. 100:7877-7882.

Gatfield, J. e Pieters, J. 2000. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. Science. 288:1647-50.

Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Lyakh, L.A., Batoni, G., Esin, S., Winkler-Pickett, R.T., Consolaro, M.R., De Marchi, M., Giachino, D., Robbiano, A., Astegiano, M., Sambataro, A., Kastelein, R.A., Carra, G. e Trinchieri, G. 2008. Differential regulation of interleukin 12 and interleukin 23 production in human dendritic cells. The Journal of Experimental Medicine. 205:1447-1461.

Gordon, S.V., Brosch, R., Billault, A., Garnier, T., Eiglmeier, K. e Cole, S.T. 1999. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. Molecular Microbiology. 32:643-655.

Groenen, P.M., Bunschoten, A.E., van Soolingen, D. e van Embden, J.D. 1993. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. Molecular Microbiology. 10:1057-1065.

Guerin, M.E., Korduláková, J., Alzari, P.M., Brennan, P.J. e Jackson, M. 2010. Molecular basis of phosphatidyl-myo-inositol mannoside biosynthesis and regulation in mycobacteria. The Journal of Biological Chemistry. 285:33577-33583.

Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M. e Weaver, C.T. 2005. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nature Immunology. 6:1123-1132.

Hartmans, S., De Bont, J.A.M. e Stackebrandt, E. 2006. The Genus *Mycobacterium* – Nonmedical. In Prokaryotes, Vol. 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes (M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer e E. Stackebrandt eds), 3^a ed., pp 889-918, Springer, New York.

Hermans, P.W., van Soolingen, D., Bik, E.M., de Haas, P.E., Dale, J.W. e van Embden, J.D. 1991. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. Infection and Immunity. 59:2695-2705.

Hope, J.C., Thom, M.L., McCormick, P.A. e Howard, C.J. 2004. Interaction of antigen presenting cells with mycobacteria. Veterinary Immunology and Immunopathology. 100:187-195.

Houben, E.N., Nguyen, L. e Pieters, J. 2006. Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system. Current Opinion in Microbiology. 9:76-85.

Jahans, K., Palmer, S., Inwald, J., Brown, J. e Abayakoon, S. 2004. Isolation of *Mycobacterium microti* from a male Charolais-Hereford cross. The Veterinary Record. 155:373-374.

Jang, S., Uematsu, S., Akira, S. e Salgame, P. 2004. IL-6 and IL-10 induction from dendritic cells in response to *Mycobacterium tuberculosis* is predominantly dependent on TLR2-mediated recognition. Journal of Immunology. 173:3392-3397.

Jordao, L., Bleck, C.K., Mayorga, L., Griffiths, G. e Anes, E. 2008. On the killing of mycobacteria by macrophages. Cellular Microbiology. 10:529-548.

Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M. e van Embden, J. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. Journal of Clinical Microbiology. 35:907-914.

Kang, S.K., Jung, Y.J., Kim, C.H. e Song, C.Y. 1998. Extracellular and cytosolic iron superoxide dismutase from *Mycobacterium bovis* BCG. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 5:784-789.

Kawai, T. e Akira, S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nature Immunology. 11: 373-384.

Keane, J., Balcewicz-Sablinska, M.K., Remold, H.G., Chupp, G.L., Meek, B.B., Fenton, M.J. e Kornfeld, H. 1997. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infection and Immunity*. 65:298-304.

Khader, S.A. e Cooper, A.M. 2008. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine*. 41:79-83.

Kiers, A., Klarenbeek, A., Mendelts, B., van Soolingen, D. e Koeter, A. 2008. Transmission of *Mycobacterium pinnipedii* to humans in a zoo with marine mammals. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 12:1469-1473.

Kindt, T.J., Goldsby, R.A. e Osborne, B.A. 2007. *Kuby Immunology*. W.H. Freeman and Company, New York.

Kish, R. 2006. A new insight into *Mycobacterium* resistance to reactive oxygen intermediates. Tese de Mestrado. Faculty of the Graduate School, University of Maryland.

Kleinnijenhuis, J., Oosting, M., Joosten, L.A., Netea, M.G. e Van Crevel, R. 2011. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical & Developmental Immunology*. 2011:405310.

Korbel, D.S., Schneider, B.E. e Schaible, U.E. 2008. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes and Infection*. 10:995-1004.

Kusunose, E., Ichihara, K., Noda, Y. e Kusunose, M. 1976. Superoxide dismutase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biochemistry*. 80:1343-1352.

Ladel, C.H., Szalay, G., Riedel, D. e Kaufmann, S.H. 1997. Interleukin-12 secretion by *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. *Infection and Immunity*. 65:1936-1938.

Lévy-Frébault, V.V. e Portaels, F. 1992. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 42:315-323.

Madigan, M.T. e Martinko, J.M. 2006. *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson Prentice Hall, New Jersey.

- Mahairas, G.G., Sabo, P.J., Hickey, M.J., Singh, D.C. e Stover, C.K. 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *Journal of Bacteriology*. 178:1274-1282.
- Manca, C., Paul, S., Barry, C.E. 3rd, Freedman, V.H. e Kaplan, G. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* catalase and peroxidase activities and resistance to oxidative killing in human monocytes in vitro. *Infection and Immunity*. 67:74-79.
- Matos, F. 2009. Tipificação molecular de estirpes de *Mycobacterium bovis* isoladas de animais silváticos e domésticos. Tese de Mestrado. Universidade Nova de Lisboa.
- Matos, F., Cunha, M.V., Canto, A., Albuquerque, T., Amado, A. e Botelho, A. 2010. Snapshot of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* infections in livestock in a bovine tuberculosis low incidence scenario. *Journal of Clinical Microbiology*. 48:4337-4339.
- Matsuzaki, G. e Umemura, M. 2007. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiology and Immunology*. 51: 1139-1147.
- Milian-Suazo, F., Harris, B., Arriaga Díaz, C., Romero Torres, C., Stuber, T., Alvarez Ojeda, G., Morales Loredó, A., Perez Soria, M. e Payeur J.B. 2008. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*: usefulness in international trade. *Preventive Veterinary Medicine*. 87:261-271.
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L. e O'Garra, A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology*. 19:683-765.
- Moser, I., Prodinger, W.M., Hotzel, H., Greenwald, R., Lyashchenko, K.P., Bakker, D., Gomis, D., Seidler, T., Ellenberger, C., Hetzel, U., Wuennemann, K. e Moisson, P. 2008. *Mycobacterium pinnipedii*: transmission from South American sea lion (*Otaria byronia*) to Bactrian camel (*Camelus bactrianus bactrianus*) and Malayan tapirs (*Tapirus indicus*). *Veterinary Microbiology*. 127:399-406.
- Mustafa, A.S., Al-Attiyah, R., Hanif, S.N. e Shaban, F.A. 2008. Efficient testing of large pools of *Mycobacterium tuberculosis* RD1 peptides and identification of major antigens and immunodominant peptides recognized by human Th1 cells. *Clinical and Vaccine Immunology*. 15:916-924.
- Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H. e Okamura, H. 2001. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annual Review of Immunology*. 19:423-474.

Newton, S.M., Smith, R.J., Wilkinson, K.A., Nicol, M.P., Garton, N.J., Staples, K.J., Stewart, G.R., Wain, J.R., Martineau, A.R., Fandrich, S., Smallie, T., Foxwell, B., Al-Obaidi, A., Shafi, J., Rajakumar, K., Kampmann, B., Andrew, P.W., Ziegler-Heitbrock, L., Barer, M.R. e Wilkinson, R.J. 2006. A deletion defining a common Asian lineage of *Mycobacterium tuberculosis* associates with immune subversion. PNAS. 42:15594-15598.

Noss, E.H., Pai, R.K., Sellati, T.J., Radolf, J.D., Belisle, J., Golenbock, D.T., Boom, W.H. e Harding, C.V. 2001. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Immunology. 167:910-918.

O'Brien, L., Carmichael, J., Lowrie, D.B. e Andrew, P.W. 1994. Strains of *Mycobacterium tuberculosis* differ in susceptibility to reactive nitrogen intermediates in vitro. Infection and Immunity. 62:5187-5190.

O'Reilly, L.M. e Daborn, C.J. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. Tubercle and Lung Disease. 76:1-46.

Ocepek, M., Pate, M., Zolnir-Dovc, M. e Poljak, M. 2005. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from human to cattle. Journal of Clinical Microbiology. 43:3555-3557.

Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J.C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y., Abrams, J.S., Moore, K.W., Rennick, D., de Waal-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, J.F. e Kastelein, R.A. 2000. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. Immunity. 13:715-725.

Pai, R.K., Convery, M., Hamilton, T.A., Boom, W.H. e Harding, C.V. 2003. Inhibition of IFN-gamma-induced class II transactivator expression by a 19-kDa lipoprotein from *Mycobacterium tuberculosis*: a potential mechanism for immune evasion. Journal of Immunology. 171:175-184.

Pathak, S.K., Basu, S., Basu, K.K., Banerjee, A., Pathak, S., Bhattacharyya, A., Kaisho, T., Kundu, M. e Basu, J. 2007. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. Nature Immunology. 8:610-618.

- Pecora, N.D., Fulton, S.A., Reba, S.M., Drage, M.G., Simmons, D.P., Urankar-Nagy, N.J., Boom, W.H. e Harding, C.V. 2009. *Mycobacterium bovis* BCG decreases MHC-II expression in vivo on murine lung macrophages and dendritic cells during aerosol infection. *Cellular Immunology*. 254:94-104.
- Pieters, J. 2001. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes and Infection*. 3:249-255.
- Pollock, J.M., McNair, J., Welsh, M.D., Girvin, R.M., Kennedy, H.E., Mackie, D.P. e Neill, S.D. 2001. Immune responses in bovine tuberculosis. *Tuberculosis*. 81:103-107.
- Pym, A.S., Brodin, P., Brosch, R., Huerre, M. e Cole, S.T. 2002. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Molecular Microbiology*. 46:709-717.
- Quesniaux, V., Fremont, C., Jacobs, M., Parida, S., Nicolle, D., Yeremeev, V., Bihl, F., Erard, F., Botha, T., Drennan, M., Soler, M.N., Le Bert, M., Schnyder, B. e Ryffel, B. 2004. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes and Infection*. 6:946-959.
- Rahim, Z., Möllers, M., te Koppele-Vije, A., de Beer, J., Zaman, K., Matin, M.A., Kamal, M., Raquib, R., van Soolingen, D., Baqi, M.A., Heilmann, F.G. e van der Zanden, A.G. 2007. Characterization of *Mycobacterium africanum* subtype I among cows in a dairy farm in Bangladesh using spoligotyping. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 38:706-713.
- Reljic, R., Stylianou, E., Balu, S. e Ma, J.K. 2010. Cytokine interactions that determine the outcome of mycobacterial infection of macrophages. *Cytokine*. 51:42-46.
- Rhoades, E.R. e Orme, I.M. 1997. Susceptibility of a panel of virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* to reactive nitrogen intermediates. *Infection and Immunity*. 65:1189-1195.
- Robinson, J.M. 2008. Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochemistry and Cell Biology*. 130:281-297.
- Rodríguez, E., Sánchez, L.P., Pérez, S., Herrera, L., Jiménez, M.S., Samper, S. e Iglesias, M.J. 2009. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* in Spain, 2004-2007. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 13:1536-1541.

- Saleh, M.T. e Belisle, J.T. 2000. Secretion of an acid phosphatase (SapM) by *Mycobacterium tuberculosis* that is similar to eukaryotic acid phosphatases. *Journal of Bacteriology*. 182:6850-6853.
- Saunders, B.M. e Britton, W.J. 2007. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunology and Cell Biology*. 85:103-11.
- Saviola, B. e Bishai, W. 2006. The Genus *Mycobacterium* – Medical. In *Prokaryotes*, Vol. 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes (M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer e E. Stackebrandt eds), 3^a ed., pp 919-933, Springer, New York.
- Schlesinger, L.S., Bellinger-Kawahara, C.G., Payne, N.R. e Horwitz, M.A. 1990. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *Journal of Immunology*. 144:2771–2780.
- Schlesinger, L.S., Hull, S.R. e Kaufman, T.M. 1994. Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages. *Journal of Immunology*. 152:4070-4079.
- Schneider, B.E., Korb, D., Hagens, K., Koch, M., Raupach, B., Enders, J., Kaufmann, S.H., Mittrücker, H.W. e Schaible, U.E. 2010. A role for IL-18 in protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *European Journal of Immunology*. 40:396-405.
- Shinnick, T.M., Good, R.C. 1994. Mycobacterial taxonomy. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 13:884-901.
- Skuce, R.A., McCorry, T.P., McCarroll, J.F., Roring, S.M.M., Scott, A.N., Brittain, D., Hughes, S.L., Hewinson, R. G. e Neill, S.D. 2002. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology*. 148:519-528.
- Smith, N.H., Crawshaw, T., Parry, J. e Birtles, R.J. 2009b. *Mycobacterium microti*: more diverse than previously thought. *Journal of Clinical Microbiology*. 47:2551-2559.
- Smith, N.H., Hewinson, R.G., Kremer, K., Brosch, R. e Gordon, S.V. 2009a. Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Reviews Microbiology*. 7:537-544.

Smith, N.H., Kremer, K., Inwald, J., Dale, J., Driscoll, J.R., Gordon, S.V., van Soolingen, D., Hewinson, R.G. e Smith, J.M. 2006. Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Theoretical Biology*. 239:220-225.

Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K.E., Connell, N.D., Kreiswirth, B.N., Whittam T.S. e Musser, J.M. 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *PNAS*. 94:9869-9874.

Streicher, E.M., Victor, T.C., van der Spuy, G., Sola, C., Rastogi, N., van Helden, P.D. e Warren, R.M. 2007. Spoligotype signatures in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Clinical Microbiology*. 45:237-240.

Sundaramurthy, V. e Pieters, J. 2007. Interactions of pathogenic mycobacteria with host macrophages. *Microbes and Infection*. 9:1671-1679.

Supply, P., Lesjean, S., Savine, E., Kremer, K., van Soolingen, D. e Locht, C. 2001. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *Journal of Clinical Microbiology*. 39:3563-3571.

Supply, P., Magdalena, J., Himpens, S. e Locht, C. 1997. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Molecular Microbiology*. 26:991-1003.

Supply, P., Mazars, E., Lesjean, S., Vincent, V., Gicquel, B. e Locht, C. 2000. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molecular Microbiology*. 36:762-771.

Taylor, C., Jahans, K., Palmer, S., Okker, M., Brown, J. e Steer, K. 2006. *Mycobacterium microti* isolated from two pigs. *The Veterinary Record*. 159:59-60.

The Center for Food Security & Public Health (CFSPH). 2009. Bovine Tuberculosis.

Tohen, C.O., LoBue, P.A., Enarson, D.A., Kaneene, J.B. e Kantor, I.N. 2009. Tuberculosis: a re-emerging disease in animals and humans. *Veterinaria Italiana*. 45:135-181.

Trinchieri, G. 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annual Review of Immunology*. 13:251-276.

Underhill, D.M., Ozinsky, A., Smith, K.D. e Aderem, A. 1999. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *PNAS*. 96:14459-14463.

Valone, S.E., Rich, E.A., Wallis, R.S. e Ellner, J.J. 1988. Expression of tumor necrosis factor in vitro by human mononuclear phagocytes stimulated with whole *Mycobacterium bovis* BCG and mycobacterial antigens. *Infection and Immunity*. 56:3313-3315.

van Crevel, R., Ottenhoff, T.H. e van der Meer, J.W. 2002. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Reviews*. 15:294-309.

van der Wel, N., Hava, D., Houben, D., Fluitsma, D., van Zon, M., Pierson, J., Brenner, M. e Peters, P.J. 2007. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell*. 129:1287-1298.

van Deutekon, H., Supply, P., de Haas, P.E.W., Willery, E., Hoijs, S.P., Locht, C., Coutinho, R.A. e van Soolingen, D. 2005. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Analysis, a more accurate method for identifying epidemiological links between patients with tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 43:4473-4479.

van Embden, J.D., van Gorkom, T., Kremer, K., Jansen, R., van Der Zeijst, B.A. e Schouls, L.M. 2000. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Journal of Bacteriology*. 182:2393-2401.

van Soolingen, D., Hoogenboezem, T., de Haas, P.E.W., Hermans, P.W.M., Koedam, M.A., Teppema, K.S., Brennan, P.J., Besra, G.S., Portaels, F., Top, J., Schouls, L.M., e van Embden, J.D.A. 1997. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47:1236-1245.

Vergne, I., Chua, J., Lee, H.H., Lucas, M., Belisle, J. e Deretic, V. 2005. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *PNAS*. 102:4033-4038.

Walburger, A., Koul, A., Ferrari, G., Nguyen, L., Prescianotto-Baschong, C., Huygen, K., Klebl, B., Thompson, C., Bacher, G. e Pieters, J. 2004. Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science*. 304:1800-1804.

Wayne, L.G. e Kubica, G.P. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, New York.

Wedlock, D.N., Aldwell, F.E., Collins, D.M., de Lisle, G.W., Wilson, T. e Buddle, B.M. 1999. Immune responses induced in cattle by virulent and attenuated *Mycobacterium bovis* strains: correlation of delayed-type hypersensitivity with ability of strains to grow in macrophages. *Infection and Immunity*. 67:2172-2177.

Widdison, S., Ashley, G.R., Howard, C.J. e Coffey, T.J. 2007. Characterisation of bovine inducible nitric oxide synthase. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 117:302-309.

World Organisation for Animal Health (OIE). 2010. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*.

Wu, C.H., Tsai-Wu, J.J., Huang, Y.T., Lin, C.Y., Liou, G.G. e Lee, F.J. 1998. Identification and subcellular localization of a novel Cu,Zn superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS Letters*. 439:192-196.

Wurmser, A.E., Gary, J.D. e Emr, S.D. 1999. Phosphoinositide 3-kinases and their FYVE domain-containing effectors as regulators of vacuolar/lysosomal membrane trafficking pathways. *The Journal of Biological Chemistry*. 274:9129-9132.

Xavier Emmanuel, F., Seagar, A.L., Doig, C., Rayner, A., Claxton, P. e Laurenson, I. 2007. Human and animal infections with *Mycobacterium microti*, Scotland. *Emerging Infectious Diseases*. 13:1924-1927.

Yoshida, A., Inagawa, H., Kohchi, C., Nishizawa, T. e Soma, G. 2009. The role of toll-like receptor 2 in survival strategies of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophage phagosomes. *Anticancer Research*. 29:907-910.

Anexo I

Tabela que relaciona o peso molecular dos produtos de amplificação por PCR dos oito *loci* analisados por MIRU-VNTR com o número de repetições em *tandem* presente em cada *locus*.

(adaptado de Matos, 2009)

M. tuberculosis H37Ra								
<i>Locus</i>	VNTR 3232	ETR-A	ETR-B	ETR-C	QUB 11a	QUB 11b	MIRU 4	MIRU 26
<i>Amplicon (bp)</i>	461	420	292	382	305	412	353	438
<i>Alelo</i>	5	3	3	3	3	5	3	3

ALELO	LOCUS							
	VNTR 3232	ETR-A	ETR-B	ETR-C	QUB 11a	QUB 11b	MIRU 4	MIRU 26
0	133	163	80	171	96	50	117	285
0'	181	195	120	-	98	67	174	-
1	237	270	178	266	167	136	252	336
2	293	345	235	324	236	205	329	387
3	349	420	292	382	305	274	406	438
4	405	495	349	440	374	343	483	489
5	461	570	406	498	443	412	560	540
6	517	645	463	556	512	481	637	591
7	573	720	520	614	581	550	714	642
8	629	795	577	672	650	619	791	693
9	685	870	634	730	719	688	868	744
10	741	945	691	788	788	757	945	795
11	797	1020	748	846	857	826	1022	846
12	853	1095	805	904	926	895	1099	897