

EDUARDO PINHEIRO AMARAL

**AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA MICOBACTERIANA E
MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DURANTE
A INFECÇÃO POR ISOLADOS CLÍNICOS DE
Mycobacterium bovis E *Mycobacterium tuberculosis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof.^a Dr.^a Maria Regina D'Império Lima

São Paulo
2011

RESUMO

Amaral EP. Avaliação da virulência micobacteriana e modulação da resposta imune durante a infecção por isolados clínicos de *Mycobacterium bovis* E *Mycobacterium tuberculosis*. [Dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

A tuberculose é considerada um problema emergente de saúde pública. O genoma de *Mycobacterium bovis* (*Mbv*) é 99,95% idêntico em sequência de nucleotídeo ao *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Apesar disto, estas duas espécies apresentam diferenças em suas propriedades biológicas que determinam ampla adaptação de *Mbv* para diferentes mamíferos, e *Mtb*, principalmente, para humano. Este estudo tem como objetivo avaliar a associação da patogenicidade/virulência e propriedades imunomoduladoras de isolados clínicos de *Mbv* (cepas B2 e MP287/03) e *Mtb* (cepa Beijing 1471), e da cepa de *Mtb* H37Rv, como referência de virulência. A virulência das micobactérias foi avaliada em camundongos C57BL/6 infectados via intratraqueal com baixa dose de infecção (~100 bacilos). Os parâmetros utilizados foram índice de sobrevivência, avaliação da carga bacteriana (UFC, unidade formadora de colônia) e análise histopatológica dos pulmões, baço e fígado. Os isolados, MP287/03 e *Beijing* 1471, apresentaram maior virulência em relação às demais cepas, levando os camundongos à morte ainda na fase aguda de infecção. As cepas menos virulentas (B2 e H37Rv) induziram infecção crônica nos camundongos. A patologia induzida pelos isolados MP287/03 e *Beijing* 1471 foi mais severa, apresentando intenso infiltrado celular, alveolite e áreas de necrose pulmonar. A patologia exacerbada foi associada com o aumento do número de bactérias no pulmão, em relação aos bacilos de menor virulência, equivalente a $2-3 \log_{10}$ após 3 semanas de infecção. Para investigar os mecanismos responsáveis pelas diferenças na patogenicidade, avaliamos a modulação da resposta imune protetora durante a infecção. Citocinas pró- e anti-inflamatórias, consideradas importantes para controle da infecção, foram quantificadas a partir das culturas de células pulmonares obtidas 28 dias após a infecção. A cepa H37Rv induziu o padrão de citocinas pró-inflamatórias que é considerado como protetor, promovendo o controle do crescimento do bacilo durante a infecção. O perfil de citocinas induzidas pelo isolado B2 foi similar ao observado na infecção pela cepa H37Rv, o que contribuiu para controle da infecção durante a fase aguda. Apesar disto, houve a reativação da infecção nestes animais, o que levou à morte dos camundongos ao redor do dia 150 de infecção. Diferentes propriedades imunomodulatórias foram observadas durante a infecção pelos isolado hipervirulentos. Foi verificada baixa produção de mediadores pró-inflamatórios nos camundongos infectados com o isolado MP287/03, enquanto nos infectados com o isolado *Beijing* 1471 os níveis destes mediadores foram exacerbados. O desbalanço na produção das citocinas pró-inflamatórias pode ter contribuído para morte precoce dos animais. Em camundongos deficientes em IFN- γ (IFN- γ KO), todos os isolados bacterianos foram capazes de induzir morte dos animais. Interessantemente, a taxa de mortalidade dos camundongos IFN- γ KO infectados com as cepas hipervirulentas foi similar à observada nos camundongos selvagens infectados. As propriedades de hipervirulência dos isolados MP287/03 e *Beijing* 1471 foram confirmadas no modelo de infecção *in vitro*. Ambos isolados apresentaram maior crescimento

macrófagos e alta taxa de indução de morte destas células em relação à cepa H37Rv. Baseado nesse estudo, nós podemos concluir que as propriedades que conferem hipervirulência aos isolados clínicos de *Mbv* e *Mtb* estão principalmente relacionadas à alta capacidade de crescimento intracelular das bactérias, que parece ser pouco alterada pela presença de citocinas pró-inflamatórias. Sendo assim, as infecções por isolados hipervirulentos podem acarretar consequências semelhantes, mesmo quando associadas a diferentes padrões de modulação da resposta imune.

Palavra-chave: Tuberculose. *Mycobacterium sp.* Virulência. Resposta imune.

ABSTRACT

Amaral EP. Evaluation of the mycobacterial virulence and modulation of the immune response during infection by clinical isolates of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. [Masters Thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Tuberculosis is an emergent problem of public health. *Mycobacterium bovis* (*Mbv*) genome is 99.95% identical in sequence to that of *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). In spite of this, these species show considerable differences in their biological properties that determine the adaptation of *Mbv* in different mammals, and *Mtb*, mainly, in humans. This study aimed to evaluate the association between pathogenicity/virulence and immunomodulatory ability of *Mbv* (B2 and MP287/03) and *Mtb* (*Beijing* 1471) clinical isolates, using H37Rv strain as reference of virulence. The virulence was assessed in C57BL/6 mice infected with a low dose of bacilli (~100 bacteria) via intratracheal route. We used as parameters the survival rate, analysis of bacterial load (CFU, colony forming units) and histopathological analysis of the spleen, lungs and liver. MP287/03 and *Beijing* 1471 isolates showed higher virulence than all others strains, leading to mice death during the acute phase of infection. The strains of lower virulence (B2 and H37Rv) induced chronic infection in mice. The pathology induced by MP287/03 and *Beijing* 1471 isolates was the most severe, showing pulmonary necrosis, alveolitis and intense cellular infiltrate. This exacerbate pathology was associated with an increase of bacterial numbers in the lung, in comparison to the less virulent mycobacteria, equivalent to 2-3log₁₀ after 3 weeks of infection. To investigate the mechanisms responsible for the differences in pathogenicity, we evaluated the modulation of the protective immune response during 3-4 weeks after infection. Pro- and anti-inflammatory cytokines, considered to be important for infection control were measured in pulmonary cell culture supernatants 28 days after infection. The H37Rv strain induced the pro-inflammatory cytokine profile that is considered protective, promoting the control of bacteria growth during the infection. The cytokines profile induced by B2 isolate was similar to that observed in the infection by H37Rv strain, which contributed to the control of infection during the acute phase. Despite this, there was an infection reactivation in these mice, which led to mice death around day 150 of infection. Different immunomodulatory properties were observed during the infection by hypervirulent isolates. It was verified low production of pro-inflammatory mediators in mice infected by MP287/03 bacteria, whereas in mice infected by *Beijing* 1471 bacteria were observed exacerbated levels of pro-inflammatory mediators. The disbalance in the pro-inflammatory cytokine production may have contributed to the early mouse death. In IFN- γ deficient mice, all the bacteria isolates were capable to induce animal death. Interestingly, the mortality rate of IFN- γ deficient mice infected by hypervirulent strains was similar to that of wild-type mice. The hypervirulent properties of the

MP287/03 and *Beijing* 1471 isolates were confirmed using an *in vitro* model of infection. Both isolates showed higher growth in macrophages and induced higher cell death than the H37Rv strain. Based on this study, we concluded that the properties that confer hypervirulence to *Mbv* and *Mtb* clinical isolates are primarily related to the high intracellular growth capacity of the bacteria, which seems to be marginally affected by the presence of pro-inflammatory cytokines. Therefore, the infection by hypervirulent isolates can lead to similar outcomes, even when associated to different patterns of modulation of the immune response.

Keywords: Tuberculosis. *Mycobacterium* sp. Virulence. Immune response.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Desenvolvimento da tuberculose

A tuberculose, uma doença causada por bacilos bacterianos álcool-ácido resistentes, possui alta prevalência em todo o mundo. Este mal constitui um grande problema de saúde pública em países subdesenvolvidos e/ou em desenvolvimento, representando 80% dos casos mundiais de tuberculose.

A transmissão da tuberculose ocorre mais frequentemente através da via respiratória, a partir de aerossóis produzidos no ato da tosse, fala e espirro de pessoas na fase bacilífera. As gotículas de aerossol, contendo partículas infectantes, são inaladas por indivíduos saudáveis e desta forma, os bacilos alojam-se nos alvéolos pulmonares e, posteriormente, contidos em granulomas (Center for Diseases Control and Prevention, 2008). Em virtude da redução da resistência orgânica (desnutrição, estresse ou associação com outras doenças imunossupressoras), o bacilo tende a proliferar intensamente e pode levar o indivíduo à morte, caso não haja tratamento adequado. Com a doença instalada o indivíduo portador é capaz de contaminar terceiros.

No passado a doença se disseminou pelos fluxos migratórios em decorrência das guerras e da colonização de novos continentes e/ou terras a partir do século XV. Naquele momento os tratamentos eram desempenhados de forma precária levando a uma alta taxa de mortalidade. Com o desenvolvimento dos quimioterápicos, estreptomicina (década de 1940), pirazinamida (1952), isoniazida (1952), etambutol (1961), e rifampicina (1966), houve uma grande expectativa em torno da cura e esperança em sua erradicação. Porém, devido a fatores externos associados à pobreza, a doença continuou a se propagar dentre os indivíduos. Tal situação agravou-se com o aparecimento de bacilos resistentes aos quimioterápicos habituais, fruto, na maioria das vezes, de tratamentos irregulares com grandes percentuais de abandono.

Os sintomas mais frequentes são febre vespertina, sudorese noturna, falta de apetite e emagrecimento. Podem ocorrer também dor torácica e tosse inicialmente seca, subsequente, acompanhada ou não, de escarro com presença de sangue (Brasil, 2010).

A prevenção contra a tuberculose no Brasil é feita na infância com inoculação da vacina BCG (Bacilo Calmette Guérin), desenvolvida por Albert Calmette e Camille

Guérin. A vacina BCG consiste de uma cultura de bacilos vivos atenuados, numa concentração pré-determinada, que devido à sua capacidade imunogênica preservada, induz uma resposta imune protetora. O sistema imune saudável controla a infecção e desenvolve uma resposta protetora. Em indivíduos imunocomprometidos esta vacina pode gerar a reativação do bacilo e o desenvolvimento da doença.

Diversos fatores colaboram para diminuição da eficácia da vacina BCG como, por exemplo, a diversidade gênica das populações vacinadas e a qualidade das cepas de BCG. Embora a BCG previna as formas disseminadas da tuberculose em jovens, ela não protege contra a forma comum da doença, a tuberculose pulmonar em adultos, e também contra reinfecções (Kaufmann, 2001a).

1.1.1 Aspectos epidemiológicos da tuberculose

A tuberculose é uma doença que está diretamente ligada a fatores socioeconômicos, sendo de alta prevalência em países pobres e/ou populosos. Entre os países com maior incidência da doença estão Índia, China, Indonésia, Bangladesh, Nigéria, Paquistão, Filipinas, Congo, Rússia e Brasil (World Health Organization, 2007).

Estima-se que um terço da população mundial está infectado pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, mas somente 10% destes indivíduos desenvolvem a doença (Kaufmann, 2001a). A partir dos anos 80, o crescimento dos casos de tuberculose decorre, em grande parte, devido ao aumento dos casos de AIDS (do inglês, *Acquired Immunodeficiency Disease Syndrome*), mal esse que compromete o sistema imune e favorece o estabelecimento de várias doenças infecciosas, incluindo a tuberculose. Assim, a incidência de novos casos de tuberculose atingiu 9,4 milhões (139 casos/100.000 habitantes) em 2009, sendo estimado, dentre estes, 1,4 milhões de indivíduos positivos para o HIV (do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*) e 2 milhões de mortes (WHO, 2009b). Presume-se que nos últimos 100 anos, 100 milhões de pessoas tenham morrido devido à tuberculose (WHO, 2007). Um importante fator a se ressaltar é o aparecimento de cepas resistentes ao tratamento pelos quimioterápicos de primeira linha, como rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol, denominadas MDR-TB (do inglês, *Multidrug-resistant Tuberculosis*),

sendo estas cepas responsáveis por cerca 4,8% dos casos de tuberculose no mundo (WHO, 2009a). Recentemente, casos de tuberculose desencadeados por bacilos resistentes à segunda linha de quimioterápicos (capreomicina, canamicina, amicacina e fluoroquinolona), denominados XDR-TB (do inglês, *Extensively Drug-resistant Tuberculosis*), vêm sendo registrados, estando as opções de tratamento seriamente limitadas (WHO, 2007). Um estudo da Organização Mundial de Saúde, realizado em seis países e concluído no ano 2000, indica que um de cada três medicamentos usados no combate à tuberculose não é eficaz no tratamento de 90% dos pacientes.

O Brasil é o 19º país em número de notificações da doença com incidência de 38 novos casos/100.000 habitantes em 2007, sendo que 7 a 10% dos doentes não respondem aos medicamentos utilizados no tratamento (Corbett et al., 2003; WHO, 2009a, 2010).

1.2 Tuberculose bovina

A tuberculose bovina é uma zoonose de caráter inflamatório, infecto-contagiosa, causada pelo *Mycobacterium bovis*, cujo hospedeiro primário é o bovino. O agente infeccioso não acomete apenas o bovino, mas também o homem, cão, gato, porco, ovelha, cabra e cavalo (Matthias, 1998), assim como animais silvestres como macacos, elefantes, leões, tigres, camelos, búfalos, equinos, roedores selvagens, entre muitos outros, sendo alguns cativos em zoológicos e parques (Dankner et al., 1993; Abrahão, 1999). O *M. bovis* é tão patogênico para o homem quanto o *M. tuberculosis*, determinando as mesmas formas clínicas e lesões patológicas (Abrahão, 1999; Rua-Domenech, 2006). No passado dava-se pouca importância a essas fontes de infecção, mas estudos apontam que animais silvestres infectados contribuem para a persistência da tuberculose bovina no mundo (Abrahão, 1999).

Além das perdas econômicas geradas pela infecção do rebanho bovino, o interesse por esta patologia se deve também à suscetibilidade do homem ao *M. bovis*, que ao consumir produtos de origem animal contaminados pelo *M. bovis* pode desenvolver a tuberculose intestinal, sendo considerada a principal causa de manifestação da doença não-pulmonar em regiões rurais (Grange e Yates, 1994). A

infecção humana pelo *M. bovis* foi primeiramente descrita no final do século XIX. Estima-se que ela tenha sido responsável por cerca de 10-18% de todos os casos de tuberculose, existindo uma associação entre o número de casos humanos identificados e a prevalência da tuberculose na população bovina local (Abrahão, 1999). Após a pasteurização do leite, no início do século XX, a incidência de tuberculose induzida pelo *M. bovis* apresentou grande queda (Rua-Domenech, 2006), mas os registros de tuberculose causada por este agente têm sido descritos entre indivíduos idosos e imunocomprometidos, provavelmente, devido à reativação de infecções primárias latentes ou por contato com reservatórios deste patógeno (Grange, 2001; Rua-Domenech, 2006; de Kantor et al., 2008; Rodriguez et al., 2010). Além disso, a transmissão do bacilo bovino de humano para humano também tem sido notificada (Torgerson, 2008; Shrikrishna et al., 2009). Desta forma, ambas as espécies, *M. bovis* e *M. tuberculosis*, possuem grande importância clínica para a saúde pública.

Devido à dificuldade dos laboratórios em isolar e diferenciar o agente etiológico causador da patologia, a fração de humanos acometidos com tuberculose atribuída à infecção por *M. bovis*, nos países em desenvolvimento, ainda é amplamente desconhecida, embora se espere que seja mais elevada do que nos países desenvolvidos (Cosivi et al., 1998; Ayele et al., 2004). No Brasil, não existe um programa específico para o controle da tuberculose bovina; essa atividade está inserida num programa genérico denominado Programa de Controle das Doenças Animais, desenvolvido pelo Ministério da Agricultura, Secretarias Estaduais de Agricultura e entidades afins. Entre os fatores que dificultariam a implantação do programa de controle encontra-se a dimensão do rebanho bovino brasileiro, o maior rebanho comercial do mundo.

1.3 Gênero *Mycobacterium*

O gênero *Mycobacterium* é composto por bactérias na forma de bacilo, não-esporelantes, álcool-ácido resistentes e imóveis, apesar de relatada mobilidade para as espécies *M. smegmatis* e *M. avium* (Barrera, 2007). Sua parede celular é rica em lipídeos tornando-a hidrofóbica, além de ser responsável por muitas das características desse gênero como antigenicidade, crescimento lento, resistência a colorações laboratoriais simples, álcool, ácidos, detergentes e antibióticos comuns.

Em condições favoráveis, o *M. tuberculosis* divide-se a cada 12 a 16 horas, o que explica o fato do desenvolvimento de doença crônica (Kaufmann e Andersen, 1998).

O gênero *Mycobacterium* é composto por dois grandes complexos denominados, complexo *M. tuberculosis* e complexo *M. avium*. O complexo *M. tuberculosis* é constituído de várias espécies, dentre elas, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. prinnipedii* e *M. microti*. A tabela 1 mostra a classificação taxonômica do gênero *Mycobacterium*.

Tabela 1 - Classificação taxonômica dos complexos *M. tuberculosis* e *M. avium*.

Reino	Bactéria	
Filo	Actinobacteria	
Classe	Actinobacteria	
Subclasse	Actinobacteridae	
Ordem	Actinomycetales	
Subordem	Corynebacterineae	
Família	Mycobacteriaceae	
Gênero	<i>Mycobacterium</i>	
Espécies	<i>M. tuberculosis</i>	} Complexo <i>M. tuberculosis</i>
	<i>M. bovis</i>	
	<i>M. africanum</i>	
	<i>M. Canetti</i>	
	<i>M. caprae</i>	
	<i>M. prinnipedii</i>	
	<i>M. microti</i>	
	<i>M. avium-avium</i>	} Complexo <i>M. avium (MAC)</i>
	<i>M. avium-intracellulare</i>	
	<i>M. avium-paratuberculose</i>	
	<i>M. avium-silvaticum</i>	

Fonte: Baseado em Barrera (2007)

Estudos genéticos recentes propõem uma via evolutiva para micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, baseada em pequenas regiões do cromossomo e em sequências polimórficas de genes selecionados. Por muitos anos, acreditava-se que o *M. bovis* poderia ser o progenitor da espécie *M. tuberculosis*. Porém, análises de regiões do genoma micobacteriano denominadas regiões de diferenças (RD)

sugerem que *M. bovis* não é o progenitor de *M. tuberculosis*. Isto porque foi encontrada uma ampla linhagem de *M. tuberculosis* que antecedia as linhagens de *M. bovis* (Gordon et al., 2009). Hughes et al. (2002) basearam-se na observação de ampla diversidade de nucleotídeos em um pequeno grupo de um *loci*, o que os levou a postular que a linhagem *M. tuberculosis* emergiu há aproximadamente 35.000 anos atrás (Hughes et al., 2002). Por outro lado, cepas de *M. bovis* pertencem a uma linhagem comum a *M. africanum* e *M. microti*. Esta linhagem é caracterizada por deleção da região RD9, e por subsequente perda de RD7, RD8 e RD11 (Figura 1) (Brosch et al., 2002).

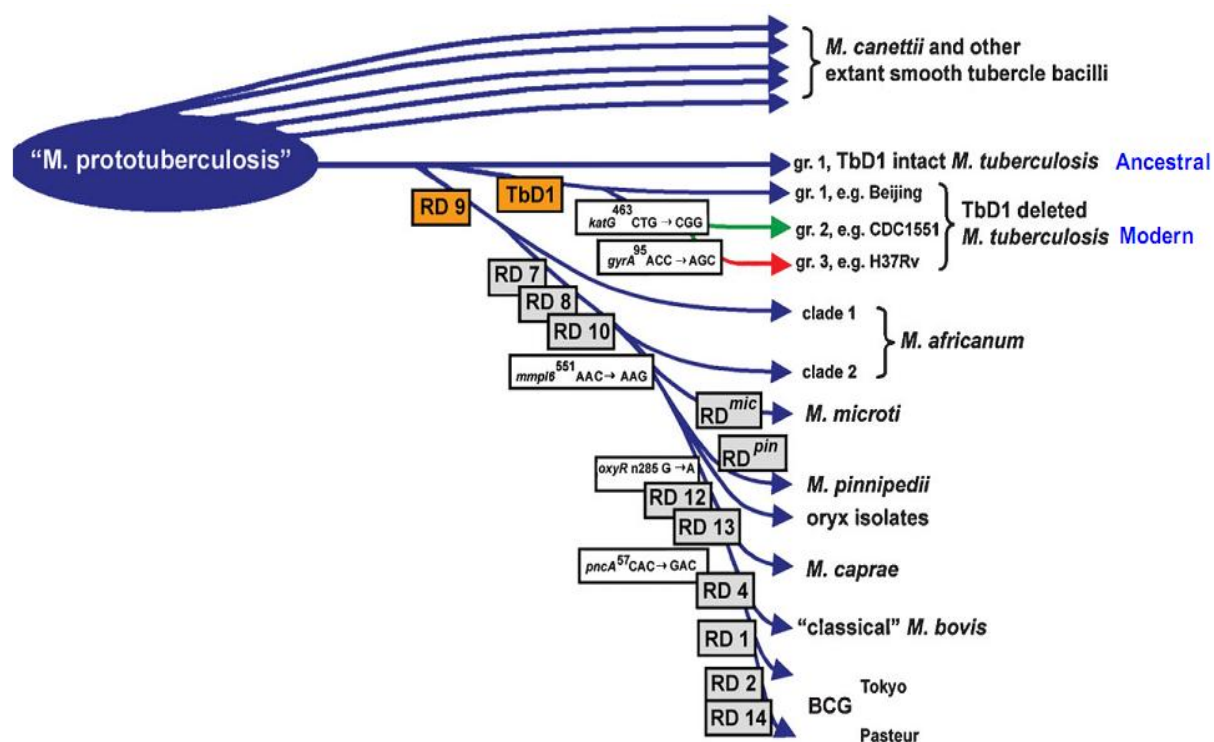


Figura 1. Esquema da via evolutiva proposto para os bacilos da tuberculose. Esta figura ilustra perdas sucessiva de regiões de diferenças no genoma micobacteriano representado pelas caixas cinzas. Fonte: Gordon et al.(2009).

O *M. bovis* e o *M. tuberculosis*, por exemplo, possuem 99,95% do genoma idêntico em nível de nucleotídeo (Garnier et al., 2003). Apesar das semelhanças, estas duas espécies mostram consideráveis diferenças em suas propriedades biológicas como, por exemplo, o hospedeiro. O *M. tuberculosis* tem como

hospedeiro natural o humano, já o *M. bovis* possui como reservatórios animais silvestres, domésticos e humanos (Matthias, 1998). Outra diferença é a forma de transmissão, onde o *M. tuberculosis* é transmitido principalmente por aerossol, enquanto o *M. bovis* pode ser transmitido por produtos derivados de animais, bem como por aerossol (Ayele et al., 2004).

As micobactérias apresentam seu envelope celular composto por uma membrana plasmática, uma parede celular e uma camada externa semelhante à cápsula não aderida. Esta pseudocápsula se faz presente na estrutura da *M. tuberculosis* durante o crescimento em meio líquido ou dentro das células humanas. Em condição de estresse fisiológico esta pseudocápsula desprende-se da parede bacteriana. Estudos sugerem que este componente presente na superfície bacteriana seja protetor e bioativo (Barrera, 2007).

A parede celular é típica de uma bactéria gram-positiva, composta por uma camada interna de peptidoglicanos (PG), conferindo forma e integridade estrutural à bactéria. Esta camada de PG encontra-se covalentemente ligada a um polissacarídeo ramificado, a arabinogalactana, esterificadas em sua porção externa com ácidos graxos de alto peso molecular, os ácidos micólicos. Os ácidos micólicos específicos do *M. tuberculosis* estão na conformação alfa, beta, ceto e metoximicolatos. A camada externa é recoberta por lipídeos livres, como pitioglicerol dimicoserato (PDIM), glicolipídeos fenólicos (PGL), polipeptídeos e lipoproteínas (Barrera, 2007). As cadeias de peptídeos presentes na camada externa da parede correspondem a 15% de seu peso e consiste em importantes antígenos.

Outros lipídeos e glicolipídeos estão associados de forma não covalente à parede celular da micobactéria, sendo muitos destes potentes moduladores das funções dos macrófagos e DCs como, por exemplo, o lipoarabinomanana (LAM). O complexo *M. tuberculosis* apresenta alteração na molécula de LAM estando esta manossilada, sendo denominada Man-LAM (do inglês, *Mannosylated Lipoarabinomannan*) (Figura 2) (Glickman e Jacobs Jr, 2001; Barrera, 2007).

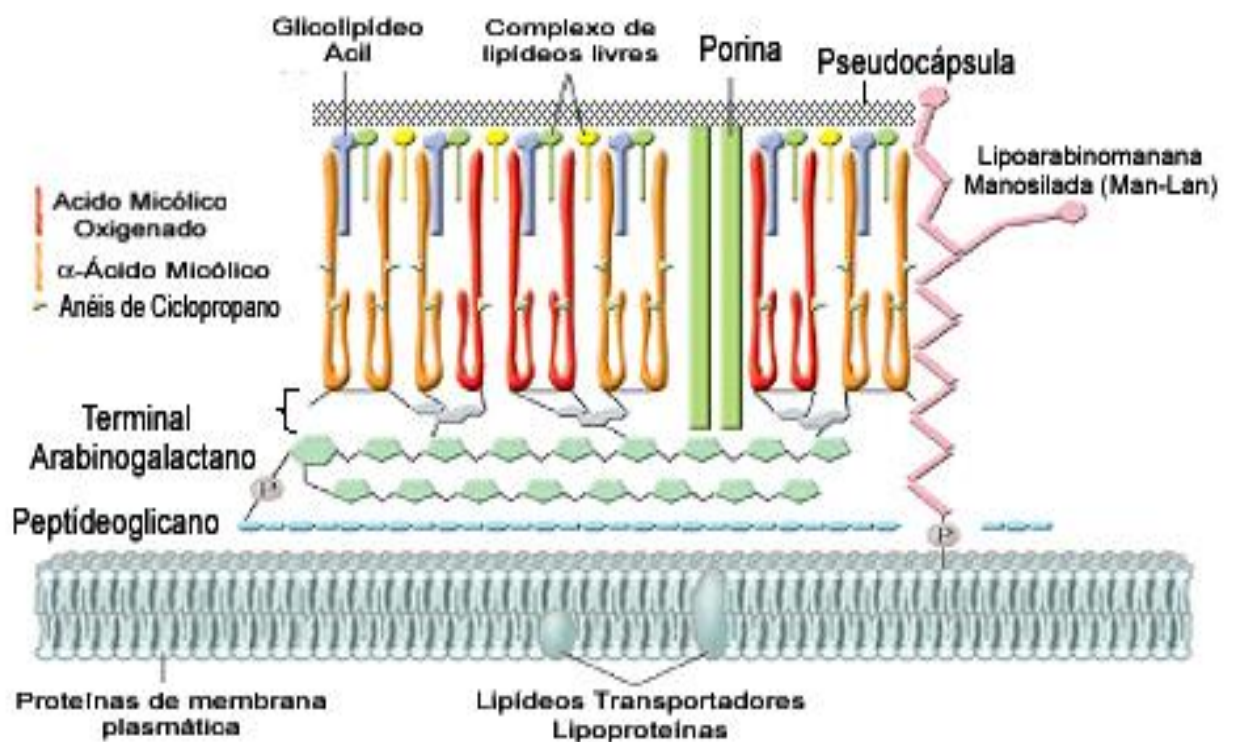


Figura 2. Representação do envelope celular de *M. tuberculosis*.

Fonte: Baseado em Riley (2006).

1.4 Virulência micobacteriana

A capacidade de um microrganismo persistir no hospedeiro é conferida por fatores ligados à virulência do patógeno, permitindo a evasão do sistema imune e a sua proliferação (Kaufmann, 2001b). Tais fatores envolvidos em mecanismos de reprogramação transcricional, baixo metabolismo catalítico e capacidade imunomoduladora são responsáveis pelo sucesso do *M. tuberculosis* em adaptar-se ao hospedeiro (Sachdeva et al., 2010). O sequenciamento completo do cromossomo circular da cepa H37Rv de *M. tuberculosis* em 1998 por Cole et al. (1998) foi de suma importância para auxiliar a compreensão acerca da patogenicidade induzida pelo complexo *M. tuberculosis* (Cole e Barrell, 1998; Cole et al., 1998).

A identificação de genes envolvidos na regulação da virulência micobacteriana se faz importante para o entendimento de mecanismos que contribuem para o desenvolvimento da doença, bem como para a elaboração de novos quimioterápicos. A definição de fatores de virulência pode ser controversa e

irá depender do tipo de abordagem experimental utilizada. Do ponto de vista do patógeno a virulência pode ser determinada pelo número de organismos requeridos para estabelecer uma infecção, taxa de crescimento bacteriano, disseminação, persistência crônica e transmissibilidade. Do ponto de vista do hospedeiro a virulência pode ser verificada pela suscetibilidade a infecção, patologia tecidual, severidade dos sintomas da doença, taxa de progressão da doença e frequência de mortalidade. Sendo assim, o conhecimento de alguns desses fatores pode auxiliar no *screening* de virulência micobacteriana (Cosma et al., 2003).

O complexo *M. tuberculosis* não possui fatores de virulência clássicos como os que promovem doença induzida por outros patógenos, por exemplo, toxinas produzidas por *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella dysenteriae*, e *Vibrio cholerae*.

A regulação da expressão gênica é crucial para determinar a manutenção da virulência micobacteriana. A expressão gênica na bactéria é regulada primariamente ao nível de iniciação transcricional conferida por holoenzimas RNA polimerase (RNAP, do inglês, *RNA Polymerase*) (Sachdeva et al., 2010). Esta holoenzima é formada por 5 subunidades e uma subunidade dissociável denominada subunidade sigma (σ). O fator σ é responsável por muitos dos determinantes responsáveis pela especificidade promotora da RNAP. Foi descrito que a expressão diferencial e temporal de reguladores controlados pela indução de um ou mais fatores σ permitem ao *M. tuberculosis* manter-se por múltiplos estágios de interação com o hospedeiro, incluindo adesão, invasão, replicação intracelular e disseminação para outros órgãos (Smith, 2003). O *M. tuberculosis* possui 13 fatores σ , sendo o fator sigma A (SigA, σ^A) o mais importante. Este fator é indispensável para o crescimento micobacteriano. A descoberta do efeito destes reguladores e do papel efetor de cada gene foi possível através do desenvolvimento de mutantes deficientes para estes fatores ou para moléculas codificadas por eles ou ainda por superexpressão dos mesmos. Desta forma foi possível verificar que bacilos deficientes para o fator σ^A apresentavam atenuação da virulência, sendo o fator σ^A incapaz de interagir com o fator de transcrição acessório *WhiB3*. A inativação do gene *WhiB3* leva à perda da virulência em modelos animais, porém sem afetar a capacidade de crescimento do bacilo (Steyn et al., 2002; Wu et al., 2004).

Outros fatores σ também são importantes para a manutenção da virulência tais como: SigB, responsável por regular a expressão de ESAT-6 (do inglês, *6-kDa Early-secreted Target Antigen*), proteína ribossomal 50S, proteínas da família PE, cetoacil sintase e algumas proteínas reguladoras de transcrição, como WhiB2, IdeR e o próprio σ^B ; SigE não é essencial para o crescimento micobacteriano, mas sua deleção aumenta a suscetibilidade ao estresse oxidativo e resistência à pH ácido; SigH e SigC são responsáveis por manutenção de funções extracitoplasmáticas, sendo descrito por mediar a transcrição de genes envolvidos na expressão de proteínas *heat-shock*, além de gerar imunopatologia (Cosma et al., 2003).

A RD-1 é uma região do genoma micobacteriano responsável por codificar fatores intrínsecos à virulência micobacteriana (Guinn et al., 2004). Análises comparativas do genoma de H37Rv e H37Ra cepas virulenta e avirulenta de *M. tuberculosis*, respectivamente, e *M. bovis* virulenta e *M. bovis* atenuada (BCG), possibilitaram constatar a importância desta região para manutenção da virulência ao longo da evolução. Esta região é responsável por codificar as proteínas ESAT-6 e CFP-10 (do inglês, *10-kDa Culture Filtrate Protein*), consideradas de alta imunogenicidade (Ganguly et al., 2008). Foi observado que a cepa BCG não possuía a região RD-1 em comparação com as cepas virulentas, porém quando inserida esta região no genoma da BCG, a virulência era restaurada. Por outro lado, a eliminação do RD-1 na cepa virulenta H37Rv resultou na redução do crescimento intracelular em macrófagos humanos e induziu baixo crescimento nos pulmões, patologia branda, sendo observada redução de regiões de necrose, e conseqüentemente baixa mortalidade (Pym et al., 2002; Lewis et al., 2003; Guinn et al., 2004; Sherman et al., 2004; Junqueira-Kipnis et al., 2006).

Diversos estudos acerca do papel destas proteínas foram desenvolvidos. Por exemplo, foi descrito que a CFP-10 é capaz de diminuir a produção de ROS o que leva ao aumento da atividade de fosfatases (SHP-1 e SHP-2) nos macrófagos, culminando na desfosforilação de proteases ativas (Ganguly et al., 2008). O ESAT-6 pode ser reconhecido na superfície dos macrófagos via ligação com o receptor TLR-2 (do inglês, *Toll-like receptor-2*) e inibir a ativação de fatores de transcrição regulados por IFN- γ (Interferon-gama) e NF- κ B (do inglês, *Nuclear Factor κ B*) (Ganguly et al., 2008). Recentemente, foi descrito que o ESAT-6 é capaz de formar poros na membrana da célula infectada, além de induzir a ativação de sinais

inflamatórios ao estimular a formação do complexo inflamassoma e, conseqüentemente, secreção de IL-1 β (Mishra et al., 2010). A produção do IL-1 β , por sua vez, é capaz de induzir a maturação do fagossoma (Mishra et al., 2010), porém a fusão do endossoma com o lisossoma é inibida devido ao recrutamento da proteína coronina-1 (Pieters, 2001; Jayachandran et al., 2007; Jayachandran et al., 2008). Além disso, o ESAT-6 pode induzir a translocação da micobactéria do endossoma para o citosol, sendo, portanto, mais um mecanismo de escape da resposta microbicida induzida pelo macrófago (van der Wel et al., 2007).

Fatores lipídicos micobacterianos também são responsáveis por aumentar a virulência dos bacilos. No *M. tuberculosis*, 30% do genoma é locado para a síntese de lipídeos e para o metabolismo (Guenin-Mace et al., 2009). Tem sido descrito que lipídios expressos na superfície das micobactérias são responsáveis por modular a resposta imune. O lipoarabinomana é incluído na lista de fatores de virulência por causa de sua importância como potencial imunomodulador. A adição de LAM na cultura de macrófagos murinos induz o bloqueio da expressão de genes induzidos por IFN- γ (Chan et al., 1991). No gênero *Mycobacterium*, as moléculas de LAM estão expressas de diferentes formas. Por exemplo, no complexo *M. avium*, diferente do complexo *M. tuberculosis*, o LAM não está presente na forma manossilada (Guenin-Mace et al., 2009). O Man-LAM de *M. tuberculosis* tem sido mostrado inibir a maturação fagossomal (Fratti et al., 2001; Fratti et al., 2003). O LAM é liberado dentro dos fagossomas e se intercala em várias endomembranas do macrófago infectado (Ullrich et al., 2000). Esta inserção é essencial para o bloqueio da maturação do endossoma (Welin et al., 2008).

Modelos experimentais de infecção micobacteriana *in vitro* e *in vivo* vêm sendo utilizados para determinar o impacto destes fatores de virulência na patogenia da tuberculose. Muitas variações no nível de virulência têm sido observadas em isolados clínicos de *M. tuberculosis* e *M. bovis*. Em infecção de camundongos com isolados clínicos de *M. tuberculosis*, de diferentes genótipos, foi observado que o genótipo *Beijing* apresenta alta virulência, sendo verificado maior contagem de bacilos no pulmão, ampla lesão tecidual e baixa sobrevivência dos animais (Dormans et al., 2004). Lasunskaja et al. (2010) mostraram que existem diferenças entre cepas do genótipo *Beijing* isolados de pacientes na Rússia e Brasil. Neste estudo, foi observado que as cepas que circulam na Rússia apresentam genótipo

moderno quando comparado com as cepas circulantes no Brasil, que apresentam genótipo ancestral. Os isolados de genótipo *Beijing* modernos (Rússia) apresentaram maior virulência quando comparado com os isolados ancestrais (Brasil), em relação à capacidade de crescimento em macrófagos, indução de morte celular e capacidade de modulação da ativação dos macrófagos. Assim, cepas emergentes de genótipo *Beijing* circulantes na Rússia expressam características padrões associadas com o aumento da virulência, favorecendo a disseminação clonal.

Acredita-se que a emergência, persistência e o aumento da virulência do genótipo *Beijing* possam ser atribuídos à seleção natural das cepas, possivelmente devido à vacinação com BCG, tratamento com quimioterápicos e alta frequência mutacional, respectivamente (Parwati et al., 2010).

1.5 Resposta imune contra micobactérias

A resposta imune contra micobactérias é predominantemente mediada por células. A contaminação ocorre principalmente através da inalação de partículas infecciosas que ficam em suspensão no aerossol. Chegando ao interior dos pulmões, os bacilos se alojam no trato respiratório, onde entram em contato com as células residentes, infectando os macrófagos alveolares e as DC (Kobzik, 1999). Após a infecção o bacilo pode ser eliminado, entrar em estado de latência, ou ainda desencadear uma infecção disseminada. Este quadro pode evoluir para uma doença aguda, podendo levar o indivíduo à morte. Uma vez que o indivíduo portador de infecção latente sofra uma queda de vigilância imunológica como, por exemplo, após o desenvolvimento da AIDS tornando-se imunocomprometido, poderá ocorrer a reativação da infecção, seguida de proliferação e disseminação dos bacilos (van Crevel et al., 2002).

Os macrófagos possuem um ciclo vital longo, o que permite a ocorrência de muitas fases de replicação, visto o crescimento lento do bacilo (Clemens, 1996). A entrada do patógeno nas células fagocíticas envolve processos de interações específicas receptor-ligante. PRRs (do inglês, *Pattern-Recognition Receptors*) são receptores expressos nas células do sistema imune que podem reconhecer moléculas padrões de microrganismos (PAMPs – do inglês, *Pathogen-Associated*

Molecular Patterns) como, por exemplo, LPS (lipopolissacarídeo), PG, CpG, dentre outros. Os principais receptores descritos como importantes na interação do macrófago e a micobactéria são os receptores de complemento CR1, CR3 e CR4, receptores de manose (MR, do inglês *Mannose Receptor*), receptores Fc, receptores scavenger, CD14, receptores TLR-2 e -4, receptores de lectina tipo-C, molécula de adesão intercelular de DC (DC-SIGN, do inglês, *Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-integrin*) e Dectina-1.

Os receptores NODs (do inglês, *Nucleotide-binding Oligomerization Domain*) são PRRs encontrados no citosol das células fagocíticas, que reconhecem PG bacterianos e medeiam uma via de sinalização celular independente de TLR. Estes receptores citoplasmáticos levam à produção de α 4-defensinas, as quais funcionam como “antibióticos naturais”, com propriedade bactericida contra micobactérias (Hargreaves e Medzhitov, 2005). Após o reconhecimento micobacteriano, observa-se a reorganização do citoesqueleto, que seria importante para a manutenção da motilidade dos macrófagos e indução de fagocitose (Lasunskaja et al., 2006).

Como consequência da ativação dos macrófagos após o reconhecimento do bacilo, é observada secreção de mediadores inflamatórios incluindo as interleucinas IL-1, IL-6 e IL-12, TNF- α (do inglês, *Tumor Necrosis Factor-alpha*) e GM-CSF (do inglês, *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*), bem como as quimioquinas IL-8 e RANTES (do inglês, *Regulated Upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*), que facilitam o recrutamento de linfócitos e monócitos para os pulmões. Além de mediar a secreção de citocinas e quimioquinas, os macrófagos promovem a secreção de fatores microbicidas tais como intermediários reativos de oxigênio (ROI, do inglês, *Reactive Oxygen Intermediate*) e intermediários reativos de nitrogênio (RNI, do inglês, *Reactive Nitrogen Intermediate*) (Kaufmann, 2001a).

Por outro lado, para sua sobrevivência nos macrófagos, os bacilos modificam a composição do fagossoma quanto à sua interação com outras organelas da célula hospedeira. O bloqueio da maturação do fagossoma, ao longo da via endossomal-lisossoma, ocorre a fim de evitar a fusão do fagossoma com o lisossoma, residindo o bacilo, portanto, num compartimento com as características de um endossoma. Estas modificações estão associadas com alterações na expressão de proteínas presentes no fagossoma, incluindo alterações na composição da Rab GTPase,

exclusão da próton ATPase vacuolar com consequente falta de acidificação do fagossoma e retenção da proteína coronina-1 (também denominada TACO) (Sturgill-Koszycki et al., 1994; Glickman e Jacobs Jr, 2001; Pieters, 2001; Jayachandran et al., 2007; Jayachandran et al., 2008).

As DCs reconhecem as micobactérias via receptores de lectina tipo-C e DC-SIGN, internalizam, processam e apresentam os antígenos protéicos via molécula de classe II do MHC (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) ou antígenos não-protéicos via molécula CD1, para células T (Guenin-Mace et al., 2009). Após o reconhecimento da bactéria as DCs se desprendem do tecido e migram para os linfonodos, passando por processo de maturação onde passam a expressar em sua superfície moléculas co-estimulatórias (B7.1/CD80 e B7.2/CD86), que promoverão o segundo sinal de ativação das células T. As DCs, assim como os macrófagos, servem como uma ponte entre a imunidade inata e a imunidade adquirida (Smith, 2003).

As células T CD4⁺ ativam os macrófagos através da produção de IFN- γ , aumentando a resposta microbicida, além de promover a indução de resposta granulomatosa (Orme, 1987; Orme et al., 1992; Flynn et al., 1993). Estudos indicam que as células T CD8⁺ podem ser ativadas através de um processo denominado apresentação cruzada. Neste processo vesículas contendo antígenos micobacterianos, muitas vezes oriundas de células apoptóticas, são fagocitadas pelos macrófagos, processadas, e os peptídeos antigênicos apresentados na superfície via molécula de classe I do MHC. As células T CD8⁺ contribuem na defesa contra o *M. tuberculosis*, principalmente, através da produção de IFN- γ e da lise das células infectadas mediada por Fas (do inglês, *TNF Superfamily Member 6*) FasL (do inglês, *TNF Superfamily Member 6 Ligand*) ou perforina/granzima (Canaday et al., 2001; Ferraz et al., 2006). Bonato et al. (2004) mostraram ainda que a vacina terapêutica pHSP-65 (do inglês, *Heat-Shock Protein 65 Mycobacterium leprae Gene*) é capaz de induzir ativação significativa das células T CD8⁺ no pulmão de camundongos infectados com *M. tuberculosis*, contribuindo para o aumento da produção de IFN- γ e, conseqüentemente, a diminuição da proliferação bacilífera (Bonato et al., 2004). A subpopulação de células Th17 (do inglês, *T helper*) vem ganhando importância no estudo acerca da ativação da resposta imune contra micobactérias. Esta subpopulação é capaz de secretar IL-17 e quimiocinas

KC/CXCL1 e MIP-2/CXCL2, que participam do recrutamento de neutrófilos para o sítio da infecção (Khader e Cooper, 2008). A IL-17 parece ter suma importância na formação dos granulomas em resposta à infecção por *M. bovis* BCG (Umemura et al., 2007; Okamoto Yoshida et al., 2010). Outra característica importante a ser ressaltada é a regulação negativa entre as subpopulações linfocitárias Th17 e Th1. Os linfócitos Th17 estimulam a população Th1 a aumentar a secreção de IFN- γ . Por sua vez, quando há o aumento da população de linfócitos Th1, esta regula negativamente a frequência da população de linfócitos Th17 e, conseqüentemente, a diminuição da secreção de IL-17 é observada, sendo esta dependente IFN- γ (Cruz et al., 2006).

A formação de granulomas na fase crônica da infecção pulmonar contribui para manutenção do crescimento estável micobacteriano e para prevenir o crescimento latente do bacilo. Sua estruturação se dá, principalmente, por meio do recrutamento de células T, macrófagos e DCs, dentre outras populações celulares, para o local da inflamação. Neste local, elas formam um arcabouço circunscrito, composto por macrófagos e células gigantes multinucleadas infectados na região central e, principalmente, linfócitos na periferia (Saunders et al., 1999; Feldmann e Maini, 2001). O papel do TNF- α na resposta granulomatosa à infecção pelo *M. tuberculosis* foi evidenciado com o aumento da reativação da tuberculose em pacientes com artrite reumatóide submetidos à terapia com anticorpos anti-TNF- α , sendo, portanto, esta citocina de suma importância para formação e manutenção da estrutura granulomatosa (Holckmann, 2001). O aparecimento de muitos granulomas circunscritos ou até mesmo difusos no pulmão pode gerar o comprometimento deste órgão, devido à ampla área com necrose, com formação de cavidades, levando o indivíduo à morte por disfunção pulmonar.

Estudos visando avaliar à relação entre virulência micobacteriana e aspectos relativos à ativação da resposta imune têm sido desenvolvidos (Dormans et al., 2004; León et al., 2009; Hernandez Pando et al., 2010; Martins de Sousa et al., 2010). No estudo acerca da patogenia gerada na infecção pelo *M. avium*, em modelo murino de infecção, nosso grupo verificou que isolados com perfis indistinguíveis de DNA *fingerprint* por RFLP (do inglês, *Restriction Fragment Length Polymorphism*) IS1245 (do inglês, *Insertion Sequence*) e IS901 e PRA-*hsp65* (do inglês, *PCR Restriction Enzyme Analysis of hsp65*) e epidemiologicamente não

relacionados, apresentaram diferentes capacidades em modular a resposta imune, disseminar e crescer no meio intracelular (Amaral et al., 2010).

Porém, pouco é conhecido a respeito da relação entre a virulência/patogenicidade e capacidade imunomoduladora de isolados clínicos pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* (*M. bovis* e *M. tuberculosis*) e como esta modulação da resposta imune pode contribuir ou não para a proteção do hospedeiro.

3 CONCLUSÃO

- Os isolados clínicos MP287/03 e *Beijing* 1471 apresentaram maior grau de patogenicidade e virulência quando comparados com o isolado clínico B2 e a cepa referência de virulência H37Rv.
- Em baixas doses, o isolado B2 e a cepa H37Rv induziram fase crônica de infecção nos camundongos, sendo observado aumento de citocinas pró-inflamatórias aos 28 dias de infecção, porém queda de IFN- γ e IL-17 aos 60 dias de infecção. Nesta fase, foi observado aumento de mediadores característicos da ativação de macrófagos, tais como TNF- α e NO, que podem ter favorecido para o controle do crescimento do bacilo no pulmão.
- A indução da resposta imune protetora contra micobactérias virulentas depende muito do tempo de estimulação das células no pulmão, a fim de promover a ativação dos macrófagos e, conseqüentemente, o controle da proliferação dos bacilos nos fagócitos.
- Os isolados MP287/03 e *Beijing* 1471 induziram necrose nos pulmões e alta taxa de mortalidade dos camundongos, porém por diferentes mecanismos de indução de morte.
- Falha na indução da resposta pró-inflamatória, elevada carga bacteriana e extensa necrose tecidual podem ter sido as causas da morte dos camundongos infectados com MP287/03. Entretanto, os camundongos infectados com *Beijing* 1471 sucumbiram, provavelmente, devido à elevada ativação da resposta imune protetora e, conseqüentemente, comprometimento pulmonar.
- Camundongos IFN- γ KO infectados com os isolados MP287/03, *Beijing* 1471 e B2 apresentaram aumento na massa relativa dos pulmões em relação aos camundongos WT. Porém, não foi observada grande diferença na carga bacteriana nos pulmões nos camundongos IFN- γ KO infectados com os isolados MP287/03 e *Beijing* 1471 quando comparado com os camundongos WT infectados.
- Não foram observadas diferenças na capacidade de crescimento em meio de cultura micobacteriano, indução de fagocitose em macrófagos e

suscetibilidade à ação microbicida do NO entre os isolados clínicos. Porém, foi verificado que os isolados hipervirulentos MP287/03 e *Beijing* 1471 apresentaram maior crescimento intracelular do que o isolado B2 e as cepas H37Rv e BCG.

- A patogenicidade e a virulência observada pelos hipervirulentos clínicos podem ser conferidas pela capacidade de crescimento intracelular e modulação da resposta imune protetora.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

Abrahão RMCM. Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: Considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. Arch Vet Science. 1999;4(1):5-15.

Adams LB, Dinauer MC, Morgenstern DE, Krahenbuhl JL. Comparison of the roles of reactive oxygen and nitrogen intermediates in the host response to *Mycobacterium tuberculosis* using transgenic mice. Tuber Lung Dis. 1997;78(5-6):237-46.

Aguilar D, Hanekom M, Mata D, Gey van Pittius NC, van Helden PD, Warren RM, Hernandez-Pando R. *Mycobacterium tuberculosis* strains with the Beijing genotype demonstrate variability in virulence associated with transmission. Tuberculosis (Edinb). 2010;90(5):319-25.

Amaral EP, Kipnis TL, Carvalho ECQ, Dias Da Silva W, Leão SC, Lasunskaja E. Difference in virulence of *Mycobacterium avium* isolates sharing identical DNA fingerprint determined in murine model of experimental lung infection. PloS One. 2010. In press.

Arko-Mensah J, Rahman MJ, Degano IR, Chuquimia OD, Fotio AL, Garcia I, Fernandez C. Resistance to mycobacterial infection: a pattern of early immune responses leads to a better control of pulmonary infection in C57BL/6 compared with BALB/c mice. Vaccine. 2009;27(52):7418-27.

Attarian R, Bennie C, Bach H, Av-Gay Y. Glutathione disulfide and S-nitrosoglutathione detoxification by *Mycobacterium tuberculosis* thioredoxin system. FEBS Letters 2009;583:3215-20.

Ayele WY, Neill SD, Zinsstag J, Weiss MG, Pavlik I. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. Int J Tuberc Lung Dis. 2004;8(8):924-37.

Barrera L. The basic of clinical bacteriology. In: Palomino JC, Leão SC, Ritacco V, editors. Tuberculosis 2007 - From basic science to patient care. 2007. p. 93-112. Available from: <http://www.tuberculosisistextbook.com>. [2010 Oct 15].

Bonato VL, Goncalves ED, Soares EG, Santos Junior RR, Sartori A, Coelho-Castelo AA, Silva CL. Immune regulatory effect of pHSP65 DNA therapy in pulmonary tuberculosis: activation of CD8+ cells, interferon-gamma recovery and reduction of lung injury. Immunology. 2004;113(1):130-8.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22]

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de recomendações para o controle da Tuberculose no Brasil. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2010.

Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(6):3684-9.

Canaday DH, Wilkinson RJ, Li Q, Harding CV, Silver RF, Boom WH. CD4(+) and CD8(+) T cells kill intracellular *Mycobacterium tuberculosis* by a perforin and Fas/Fas ligand-independent mechanism. J Immunol. 2001;167(5):2734-42.

Center for Diseases Control and Prevention (CDC). Trends in Tuberculosis, 2008. Available from: <http://www.cdc.gov>. [2009 Jan 21].

Chan J, Fan XD, Hunter SW, Brennan PJ, Bloom BR. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. Infect Immun. 1991;59(5):1755-61.

Clemens DL. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. Trends Microbiol. 1996;4(3):113-8.

Cole ST, Barrell BG. Analysis of the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Novartis Found Symp. 1998;217:160-77.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 1998;393(6685):537-44.

Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. J Exp Med. 1993;178(6):2243-7.

Corbett EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams BG, Raviglione MC, Dye C. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. Arch Intern Med. 2003;163(9):1009-21.

Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson

RA, Huchzermeyer HF, de Kantor I, Meslin FX. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis*. 1998;4(1):59-70.

Cosma CL, Sherman DR, Ramakrishnan L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2003;57:641-76.

Cruz A, Khader SA, Torrado E, Fraga A, Pearl JE, Pedrosa J, Cooper AM, Castro AG. Cutting edge: IFN-gamma regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during mycobacterial infection. *J Immunol*. 2006;177(3):1416-20.

Dalton DK, Haynes L, Chu CQ, Swain SL, Wittmer S. Interferon gamma eliminates responding CD4 T cells during mycobacterial infection by inducing apoptosis of activated CD4 T cells. *J Exp Med*. 2000;192(1):117-22.

Dankner WM, Waecker NJ, Essey MA, Moser K, Thompson M, Davis CE. *Mycobacterium bovis* infections in San Diego: a clinicoepidemiologic study of 73 patients and a historical review of a forgotten pathogen. *Medicine (Baltimore)*. 1993;72(1):11-37.

Dayaram YK, Talaue MT, Connell ND, Venketaraman V. Characterization of a Glutathione Metabolic Mutant of *Mycobacterium tuberculosis* and Its Resistance to Glutathione and Nitrosoglutathione. *Journal of Bacteriology* 2006;188(4):1364-72.

de Kantor IN, Ambroggi M, Poggi S, Morcillo N, Da Silva Telles MA, Osorio Ribeiro M, Garzon Torres MC, Llerena Polo C, Ribon W, Garcia V, Kuffo D, Asencios L, Vasquez Campos LM, Rivas C, de Waard JH. Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. *Tuberculosis (Edinb)*. 2008;88(4):358-65.

Dormans J, Burger M, Aguilar D, Hernandez-Pando R, Kremer K, Roholl P, Arend SM, van Soolingen D. Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitivity responses after infection with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in a BALB/c mouse model. *Clin Exp Immunol*. 2004;137(3):460-8.

Drobniewski F, Balabanova Y, Nikolayevsky V, Ruddy M, Kuznetsov S, Zakharova S, Melentyev A, Fedorin I. Drug-resistant tuberculosis, clinical virulence, and the dominance of the Beijing strain family in Russia. *JAMA*. 2005a;293(22):2726-31.

Drobniewski FA, Balabanova YM, Ruddy MC, Graham C, Kuznetsov SI, Gusarova GI, Zakharova SM, Melentyev AS, Fedorin IM. Tuberculosis, HIV seroprevalence and intravenous drug abuse in prisoners. *Eur Respir J*. 2005b;26(2):298-304.

Dunn PL, North RJ. Virulence ranking of some *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* strains according to their ability to multiply in the lungs, induce lung pathology, and cause mortality in mice. *Infect Immun.* 1995;63(9):3428-37.

Fattorini L, Nisini R, Fan Y, Li Y, Tan D, Mariontti S, Teloni R, Iona E, Orefici G. Exposure of BALB/c mice to low doses of *Mycobacterium avium* increases resistance to a subsequent high-dose infection. *Microbiology.* 2002;148:3173-81.

Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol.* 2001;19:163-96.

Ferraz JC, Melo FB, Albuquerque MF, Montenegro SM, Abath FG. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. *Braz J Med Biol Res.* 2006;39(11):1387-97.

Florido M, Appelberg R. Granuloma necrosis during *Mycobacterium avium* infection does not require tumor necrosis factor. *Infect Immun.* 2004;72(10):6139-41.

Florido M, Pearl JE, Solache A, Borges M, Haynes L, Cooper AM, Appelberg R. Gamma interferon-induced T-cell loss in virulent *Mycobacterium avium* infection. *Infect Immun.* 2005;73(6):3577-86.

Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Bloom BR. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are necessary for protection against *M. tuberculosis* in mice. *Infect Agents Dis.* 1993;2(4):259-62.

Fratti RA, Backer JM, Gruenberg J, Corvera S, Deretic V. Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J Cell Biol.* 2001;154(3):631-44.

Fratti RA, Chua J, Vergne I, Deretic V. *Mycobacterium tuberculosis* glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(9):5437-42.

Gan H, Lee J, Ren F, Chen M, Kornfeld H, Remold HG. *Mycobacterium tuberculosis* blocks crosslinking of annexin-1 and apoptotic envelope formation on infected macrophages to maintain virulence. *Nat Immunol.* 2008;9(10):1189-97.

Ganguly N, Siddiqui I, Sharma P. Role of *M. tuberculosis* RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence. *Tuberculosis (Edinb).* 2008;88(6):510-7.

Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, 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 PR, Parkhill J, Barrell BG, Cole ST, Gordon SV, Hewinson RG. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(13):7877-82.

Gil O, Guirado E, Gordillo S, Diaz J, Tapia G, Vilaplana C, Ariza A, Ausina V, Cardona PJ. Intragranulomatous necrosis in lungs of mice infected by aerosol with *Mycobacterium tuberculosis* is related to bacterial load rather than to any one cytokine or T cell type. Microbes Infect. 2006;8(3):628-36.

Glickman MS, Jacobs Jr WR. Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. Cell. 2001;104(4):477-85.

Gomez-Flores R, Gupta S, Tamez-Guerra R, Mehta RT. Determination of MICs for *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex in liquid medium by a colorimetric method. J Clin Microb. 1995;33:1842-6.

Gordon SV, Bottai D, Simeone R, Stinear TP, Brosch R. Pathogenicity in the tubercle bacillus: molecular and evolutionary determinants. Bioessays. 2009;31(4):378-88.

Grange JM. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. Tuberculosis (Edinb). 2001;81(1-2):71-7.

Grange JM, Yates MD. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. Vet Microbiol. 1994;40(1-2):137-51.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. Anal biochem. 1982;126(1):131-8.

Green RM, Seth A, Connell ND. A Peptide Permease Mutant of *Mycobacterium bovis* BCG Resistant to the Toxic Peptides Glutathione and S-Nitrosoglutathione. Infection and Immunity. 2000;68(2):429-36.

Guenin-Mace L, Simeone R, Demangel C. Lipids of pathogenic Mycobacteria: contributions to virulence and host immune suppression. Transbound Emerg Dis. 2009;56(6-7):255-68.

Guinn KM, Hickey MJ, Mathur SK, Zakel KL, Grotzke JE, Lewinsohn DM, Smith S, Sherman DR. Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol. 2004;51(2):359-70.

Hargreaves DC, Medzhitov R. Innate sensors of microbial infection. *J Clin Immunol*. 2005;25(6):503-10.

Hatzinger PB, Palmer P, Smith RL, Peñarrieta CT, Yoshinari T. Applicability of tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity and viability of groundwater bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 2003;52:47-58.

Hernandez Pando R, Aguilar D, Cohen I, Guerrero M, Ribon W, Acosta P, Orozco H, Marquina B, Salinas C, Rembao D, Espitia C. Specific bacterial genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* cause extensive dissemination and brain infection in an experimental model. *Tuberculosis (Edinb)*. 2010;90(4):268-77.

Holckmann Mea. Anti-TNF- α therapy of rheumatoid arthritis: What have we loamed? *Ann Rev Immunol*. 2001;19:193.

Hughes AL, Friedman R, Murray M. Genomewide pattern of synonymous nucleotide substitution in two complete genomes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(11):1342-6.

Jayachandran R, Gatfield J, Massner J, Albrecht I, Zanolari B, Pieters J. RNA interference in J774 macrophages reveals a role for coronin 1 in mycobacterial trafficking but not in actin-dependent processes. *Mol Biol Cell*. 2008;19(3):1241-51.

Jayachandran R, Sundaramurthy V, Combaluzier B, Mueller P, Korf H, Huygen K, Miyazaki T, Albrecht I, Massner J, Pieters J. Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin. *Cell*. 2007;130(1):37-50.

Junqueira-Kipnis AP, Basaraba RJ, Gruppo V, Palanisamy G, Turner OC, Hsu T, Jacobs Jr WR, Fulton SA, Reba SM, Boom WH, Orme IM. Mycobacteria lacking the RD1 region do not induce necrosis in the lungs of mice lacking interferon- γ . *Immunology*. 2006;119(2):224-31.

Kansal RG, Gomez-Flores R, Mehta RT. Change in colony morphology influences the virulence as well as the biochemical properties of the *Mycobacterium avium* complex. *Microbial Pathogenesis*. 1998;25:203-14.

Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol*. 2001a;1(1):20-30.

Kaufmann SH, Andersen P. Immunity to mycobacteria with emphasis on tuberculosis: implications for rational design of an effective tuberculosis vaccine. *Chem Immunol*. 1998;70:21-59.

Kaufmann SHE. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature*. 2001b;1:20-30.

Khader SA, Cooper AM. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine*. 2008;41(2):79-83.

Kobzik L. The lung. In: Contran RS, Kumar V, Collins, T, editors. *Robins pathologic basis of disease*. 6th ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 1999. p. 697-755.

Lasunskaja E, Ribeiro SC, Manicheva O, Gomes LL, Suffys PN, Mokrousov I, Ferrazoli L, Andrade MR, Kritski A, Otten T, Kipnis TL, da Silva WD, Vishnevsky B, Oliveira MM, Gomes HM, Baptista IF, Narvskaya O. Emerging multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype circulating in Russia express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence. *Microbes Infect*. 2010;12(6):467-75.

Lasunskaja EB, Campos MN, de Andrade MR, Damatta RA, Kipnis TL, Einicker-Lamas M, Da Silva WD. Mycobacteria directly induce cytoskeletal rearrangements for macrophage spreading and polarization through TLR2-dependent PI3K signaling. *J Leukoc Biol*. 2006;80(6):1480-90.

León DA, Zumárraga MJ, Jiménez Oropeza R, Gioffré AK, Bernardelli A, Orozco Estévez H, Cataldi AA, Hernández Pando R. *Mycobacterium bovis* with different genotypes and from different hosts induce dissimilar immunopathological lesions in a mouse model of tuberculosis. *Clinical and Experimental Immunology*. 2009;157:139-47.

Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA, Sherman DR. Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guerin attenuation. *J Infect Dis*. 2003;187(1):117-23.

Lopez B, Aguilar D, Orozco H, Burger M, Espitia C, Ritacco V, Barrera L, Kremer K, Hernandez-Pando R, Huygen K, van Soolingen D. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol*. 2003;133(1):30-7.

Manca C, Tsenova L, Bergtold A, Freeman S, Tovey M, Musser JM, Barry CE, 3rd, Freedman VH, Kaplan G. Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha /beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(10):5752-7.

Manca C, Tsenova L, Freeman S, Barczak AK, Tovey M, Murray PJ, Barry C, Kaplan G. Hypervirulent *M. tuberculosis* W/Beijing strains upregulate type I IFNs and increase expression of negative regulators of the Jak-Stat pathway. *J Interferon Cytokine Res*. 2005;25(11):694-701.

Marquina-Castillo B, Garcia-Garcia L, Ponce-de-Leon A, Jimenez-Corona ME, Bobadilla-Del Valle M, Cano-Arellano B, Canizales-Quintero S, Martinez-Gamboa A, Kato-Maeda M, Robertson B, Young D, Small P, Schoolnik G, Sifuentes-Osornio J, Hernandez-Pando R. Virulence, immunopathology and transmissibility of selected strains of *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *Immunology*. 2009;128(1):123-33.

Martins de Sousa E, Bonfim de Bortoli F, Amaral EP, Batista AC, Liberman Kipnis T, Marques Cardoso A, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP. Acute immune response to *Mycobacterium massiliense* in C57BL/6 and BALB/c mice. *Infect Immun*. 2010;78(4):1571-81.

Matthias D. Infecções por Micobactérias. In: Beer J, editor. Doenças infecciosas em animais domésticos. São Paulo: ROCA; 1998. p. 261.

Medina E, Ryan L, LaCourse R, North RJ. Superior virulence of *Mycobacterium bovis* over *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) for Mtb-resistant and Mtb-susceptible mice is manifest as an ability to cause extrapulmonary disease. *Tuberculosis (Edinb)*. 2006;86(1):20-7.

Miller CC, Rawat M, Johnson T, Av-Gay Y. Innate protection of *Mycobacterium smegmatis* against the antimicrobial activity of nitric oxide is provided by mycothiol. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(9):3364-6.

Mishra BB, Moura-Alves P, Sonawane A, Hacoheh N, Griffiths G, Moita LF, Anes E. *Mycobacterium tuberculosis* protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. *Cell Microbiol*. 2010;12(8):1046-63.

Narvskaya O, Mokrousov I, Otten T, Vishnevskiy B. Molecular markers: application for studies of *Mycobacterium tuberculosis* population in Russia. In: Reed MM, editor. Trends in DNA Fingerprinting Research. New York, NY: Nova Science Publishers; 2005. p. 111-25.

North RJ, Ryan L, LaCourse R, Mogues T, Goodrich ME. Growth rate of mycobacteria in mice as an unreliable indicator of mycobacterial virulence. *Infect Immun*. 1999;67(10):5483-5.

Okamoto Yoshida Y, Umemura M, Yahagi A, O'Brien RL, Ikuta K, Kishihara K, Hara H, Nakae S, Iwakura Y, Matsuzaki G. Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *J Immunol*. 2010;184(8):4414-22.

Ordway D, Henao-Tamayo M, Harton M, Palanisamy G, Troutt J, Shanley C, Basaraba RJ, Orme IM. The hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* strain HN878

induces a potent TH1 response followed by rapid down-regulation. *J Immunol.* 2007;179(1):522-31.

Ordway D, Henao-Tamayo M, Smith E, Shanley C, Harton M, Trout J, Bai X, Basaraba RJ, Orme IM, Chan ED. Animal model of *Mycobacterium abscessus* lung infection. *J Leukoc Biol.* 2008;83(6):1502-11.

Orme IM. The kinetics of emergence and loss of mediator T lymphocytes acquired in response to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 1987;138(1):293-8.

Orme IM, Miller ES, Roberts AD, Furney SK, Griffin JP, Dobos KM, Chi D, Rivoire B, Brennan PJ. T lymphocytes mediating protection and cellular cytolysis during the course of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Evidence for different kinetics and recognition of a wide spectrum of protein antigens. *J Immunol.* 1992;148(1):189-96.

Parwati I, van Crevel R, van Soolingen D. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(2):103-11.

Paula MO, Fonseca DM, Wowk PF, Gembre AF, Fedatto PF, Sergio CA, Silva CL, Bonato VL. Host genetic background affects regulatory T-cell activity that influences the magnitude of cellular immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunol Cell Biol.* 2010.

Pieters J. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes Infect.* 2001;3(3):249-55.

Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol.* 2002;46(3):709-17.

Redford PS, Boonstra A, Read S, Pitt J, Graham C, Stavropoulos E, Bancroft GJ, O'Garra A. Enhanced protection to *Mycobacterium tuberculosis* infection in IL-10-deficient mice is accompanied by early and enhanced Th1 responses in the lung. *Eur J Immunol.* 2010;40(8):2200-10.

Reed MB, Domenech P, Manca C, Su H, Barczak AK, Kreiswirth BN, Kaplan G, Barry CE, 3rd. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature.* 2004;431(7004):84-7.

Riley LW. Of mice, men, and elephants: *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and pathogenesis. *J Clin Invest.* 2006;116(6):1475-8.

Rodriguez S, Romero B, Bezos J, de Juan L, Alvarez J, Castellanos E, Moya N, Lozano F, Gonzalez S, Saez-Llorente JL, Mateos A, Dominguez L, Aranaz A. High spoligotype diversity within a *Mycobacterium bovis* population: clues to understanding the demography of the pathogen in Europe. *Vet Microbiol.* 2010;141(1-2):89-95.

Rook GA, al Attiyah R. Cytokines and the Koch phenomenon. *Tubercle.* 1991;72(1):13-20.

Rua-Domenech R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis.* 2006;86:77-109.

Sachdeva P, Misra R, Tyagi AK, Singh Y. The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*: regulation of the regulators. *FEBS J.* 2010;277(3):605-26.

Saunders BM, Frank AA, Orme IM. Granuloma formation is required to contain bacillus growth and delay mortality in mice chronically infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology.* 1999;98(3):324-8.

Sherman DR, Guinn KM, Hickey MJ, Mathur SK, Zakel KL, Smith S. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: Delta RD1 is more virulent than *M. bovis* bacille Calmette-Guerin in long-term murine infection. *J Infect Dis.* 2004;190(1):123-6.

Shrikrishna D, Rua-Domenech R, Smith NH, Colloff A, Coutts I. Human and canine pulmonary *Mycobacterium bovis* infection in the same household: re-emergence of an old zoonotic threat? *Thorax.* 2009;64:89-91.

Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(3):463-96.

Steyn AJ, Collins DM, Hondalus MK, Jacobs Jr WR, Kawakami RP, Bloom BR. *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 interacts with *RpoV* to affect host survival but is dispensable for in vivo growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(5):3147-52.

Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russell DG. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science.* 1994;263(5147):678-81.

Sugawara I, Yamada H, Kazumi Y, Doi N, Otomo K, Aoki T, Mizuno S, Udagawa T, Tagawa Y, Iwakura Y. Induction of granulomas in interferon-gamma gene-disrupted mice by avirulent but not by virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med*

Microbiol. 1998;47(10):871-7.

Torgerson D. Does risk to humans justify high cost of fighting bovine TB? . Nature. 2008;455(23):1029.

Ullrich HJ, Beatty WL, Russell DG. Interaction of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes with the antigen presentation pathway. J Immunol. 2000;165(11):6073-80.

Umemura M, Yahagi A, Hamada S, Begum MD, Watanabe H, Kawakami K, Suda T, Sudo K, Nakae S, Iwakura Y, Matsuzaki G. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin infection. J Immunol. 2007;178(6):3786-96.

van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Rev. 2002;15(2):294-309.

van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, Brenner M, Peters PJ. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. Cell. 2007;129(7):1287-98.

Venketaraman V, Dayaram YK, Talaue MT, Connell ND. Glutathione and Nitrosoglutathione in Macrophage Defense against *Mycobacterium tuberculosis*. Infect and Immunity. 2005;73(3):1886-9.

Waters WR, Palmer MV, Nonnecke BJ, Thacker TC, Scherer CF, Estes DM, Jacobs Jr WR, Glatman-Freedman A, Larsen MH. Failure of a *Mycobacterium tuberculosis* DeltaRD1 DeltapanCD double deletion mutant in a neonatal calf aerosol *M. bovis* challenge model: comparisons to responses elicited by *M. bovis* bacille Calmette Guerin. Vaccine. 2007;25(45):7832-40.

Welin A, Winberg ME, Abdalla H, Sarndahl E, Rasmusson B, Stendahl O, Lerm M. Incorporation of *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan into macrophage membrane rafts is a prerequisite for the phagosomal maturation block. Infect Immun. 2008;76(7):2882-7.

World Health Organizaton (WHO). Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing: WHO report 2005. Geneva: World Health Organization; 2007.

World Health Organizaton (WHO). Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing: WHO report 2007. Geneva: World Health Organization; 2009a.

World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Control: A short update to the 2009 report. Geneva: World Health Organization; 2009b.

World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing: WHO report 2008. Geneva: World Health Organization; 2010.

Wu S, Howard ST, Lakey DL, Kipnis A, Samten B, Safi H, Gruppo V, Wikel B, Shams H, Basaraba RJ, Orme IM, Barnes PF. The principal sigma factor sigA mediates enhanced growth of *Mycobacterium tuberculosis* in vivo. *Mol Microbiol.* 2004;51(6):1551-62.

Yu K, Mitchell C, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR, Chan J. Toxicity of nitrogen oxides and related oxidants on mycobacteria: *M. tuberculosis* is resistant to peroxytrifluoromethyl anion. *Tuber Lung Dis.* 1999;79(4):191-8.