

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIAS**

Álvaro Menin

**ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS DA INTERAÇÃO DO
MYCOBACTERIUM BOVIS EM HOSPEDEIROS BOVINOS
NATURALMENTE INFECTADOS E COINFECTADOS COM
VÍRUS DA LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA (BLV)**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Biotecnologia e Biociências.

Orientador:
Prof. Dr. André Báfica.

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Menin, Álvaro Menin

Aspectos imunopatológicos da interação do *Mycobacterium*
bovis em hospedeiros bovinos naturalmente infectados e
coincidentes com vírus da leucose enzootica bovina (BLV) /
Álvaro Menin Menin ; orientador, André Báfica Báfica -
Florianópolis, SC, 2013.
123 p.

Tese (doutorado) Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Imunopatologia e
granuloma. 3. Tuberculose. 4. Bovinos. 5. *Mycobacterium*.
I. Báfica, André Báfica. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e
Biociências. III. Título.

Álvaro Menin

**Aspectos imunopatológicos da interação do *Mycobacterium bovis* em
hospedeiros bovinos naturalmente infectados e coinfetados com vírus
da leucose enzoótica bovina (BLV)**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de
Doutor, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biociências.

Florianópolis, 22 de Fevereiro de 2013.

Prof. Dr. Marcelo Maraschin
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. André Báfica
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Luciano Paulino Silva
EMBRAPA – Cenargen, DF.

Prof. Dr. Célso Pilati
Universidade do Estado de Santa Catarina

Prof. Dra. Maria Luiza Bazzo
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Mário Steindel
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho aos meus pais
*Sérgio M. Menin e Nagibe M.
Menin*, guias do meu caminho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. André Báfica pela orientação, oportunidades de aprendizado e trabalho em ambiente de ciência nobre e digna, onde se aprende a ver a ciência de forma cética e muito além do método. Obrigado pelos exemplos de trabalho e dedicação.

Ao Prof. Mário Steindel pelas oportunidades de aprendizado e por ajudar a trilhar um caminho com muita maturidade e sabedoria.

Aos Professores Edmundo Grisard, Daniel Mansur e Fernando Spiller pelas discussões científicas sempre voltadas a incitar o espírito crítico e pelo apoio para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Célso Pilati pela ajuda permanente e oportunidades de grande aprendizado. Fica minha grande admiração pelo seu trabalho.

À Renata, Mariel e Paula pela ajuda fundamental na realização deste trabalho.

À Nicole, Nicolí e Stefanny pela ajuda permanente e fundamental durante todo o período de trabalho no MIP.

A todos que fazem parte ou tiveram sua passagem no time LIDI, pela ajuda e convivência, fundamentais para a realização deste trabalho e minha formação. É uma honra poder conviver com um grupo de pessoas tão prodigiosas.

A equipe de trabalho do laboratório de Protozoologia, pessoas fantásticas, que muito me auxiliaram e fizeram parte deste período tão enriquecedor.

À minha família Nagibe, Sérgio, Sidenei, Claudete e aos pequenos Antônio e Yasmin, meu porto seguro incondicional. Sem vocês nada seria possível.

À Carolina pela grande companheira que fostes em todos os momentos desta etapa. É uma honra estar ao lado de uma pessoa tão digna e batalhadora.

Ao Fernando Cannella e Vagner, grandes irmãos que sempre me apoiaram e me ajudaram a superar os desafios com sabedoria.

Aos amigos Thiago, Vanessa, Luísa, Daniela e Cleimon, pessoas fantásticas e prestimosas, que muito me auxiliaram neste período.

Às agências de fomento CAPES pela bolsa de estudos, CNPq (INCT/INTEV) e NIH (GRIP/Fogarty) pelo apoio financeiro.

À CIDASC pelo auxílio para realização dos trabalhos e ao MAPA pelos materiais e cepas de referência.

“Aquilo que se faz com amor sempre estará
além do bem e do mal”

(Friedrich Nietzsche)

RESUMO

A pesquisa racional de novos candidatos a antígenos vacinais ou imunodiagnóstico destinados ao controle da tuberculose bovina (bTB) requer o conhecimento básico da imunopatogênese da doença. No entanto, ainda há escassez de informações sobre os aspectos imunopatológicos da interação *Mycobacterium bovis*-hospedeiro durante a infecção natural de bovinos. Na análise de uma coorte de 349 bovinos positivos no teste tuberculínico (PPD), em 247 bovinos foi confirmada a infecção natural pelo *M. bovis*. Dos animais positivos para *M. bovis*, 92% (228/247) não apresentavam sinais sugestivos da doença, entretanto, apresentavam lesões de bTB graves e disseminadas. Além disso, a disseminação das lesões de bTB estava correlacionada positivamente com a gravidade da patologia da doença e carga bacteriana viável no tecido. Adicionalmente, o encapsulamento do granuloma foi correlacionado negativamente com o crescimento do *M. bovis* nos tecidos, bem como com a gravidade da patologia, sugerindo que o encapsulamento é um mecanismo dinâmico e pode ser eficaz para controlar a proliferação/disseminação micobacteriana intragranuloma durante a infecção natural. Além disso, a avaliação detalhada da resposta granulomatosa nos pulmões demonstrou que o número de células gigantes multinucleadas tipo Langhans correlaciona negativamente com a contagem micobacteriana. Em contraste, a população de neutrófilos na resposta granulomatosa tuberculosa foi associado com o aumento na proliferação do *M. bovis* intragranuloma. Os achados aqui apresentados sugerem que o encapsulamento e as células gigantes multinucleadas estão associados ao controle da infecção pelo *M. bovis*, enquanto que os neutrófilos podem servir como um biomarcador celular de proliferação bacteriana durante a infecção natural. Como prova de conceito de que a dinâmica celular incitada durante a infecção por *M. bovis* influencia o controle do crescimento micobacteriano, analisamos parâmetros imunopatológicos durante a co-infecção natural com o vírus da leucose enzoótica bovina (BLV), um patógeno que modula a resposta imune adaptativa. Bovinos coinfectados com *M. bovis* e BLV apresentaram maior carga micobacteriana intragranuloma e uma doença mais grave. Na análise histomorfológica das lesões granulomatosas, observamos uma diminuição significativa na população de linfócitos, seguido por um aumento no número de neutrófilos e menor deposição de tecido conjuntivo. Estes dados sugerem uma alteração no fluxo de células para

o ambiente intragranuloma devido a defeitos linfocitários. Consistente com essa hipótese, observamos uma menor resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) em animais com linfocitose persistente (LP-BLV+). Estas evidências indicam que a infecção pelo BLV está associada à perda da homeostase da resposta imune celular do hospedeiro e possivelmente ao aumento da suscetibilidade do hospedeiro a bTB. Em conjunto, nossos dados integram a resposta granulomatosa do hospedeiro com a carga infecciosa micobacteriana e revelam novos elementos para o entendimento da imunopatogênese da bTB que poderiam ser empregados na implementação de estratégias racionais de controle da tuberculose bovina.

Palavras-chave: imunopatologia, tuberculose, bovinos, granuloma, *Mycobacterium*.

ABSTRACT

Rational discovery of novel immunodiagnostic and vaccine candidate antigens to control bovine tuberculosis (bTB) requires knowledge of disease immunopathogenesis. However, there remains a paucity of information on the *Mycobacterium bovis*-host immune interactions during the natural infection. Analysis of 247 naturally tuberculinic test positive (PPD) *M. bovis*-infected cattle revealed that 92% of these animals were found to display no clinical signs, but presented disseminated bTB-lesions positively correlated with both pathology severity score and viable tissue bacterial loads. Additionally, granuloma encapsulation negatively correlated with *M. bovis* growth as well as pathology severity, suggesting that encapsulation is an effective mechanism to control bacterial proliferation during natural infection. Moreover, multinucleated giant cell numbers were found to negatively correlate with bacterial counts in lung granulomas. In contrast, neutrophil numbers in the granuloma were associated with increased *M. bovis* proliferation. To better understand the role of the granulomatous response for the control of mycobacterial growth during infection by *M. bovis*, immunopathological parameters during co-infection with natural bovine leukemia virus (BLV), a pathogen that modulates the adaptive immune response, were analyzed. Cattle co-infected with *M. bovis* and BLV had higher mycobacterial intragranuloma load and more severe disease. In the histomorphological analysis of granulomatous lesions, we observed a significant decrease in the lymphocyte population followed by an increase in neutrophils and a reduction in connective tissue deposition. These data suggest an alteration in the cell flow for the intragranuloma environment due to defective lymphocytes. Consistent with this hypothesis, we observed a lower delayed-type hypersensitivity (DTH) response in animals with persistent lymphocytosis (LP-BLV+). This evidence indicates that BLV infection is associated with a loss of homeostasis of the host cellular immune response and possibly increased susceptibility of the host to bTB. Together, our data integrate the host granulomatous response with the mycobacterial infectious load and reveal new elements for understanding the immunopathogenesis of bTB which can be used in the implementation of rational strategies to control bovine tuberculosis.

Key Words: immunopathology, tuberculosis, cattle, granuloma, *Mycobacterium*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição mundial e formas clínica da tuberculose bovina nos rebanhos bovinos.....	29
Figura 2 - Diagrama esquemático do ciclo de transmissão do <i>M. bovis</i> . TCC, teste tuberculínico cervical comparativo.....	32
Figura 3 - Representação esquemática das estruturas que compõem a parede celular micobacteriana.	36
Figura 4 - Representação esquemática das múltiplas interações entre ligantes das CMTBs e os receptores das APCs.....	38
Figura 5 - Diagrama esquemático proposto para a resposta imune celular do hospedeiro à bTB.....	40
Figura 6 - Modelo conceitual da estrutura do granuloma tuberculoso. Representação esquemática das diferentes populações celulares e estruturas da lesão granulomatosa.	42
Figura 7 - Representação esquemática da partícula viral do BLV.....	44
Figura 8 - Exame clínico e exame anatomopatológica de bovinos naturalmente infectados pelo <i>M. bovis</i>	53
Figura 9 - Análise bacteriológica e identificação dos isolados de <i>M. bovis</i>	56
Figura 10 - Aspectos clínico-patológicos de bovinos naturalmente infectados com <i>M. bovis</i>	64
Figura 11 - Disseminação anatômica das lesões de bTB e desafio infeccioso em bovinos naturalmente infectados com <i>M. bovis</i>	66
Figura 12 - Análise histopatológica do nível de encapsulamento dos granulomas primários em bovinos naturalmente infectados com <i>M. bovis</i> . 68	
Figura 13 - Análise histopatológica do perfil celular da reação granulomatosa tuberculosa no pulmão de bovinos naturalmente infectados com <i>M. bovis</i>	73
Figura 14 - Gravidade da patologia de bTB em bovinos durante a infecção natural concomitante pelo BLV e <i>M. bovis</i>	78
Figura 15 - Intensidade e perfil histomorfológico da reação de hipersensibilidade de tipo tardia (DTH) em bovinos naturalmente infectados com BLV.....	81
Figura 16 - Expansão proliferativa de PBMCs em animais LP-BLV+.....	83
Figura 17 - Diagrama mostrando os eventos prováveis durante a exposição do bovino ao <i>M. bovis</i>	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de micobactérias que integram o Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (CMTB) e seus respectivos hospedeiros preferenciais.....	27
Tabela 2 - Resumo das características dos grupos experimentais utilizados na análise da DTH e resposta proliferativa de linfócitos.....	60
Tabela 3 - Perfil sorológico e micobacteriológico dos animais estudados. .	63
Tabela 4 - Distribuição e estágio de desenvolvimento histológico de granulomas primários em bovinos naturalmente infectados pelo <i>M. bovis</i> .	70

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs -células apresentadoras de antígenos
AS – assintomáticos
BAAR – bacilo álcool-ácido resistente (coloração de Ziehl Neelsen)
BLV – vírus da leucose enzoótica bovina
bTB – tuberculose bovina
BVD- vírus da diarreia viral bovina
CD – agrupamento de diferenciação ou cluster of differentiation, do inglês
CFSE – carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster
CMTB – complexo Mycobacterium tuberculosis
ConA – concanavalina A
D1 – dectina-1
DC – células dendríticas
DC – SIGN - receptores de células dendríticas
DTH – reação de hipersensibilidade do tipo tardia
HTLV – vírus linfotrópico humano de células T
IBR – vírus da Rinotraqueíte infecciosa bovina
IDGA – imunodifusão em gel de agarose
IFN – interferon
IL- interleucina
INF- γ – interferon- γ
LM – lipomananos
LP – linfocitose persistente
mAGP - complexo ácido micólico-arabinogalactanopeptidoglicano
ManLAM - mannose-lipoarabinomananos
MHC – complexo principal de histocompatibilidade
MNT- micobactérias denominadas atípicas ou Não-Tuberculosas
MR – receptores de manose
MS – sinais clínicos moderados
OK – meio de cultura Ogawa-Kudoh
PBMC – células mononucleares do sangue periférico
PCR – reação em cadeia da polimerase
PDIM – phthiocerol dimycocerosates
PIM – fosfatidilinositol manosídeo
PNCEBT – programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina e Bubalina
PPD – do inglês Purified Protein Derivative

PPDa – *Purified Protein Derivative* produzida a partir da cepa D4 – *M. avium*
PPDb – *Purified Protein Derivative* produzida a partir da cepa AN5 – *M. bovis*
SEM – erro padrão da média
sIg – imunoglobulina de superfície
SS – sinais clínicos graves
STB – bacilo da tuberculose branda (*Mycobacterium microtti*).
STLV – vírus linfotrópico símio de células T
T7S ou ESX - sistema especializado de secreção do tipo VII.
TCC – teste de tuberculina cervical comparativo
TGF- β – fator de crescimento de células T
TLR – receptores do tipo *Toll*
TNF – fator de necrose tumoral
UFC – unidade formadora de colônia (bacteriologia)
ZN– método de coloração de Ziehl-Neelsen

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1 Etiologia da tuberculose bovina.....	26
1.2 Epidemiologia e controle da tuberculose bovina.....	28
1.3 Patogênese e imunopatologia da tuberculose bovina.....	34
1.4 Papel das coinfeções na suscetibilidade de bovinos ao <i>M. bovis</i>	43
2. OBJETIVO GERAL.....	49
2.2 Objetivos Específicos.....	49
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
3.1 Populações de estudo e exame pré-abate.....	51
3.2 Exame post mortem.....	53
3.3 Cultura bacteriológica e identificação dos isolados de <i>M. bovis</i> obtidos de amostras clínicas de animais naturalmente infectados.....	55
3.4 Análise histopatológica e histomorfológica das lesões granulomatosas tuberculosas dos animais naturalmente infectados pelo <i>M. bovis</i>	57
3.5 Exame sorológico.....	58
3.6 Análise da reação de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) e reação proliferativa de linfócitos em bovinos com leucose enzoótica bovina (LP-BLV).....	59
3.6.1. Grupos experimentais.....	59
3.6.2 Determinação da intensidade e padrão histomorfológico da reação de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH).....	60
3.6.3. Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).....	61
3.7 Análise estatística.....	61
4. RESULTADOS.....	63
5. DISCUSSÃO.....	85
6. CONCLUSÕES.....	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
ANEXO A - PLoSOne - doi:10.1371/journal.pone.0053884.....	123

INTRODUÇÃO

O termo “Tuberculose”, (do latim *tuberculum* = pequeno tubérculo ou nódulo), utilizado por Johann Lukas Schönlein em 1839, esta associado ao padrão estrutural nodular das lesões granulomatosas ou granulomas, característicos da enfermidade (Palmer, 2002). Atualmente o termo é empregado para designar a doença causada por micobactérias que integram o “complexo *Mycobacterium tuberculosis*” (CMTB), também denominadas micobactérias tuberculosas, que inclui *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), principal agente da tuberculose humana (TB) e *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), agente primário da tuberculose bovina (bTB) (Collins e Grange, 1983; Sreevatsan, Pan *et al.*, 1997; Michel, Müller *et al.*, 2009; Parkash, Singh *et al.*, 2009).

A tuberculose bovina (bTB) é uma doença infectocontagiosa de notificação obrigatória e compulsória, com evolução crônica e debilitante que afeta a maioria dos rebanhos bovinos comerciais do mundo e limita o comércio internacional de animais e produtos de origem animal (Cosivi, O., Grange, J. *et al.*, 1998; Thoen, Lobue *et al.*, 2006; Michel, Müller *et al.*, 2009; Oie, 2011). Adicionalmente, a bTB é considerada uma importante zoonose negligenciada, visto que a infecção por *M. bovis*, em muitas regiões do mundo, ainda é considerada um dos principais problemas de saúde pública, destacando assim a representatividade de medidas de controle baseadas no entendimento da dinâmica da infecção.

Apesar da importância da bTB para o cenário mundial, até o momento não existem modelos vacinais eficazes ou tratamentos viáveis para a doença e a prova oficial utilizada para diagnóstico da infecção em bovinos é pouco eficiente (Norby, Bartlett *et al.*, 2004; De La Rua-Domenech, Goodchild *et al.*, 2006; Claridge, Diggle *et al.*, 2012). Além disso, a principal política adotada pelos órgãos oficiais de defesa sanitária animal para o controle da bTB é o diagnóstico seguido de abate sanitário dos bovinos positivos (Mapa/Sda, 2006; Evans, Smith *et al.*, 2007; Oie, 2011).

Em conjunto, estas evidências ressaltam a necessidade urgente de entender os mecanismos básicos da imunopatogênese bem como elucidar aspectos fundamentais da interação *Mycobacterium bovis*-hospedeiro bovino, visto que se tratam de requisitos diretivos mínimos para o desenvolvimento racional de estratégias de imunoprofilaxia e

diagnóstico, aplicáveis às políticas de vigilância e controle/erradicação da tuberculose bovina.

1.1 Etiologia da tuberculose bovina

O gênero *Mycobacterium* (Classe: Actinobacteria; Ordem: Actinomycetales; Família: Mycobacteriaceae) congrega *M. leprae* (causador da Hanseníase), micobactérias denominadas atípicas ou Não-Tuberculosas (MNT) e espécies que classicamente integram o Complexo CMTB ou micobactérias tuberculosas (Grange, 1996).

Os membros do CMTB estão entre os mais importantes patógenos que afetam o homem e os animais e compreendem: *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. bovis-Bacille Calmette-Guérin (BCG)*, *M. bovis caprae*, *M. africanum*, *M. pinnipedii*, e, *M. microti* (Sreevatsan, Pan *et al.*, 1997; Brosch, Gordon *et al.*, 2002; Garnier, Eiglmeier *et al.*, 2003; Michel, Müller *et al.*, 2009; Parkash, Singh *et al.*, 2009; Collins, 2011). Embora os membros deste grupo possam diferentes características fenotípicas e hospedeiros mamíferos preferenciais **Tabela 1**, podem ser considerados um dos exemplos mais extremos de relação genética, com cerca de 0,01% - 0,03% de variação genética entre eles (Sreevatsan, Pan *et al.*, 1997; Gutacker, Smoot *et al.*, 2002; Gutierrez, Brisse *et al.*, 2005). *M. canettii*, que até pouco tempo integrava o grupo das micobactérias tuberculosas, teve sua classificação rediscutida, uma vez que os padrões de diversidade genética e fenotípica indicam uma linhagem relacionada à precursora do CMTB, e não um membro deste grupo (Fabre, Koeck *et al.*, 2004; Gutierrez, Brisse *et al.*, 2005; Gagneux, 2012), sendo recentemente classificado como “bacilo da tuberculose branda” (STB) (Gutierrez, Brisse *et al.*, 2005; Gagneux, 2012). Quanto as MNTs, apesar de estarem associadas à infecção nos animais, causando as chamadas micobacterioses (Katoch, 2004), sua importância maior se justifica não pela doença clínica, mas pela possibilidade de reação cruzada com as micobactérias tuberculosas nos testes diagnósticos (Brasil, 2004; Mapa/Sda, 2006; Oie, 2011; 2012a).

Tabela 1 - Espécies de micobactérias que integram o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) e seus respectivos hospedeiros preferenciais

Espécie	Hospedeiro
<i>M. tuberculosis</i>	Humanos
<i>M. bovis</i>	Bovinos e outros mamíferos
<i>M. bovis</i> - (BCG)	Cepa laboratorial – infecta humanos
<i>M. caprae</i>	Caprinos
<i>M. africanum</i>	Humanos
<i>M. microti</i>	Roedores
<i>M. pinnipedii</i>	Leões marinhos, focas e humanos.

Fonte: adaptado de (Gutierrez, Brisse *et al.*, 2005; Collins, 2011).

Após a descrição do *M. tuberculosis* por Robert Koch em março de 1882, Theobald Smith e os médicos veterinários Austin Peters e Langdon Frothingham, em 1898, observaram que o bacilo associado às lesões tuberculosas em bovinos, apresentava características morfológicas e de crescimento *in vitro* distintas, em detrimento ao bacilo previamente descrito por Robert Koch (Collins e Grange, 1983; Pritchard, 1988). Entretanto, somente na década de 70, Karlson e Lessel classificaram o principal agente da tuberculose bovina, que até então era descrito como uma variante do *Mycobacterium tuberculosis*, denominado *M. tuberculosis* subespécie *bovis*, como uma espécie: *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) (Collins e Grange, 1983; Grange e Collins, 1987; Grange, 1996; Garnier, Eiglmeier *et al.*, 2003).

M. bovis é descrito como um patógeno intracelular facultativo, fastidioso, com metabolismo aeróbico, imóvel, não esporulado e não flagelado que possui uma parede celular altamente complexa (Collins e Grange, 1983; Grange, 1996). Morfologicamente, *M. bovis* se apresenta como bacilo curto, com formato de bastonete reto, encurvado ou ainda ramificado, medindo 0,3-0,5 µm por 1-4 µm (Collins e Grange, 1983). Apesar de ser classificado citoquimicamente como Gram-positivo, coram-se fracamente pela coloração de Gram, apresenta como principal característica tintorial, a resistência ou estabilidade álcool-ácida, que lhe confere a propriedade de bacilo álcool-ácido-resistente (BAAR). Este conceito é aplicado na rotina diagnóstica visto que a técnica de Ziehl-Neelsen (ZN) é o método de eleição para coloração e pesquisa direta do bacilo (Collins e Grange, 1983; Grange, 1996).

Em meios sólidos tais como, *Löwenstein-Jensen*, *stonebrink* e Ogawa Kudoh, as colônias do *M. bovis* apresentam-se pequenas, com

aspecto rugoso ou de couve-flor, bordas irregulares, opacas ou com coloração amarelo-claro. Por ser um organismo fastidioso, cresce apenas em meios de cultura extremamente ricos, tendo piruvato de sódio como sua principal fonte de carbono (Grange, 1996; Oie, 2011). *M. bovis* possui um tempo médio de replicação de aproximadamente 16-22 horas, dependendo da oferta de nutrientes, o que torna o cultivo bastante dispendioso (Grange, 1996; Garnier, Eiglmeier *et al.*, 2003), de modo que o período médio de incubação, para isolamento do agente a partir de amostras clínicas é de aproximadamente 8-12 semanas a 37°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) (Oie, 2011).

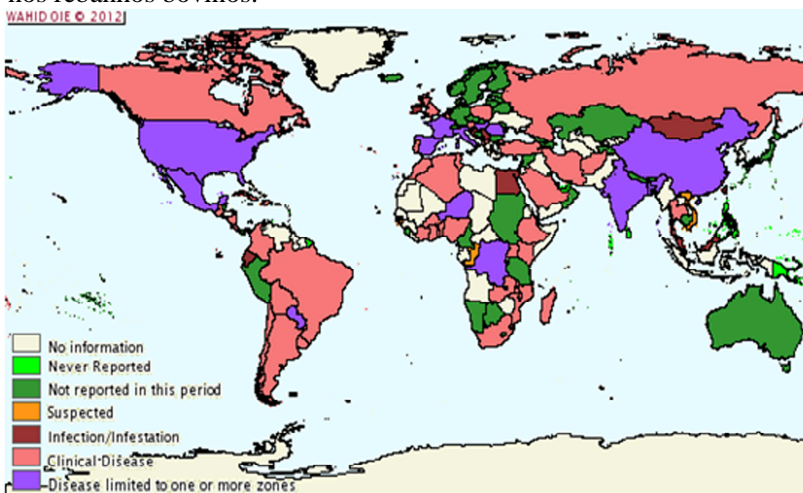
M. bovis é classificado como patógeno da classe de risco III (classes de I-IV), que congrega microrganismos que representam risco alto para o indivíduo, limitado para a comunidade, causando infecção grave tanto no homem quanto em animais e podem se propagar de indivíduo para indivíduo por transmissão aerógena (Mct/Ctnbio, 2002; Oie, 2011). Com base nesta classificação de grau de risco (III), torna-se necessário que os laboratórios que manipulam de *M. bovis* disponham de um amplo programa de biossegurança com medidas administrativas e técnicas de contenção. Estes laboratórios são classificados no nível de biossegurança II (para procedimentos que não geram aerossóis) e/ou nível de biossegurança III.

1.2 Epidemiologia e controle da tuberculose bovina

A bTB é considerada tão antiga quanto a maioria das civilizações, devido sua íntima relação com a domesticação dos bovinos (entre 8000-4000 A.C.). Apesar de ter origem na África, sua insurgência ocorreu provavelmente na região que atualmente corresponde a Europa, sendo posteriormente disseminada para as diferentes regiões do mundo durante o período colonial, favorecida pela migração intercontinental de bovinos infectados (Renwick, White *et al.*, 2007). Atualmente, a bTB é considerada uma importante zoonose negligenciada, visto que, a infecção pelo *M. bovis* é responsável por aproximadamente 10% do total de casos (30% dos casos da área rural) de tuberculose humana na África (Cosivi, O., Grange, J. M. *et al.*, 1998; Cleaveland, Shaw *et al.*, 2007) e cerca de 2,5% na América Latina (De Kantor, Ambroggi *et al.*, 2008). Além disso, é cada vez mais frequente a notificação de casos de infecções hospitalares causadas por cepas multiresistentes de *M. bovis* em pacientes imunossuprimidos (Cobo, Asensio *et al.*, 2001).

No contexto epizootico, a infecção por *M. bovis* e/ou bTB clínica tem sido reportada na maioria dos países com rebanhos bovinos comerciais (Oie, 2012a) (**Figura 1**). Na America Latina, a bTB é endêmica e cerca de 70% dos rebanhos bovinos estão localizados em áreas onde ocorre a circulação do agente (De Kantor, Ambroggi *et al.*, 2008). No Brasil, a doença clínica é notificada em todas as regiões, principalmente em rebanhos leiteiros (Almeida, 2009; Oie, 2011; 2012a), entretanto, os dados de prevalência da infecção são muito regionalizados e pouco sistematizados, o que dificulta sua interpretação e compromete a representatividade. Apesar dos primeiros relatos da bTB no território nacional serem da década de 40 na Região Sul, apenas em 2001, com o objetivo de normatizar o controle/erradicação da bTB nos rebanhos brasileiros, foi instituído o “Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose bovina e bubalina (PNCEBT)” (Brasil, 2001; Mapa/Sda, 2006), a fim de aumentar a competitividade da agropecuária brasileira no cenário do comércio internacional e minimizar o impacto desta zoonose na saúde pública (Almeida, 2009; Oie, 2011; 2012a).

Figura 1 - Distribuição mundial e formas clínica da tuberculose bovina nos rebanhos bovinos.



Fonte: World Animal Health Information Database (WAHID) (Oie, 2012a).

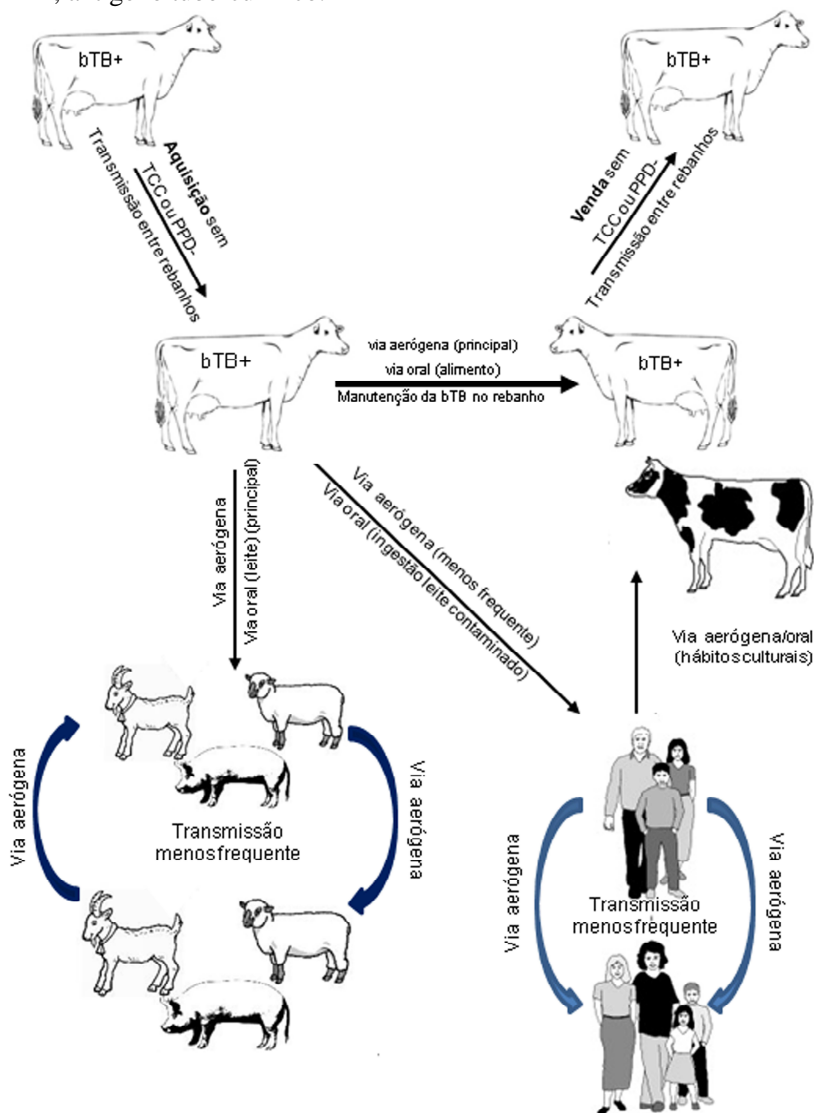
Embora os bovinos infectados sejam considerados o reservatório natural do *M. bovis* - (Cousins, 2001; Cousins e Florisson, 2005), o isolamento deste patógeno foi relatado em mais de 40 espécies de animais, o que pode acarretar graves consequências para o ecossistema (Michel, Coetzee *et al.*, 2009). Ao mesmo tempo esta condição pode representar uma importante barreira para as ações de controle e erradicação da bTB em muitas regiões (Alexander, Pleydell *et al.*, 2002) da América do Norte (O'Brien D, Schmitt *et al.*, 2006), Europa (Naranjo, Gortazar *et al.*, 2008), África (Michel, Bengis *et al.*, 2006) e Ásia (Coleman, Coleman *et al.*, 2006), onde a erradicação do *M. bovis*, têm sido considerada impossível, devido a presença de reservatórios silvestres, que mantém a infecção e transmitem para os rebanhos bovinos. Dessa forma, apesar dos esforços dos programas de vigilância, a bTB continua sendo um importante problema de saúde pública e animal, despertando um interesse renovado e necessário no desenvolvimento de estratégias imunoprolifáticas para o controle da doença, ademais, mecanismos básicos da imunidade antimicobacteriana e a dinâmica da infecção natural precisam ser melhor elucidados.

A infecção pelo *M. bovis* ocorre principalmente através da via aerógena pela inalação de aerossóis contaminados (perdigotos) (**Figura 2**). Esta condição é favorecida nos sistemas de produção intensiva e semi-intensiva, como é o caso das unidades de produção de leite, onde o íntimo contato e o tempo de vida dos bovinos favorecem a contínua exposição e transmissão entre os animais e rebanhos (Cousins, 2001; Ameni e Erkihun, 2007; Renwick, White *et al.*, 2007; Ameni, Vordermeier *et al.*, 2011). Adicionalmente, a ingestão de alimentos contaminados (ex. leite, água e forragens) também pode ser considerada uma importante fonte de infecção, sendo o consumo de leite/colostró de fêmeas infectadas, que apresentam mastite, a principal forma de infecção não respiratória entre os bovinos (Cosivi, Meslin *et al.*, 1995; O'Reilly e Daborn, 1995). A infecção oral também tem sido descrita como frequente nos sistemas extensivos de produção, onde a ingestão de alimentos contaminados, como pastagem, favorece esta via de transmissão (Ameni, Vordermeier *et al.*, 2011).

A transmissão zoonótica do *M. bovis* ocorre principalmente através do contato direto e íntimo com animais infectados (ex. tratadores e magarefes) ou indiretamente pela ingestão de alimentos contaminados (ex. leite e derivados lácteos não pasteurizados) (Wedlock, Skinner *et al.*, 2002; Thoen, Lobue *et al.*, 2006; De Kantor, Ambroggi *et al.*, 2008). Neste contexto, o hábito de fervura do leite antes do consumo e a

instalação de plantas industriais para pasteurização de leite em todo o mundo tornou menos representativa a infecção através do consumo de leite e/ou subprodutos lácteos contaminados (Cosivi, O., Grange, J. *et al.*, 1998; De Kantor, Ambroggi *et al.*, 2008). Práticas culturais que fomentam o contato promíscuo entre o homem e animais infectados também podem favorecer a transmissão zoonótica, assim como antroponozoonótica (Ameni, Vordermeier *et al.*, 2011).

Figura 2 - Diagrama esquemático do ciclo de transmissão do *M. bovis*. TCC, teste tuberculínico cervical comparativo. bTB, tuberculose bovina. PPD, antígeno tuberculínico.



Fonte: Adaptado de (O'reilly e Daborn, 1995)

Por ser uma doença crônica de caráter progressivo, lento e debilitante, a bTB raramente apresenta evolução clínica subaguda, e os animais podem permanecer assintomáticos por meses, anos, ou mesmo desenvolver uma infecção latente que pode perdurar por toda a vida (Spickler, 2009; Oie, 2011). Além disso, em países que possuem bem estabelecidos programas de vigilância e controle da bTB, a doença clínica é cada vez menos frequente, uma vez que os animais, tidos como positivos (reatores no teste cervical comparativo - TCC) são sumariamente retirados do rebanho, antes de apresentarem sinais da doença clínica. Não obstante, nas regiões/países em que a bTB clínica é notificada, como é o caso do Brasil (Almeida, 2009; Oie, 2011; 2012a), os animais apresentam com maior frequência um quadro clínico característico, que cursa com febre intermitente, tosse inicialmente seca que passa a produtiva, dispneia, perda da condição corporal, emagrecimento progressivo, debilidade, baixa capacidade respiratória e diminuição na produção de leite, que pode chegar a 25-30% durante a lactação (De Lisle, Buddle *et al.*, 2007; Buddle, B. M., Livingstone, P. G. *et al.*, 2009). A morte de animais, quando ocorre, frequentemente está associada a infecções secundárias. Nos casos em que a doença adquire um caráter progressivo, os sinais clínicos são mais graves e dependendo da localização das lesões o animal pode apresentar caquexia, hiporexia, hemoptise, dispneia, hiperplasia de linfonodos superficiais e/ou profundos e tosse produtiva. Apesar de pouco claro quais fatores da resposta imune antimicobacteriana são comprometidos, considera-se que esta forma da doença clínica está associada com a disseminação sistêmica da micobactéria para diferentes sítios anatômicos (Volkman, Clay *et al.*, 2004; Russell, 2007). Assim, com frequência, os animais podem apresentar um quadro de linfadenomegalia grave, com ou sem supuração, que pode levar a obstrução de vasos sanguíneos, vias aéreas ou mesmo do trato digestivo. Quando o sistema digestivo é primariamente afetado (linfonodos mesentéricos, intestino e/ou fígado), normalmente associado a via de infecção oral, os animais também podem apresentar diarreia intermitente e/ou constipação (Buddle, B., Livingstone, P. *et al.*, 2009; Spickler, 2009; Oie, 2011). Apesar da compreensão pormenorizada da condição clínica da doença, os padrões imunopatológicos associados à evolução da infecção, principalmente durante a infecção natural, não são claros.

Até o momento, não existe uma vacina eficaz ou tratamento viável para a bTB e a principal estratégia para controle/erradicação da doença adotada pelos organismos oficiais é o diagnóstico seguido de

abate sanitário compulsório dos animais positivos (Mapa/Sda, 2006; Evans, Smith *et al.*, 2007; Oie, 2011). Entretanto, a prova oficial utilizada para diagnóstico da infecção pelo *M. bovis* em bovinos é o teste tuberculínico intradérmico cervical comparativo (TCC), que mede uma resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) contra o antígeno (tuberculina) PPD –(*Purified Protein Derivative*) bovina (PPDb - *M. bovis*) e aviária (PPDa - *M. avium*) (Monaghan, Doherty *et al.*, 1994; Good e Duignan, 2011; Oie, 2011) apresentando índices de sensibilidade variáveis entre 52-100% (com um valor médio de 78%) e especificidade de 78-99%. Além disso, a responsividade dos animais ao TCC inicia-se entre 3-18 semanas após a infecção (Norby, Bartlett *et al.*, 2004; De La Rua-Domenech, Goodchild *et al.*, 2006; Claridge, Diggle *et al.*, 2012). Mais recentemente, tem sido testado em vários países um ensaio laboratorial que utiliza dois antígenos específicos do CMTB, ESAT-6 e CFP-10, para detecção e quantificação da expressão de interferon- γ (IFN- γ) em amostras de sangue total (Buddle, B., Livingstone, P. *et al.*, 2009). Contudo, os resultados para ambos os testes diagnósticos são dependentes de uma resposta imune celular antígeno-específica capaz de produzir níveis detectáveis de IFN- γ (Buddle, Wedlock *et al.*, 2005; De La Rua-Domenech, Goodchild *et al.*, 2006; Good e Duignan, 2011). Sendo assim, os padrões de eficácia dos testes são afetados por condições como anergia, imunossupressão, período de pré-sensibilização, uso de corticóides, estresse nutricional ou ambiental, erro associado ao método e coinfeções virais, bacterianas e parasitárias (De La Rua-Domenech, Goodchild *et al.*, 2006; Claridge, Diggle *et al.*, 2012), ressaltando assim a necessidade de desenvolver estratégias racionais de imunoprevenção e diagnóstico, baseados no entendimento dos elementos da imunopatogênese da infecção pelo *M. bovis*.

1.3 Patogênese e imunopatologia da tuberculose bovina

Especula-se que as características que orquestram a interação *M. bovis*-hospedeiro bovino estão associadas à complexidade da parede celular, composta por uma variedade de proteínas de superfície, carboidratos e principalmente, por uma quantidade abundante (40-60% da parede celular das CMTBs) de lipídeos (micosídeos ou ácidos micólicos) (**Figura 3A**). Estes componentes estruturais atuam como importantes fatores de virulência e desempenham funções defensivas ou adaptativas que favorecem a sobrevivência das micobactérias no

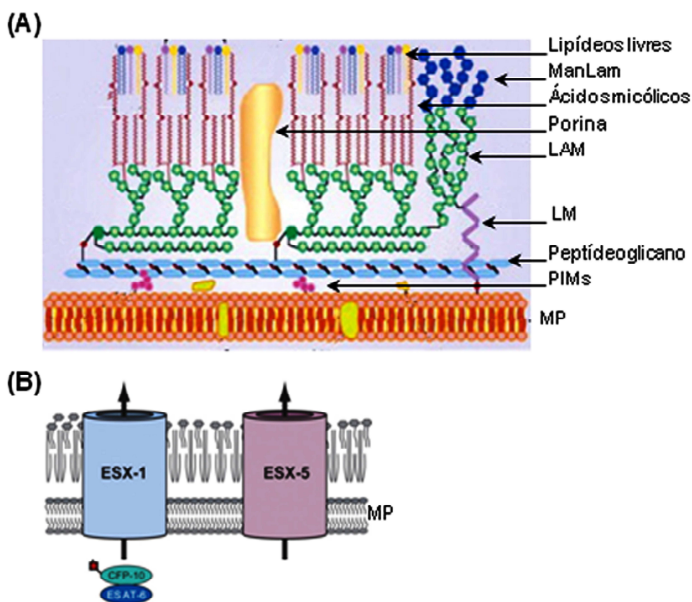
ambiente intracelular (Alderwick, Birch *et al.*, 2007; Guenin-Mace, Simeone *et al.*, 2009; Hotter e Collins, 2011). Além disso, os micossídeos estão associados às propriedades imunológicas, patofisiológicas e de resistência durante a interação da micobactéria com o hospedeiro (Brennan e Nikaido, 1995; Brennan, 2003; Alderwick, Birch *et al.*, 2007; Bhowruth, Alderwick *et al.*, 2008). Dentre os principais lipídeos com estrutura estabelecida e com participação durante o processo de interação patógeno-hospedeiro destacam-se:

✓ *Fator corda (Trehalose 6, 6-di-mycolate)*: estruturado pelo complexo ácido micólico-arabinogalactano-peptidoglicano (mAGP), é abundante na parede celular e está associado com a inibição da migração de polimorfonucleares e fusão fago-lisossomal, favorecendo a colonização micobacteriana e a manutenção da resposta granulomatosa. (Perez, Roman *et al.*, 2000; Indrigo, Hunter *et al.*, 2003; Hunter, Olsen *et al.*, 2006). A relação entre a expressão do fator corda e a disposição característica durante o crescimento, em cadeias semelhante a “cordas”, ainda não está comprovada (Hunter, Olsen *et al.*, 2006).

✓ *Lipoarabinomananos (Mannose-lipoarabinomananos - ManLAM; fosfatidilinositol manosídeo - PIMs; Lipomananos - LM)*: um dos componentes lipídicos mais abundantes da parede celular, modula a produção e secreção do TNF e IL-12, desempenhando propriedade anti-inflamatória e diminuindo ou inibindo a atividade fagocítica de macrófagos (Gilleron, Himoudi *et al.*, 1997; Gilleron, Nigou *et al.*, 1999; Nigou, Gilleron *et al.*, 1999).

✓ *Cera-D ou phthiocerol dimycocerosates (PDIMs)*: um dos principais fatores de patogênese das micobactérias e associado à formação e manutenção da reação granulomatosa ou granuloma (Camacho, Ensergueix *et al.*, 1999; Hotter, Wards *et al.*, 2005; Hotter e Collins, 2011).

Figura 3 - Representação esquemática das estruturas que compõem a parede celular micobacteriana. **(A)** Estrutura complexa integrada por proteínas de superfície, carboidratos e abundante quantidade de lipídeos. Logo acima da membrana há uma camada de peptídeoglicanos ligados a arabinogalactanos que por sua vez estão ligados aos ácidos micólicos. A camada superior é composta de lipídeos e ácidos graxos de cadeias curtas e longas. **(B)** Modelo geral de um sistema de secreção tipo VII (T7S) ou ESX. Sistema ESX-1 responsável pela secreção dos fatores protéicos ESAT-6 e CFP-10 (ESXB). ManLAM, Mannose-lipoarabinomananos; LAM, Lipoarabinomananos; LM, Lipomananos; PIMs, Fosfatidilinositol manosídeo; MP, Membrana plasmática.



Fonte: (A) Adaptado de (Medjahed, Gaillard *et al.*, 2010). (B) Adaptado de (Daleke, Ummels *et al.*, 2012).

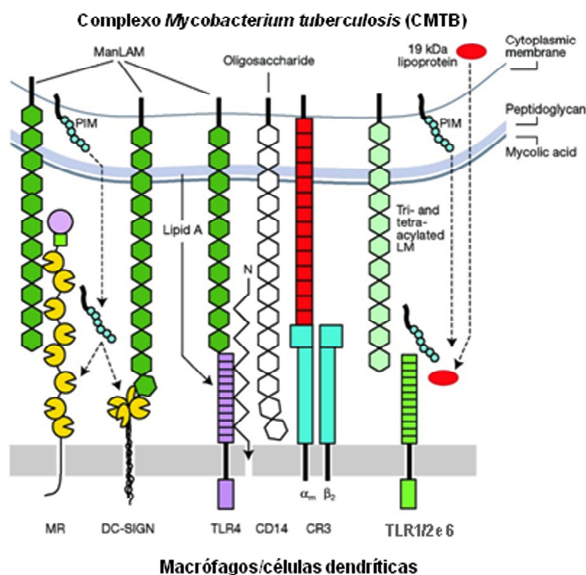
M. bovis, além do espectro de componentes estruturais que podem atuar como fatores de virulência, também secreta glicoproteínas e lipoproteínas, que podem modular processos celulares - e favorecer a sobrevivência e replicação micobacteriana no ambiente intracelular (Brennan e Nikaido, 1995; Finlay e Falkow, 1997; Abdallah, Gey Van Pittius *et al.*, 2007). Para apoiar este mecanismo, as CMTBs apresentam

cinco sistemas especializados de secreção do tipo VII (T7S) ou ESX (ESX1-ESX5) (**Figura 3B**), que permite o transporte de fatores para o meio extracelular (Abdallah, Gey Van Pittius *et al.*, 2007; Daleke, Ummels *et al.*, 2012). Dentre os fatores secretados, o ESAT-6 (EsxA) (Wards, De Lisle *et al.*, 2000; Pym, Brodin *et al.*, 2003) e CFP-10 (EsxB) (alvo antigênico imunodominante de células T) formam um complexo CFP-10/ESAT-6, com propriedade membranocitolíca, associado a evasão fagolisossomal e modulação da produção de TNF, favorecendo o estabelecimento da infecção (Berthet, Rasmussen *et al.*, 1998; Arend, Andersen *et al.*, 2000; Guo, Bao *et al.*, 2010)

Dados experimentais demonstram que *M. bovis* infecta primariamente macrófagos, no qual pode sobreviver, multiplicar e se disseminar para diferentes sítios anatômicos (Cosma, Humbert *et al.*, 2004; Volkman, Clay *et al.*, 2004). No ambiente intracelular, o bacilo pode ser eliminado pelo sistema fagolisossomal (**Figura 4**), ou mediar mecanismos de escape e resistência (Neill, Bryson *et al.*, 2001; Pollock, Rodgers *et al.*, 2006) estabelecendo uma infecção intracelular ativa (Gutierrez, Master *et al.*, 2004; De La Rua-Domenech, Goodchild *et al.*, 2006; Pollock, Rodgers *et al.*, 2006). Após esta fase inicial, outras células apresentadoras de antígenos (APCs), tais com células dendríticas (DCs) e macrófagos derivados de monócitos, também participam do processo de fagocitose (Welsh, Cunningham *et al.*, 2005; Cassidy, 2006). A interação do *M. bovis* com as APCs e a entrada do bacilo nas células fagocíticas pode ser influenciada por vários receptores de superfície (Pluddemann, Mukhopadhyay *et al.*, 2006; Endsley, Hogg *et al.*, 2007; Jo, 2008; Mortaz, Varahram *et al.*, 2012) como receptores de manose (MR), receptores de células dendríticas (DC-SIGN) e dectina-1 (D1) que possuem como agonistas componentes estruturais da parede micobacteriana (Pluddemann, Mukhopadhyay *et al.*, 2006; Rothfuchs, Bafica *et al.*, 2007; Jo, 2008; Mortaz, Varahram *et al.*, 2012). Além disso, as micobactérias também podem ser reconhecidas por outros receptores de superfície, como por exemplo, TLR1/TLR2/TLR4/TLR6/TLR9, proteínas conservadas da resposta imune inata, que sinalizam a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-6 e IL-12 (Bafica, Scanga *et al.*, 2005; Pluddemann, Mukhopadhyay *et al.*, 2006; Ryffel, Jacobs *et al.*, 2006; Ehlers e Ravetch, 2007; Jo, 2008). O repertório de citocinas/quimiocinas secretadas e a apresentação de antígenos micobacterianos via MHC-I/MHC-II/CD1(a-c) realizadas pelas APCs, possivelmente são o principal gatilho para a ativação da resposta imune adaptativa, que

envolve o recrutamento, estímulo e ativação de diferentes fenótipos de células T (CD4+; CD8αβ; γδT+) (Cassidy, Bryson *et al.*, 2001; Kennedy, Welsh *et al.*, 2003; Villarreal-Ramos, Mcaulay *et al.*, 2003; Wangoo, Johnson *et al.*, 2005; Endsley, Endsley *et al.*, 2006; Thacker, Palmer *et al.*, 2007; Vordermeier, Villarreal-Ramos *et al.*, 2009). Não obstante, a intensidade e manutenção da resposta imune celular orquestrada por células T antígeno-específicas produtoras de IFN-γ são fundamentais para determinar a capacidade do hospedeiro eliminar *M. bovis* dos tecidos ou permitir a evolução para um quadro de infecção latente e/ou doença ativa (Cooper, Dalton *et al.*, 1993; Boom, 1996; Flynn e Chan, 2001; Vordermeier, Chambers *et al.*, 2002; Welsh, Cunningham *et al.*, 2005).

Figura 4 - Representação esquemática das múltiplas interações entre ligantes das CMTBs e os receptores das APCs. MR (receptor de manose), DC-SIGN (receptor específico de DCs), CD14 e TLR4 (Toll-like receptor 4) reconhecem lipoarabinomananos (ManLAM), CR3 (receptor complementar 3) reconhece oligossacarídeos, MR e DC-SIGN, reconhecem Fosfatidilinositol manósídeos (PIMs), TLR4 reconhece moléculas de lípido A, TLR1/2/6 reconhece lipomananos (LM) e PIMs específicos.



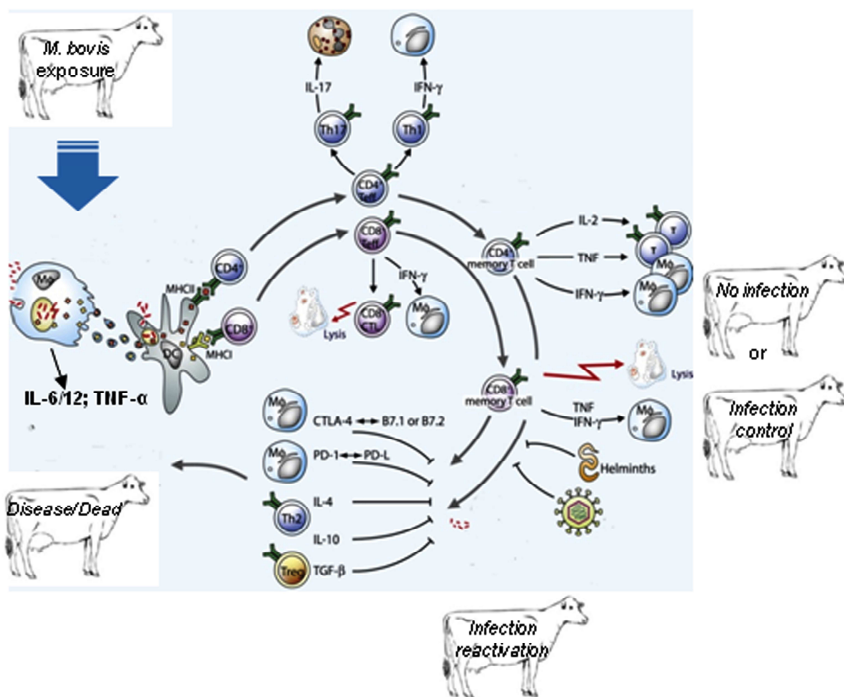
Fonte: Adaptado de (Pluddemann, Mukhopadhyay *et al.*, 2006).

Durante a infecção pelo *M. bovis*, com base na produção de mediadores e estímulos, o padrão de resposta favorece uma tendência entre duas subpopulações de células T helper (CD4), T helper tipo 1 (Th1) ou T helper tipo 2 (Th2) (**Figura 5**). As células Th1 são estimuladas principalmente pelas IL-12/IL-18 e produzem citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF) que estimulam a atividade dos macrófagos e favorecem a resposta imune celular (CMI), principal mecanismo da imunidade antimicobacteriana (Hope, Kwong *et al.*, 2000; Buddle, Ryan *et al.*, 2001; Vordermeier, Chambers *et al.*, 2002; Buddle, Wedlock *et al.*, 2005; Thacker, Palmer *et al.*, 2007; Waters, Whelan *et al.*, 2009; Waters, Palmer *et al.*, 2011). O padrão de resposta tipo Th2 caracteriza-se pela produção e secreção de mediadores anti-inflamatórios (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13), com atividade Th1-supressora e favorecimento da imunidade humoral (Kennedy, Welsh *et al.*, 2002; Waters, Whelan *et al.*, 2009; Waters, Palmer *et al.*, 2011). Sendo assim, é de comum acordo que o controle e/ou contenção da infecção parece estar intimamente associado ao balanço entre a resposta Th1 (principal fonte de IFN- γ) e Th2 (principal fonte de IL-4) (Endsley, Hogg *et al.*, 2007; Thacker, Palmer *et al.*, 2007; Waters, Whelan *et al.*, 2009), visto que: o IFN- γ potencializa a atividade dos macrófagos/DCs e induz a produção de fatores antimicobacterianos; regula a apresentação de antígenos via MHC-II; modula a resposta do tipo DTH e favorece a migração de monócitos e células dendríticas para a lesão granulomatosa (Hope, Kwong *et al.*, 2000; Buddle, Ryan *et al.*, 2001; Vordermeier, Chambers *et al.*, 2002; Buddle, Wedlock *et al.*, 2005; Thacker, Palmer *et al.*, 2007; Waters, Whelan *et al.*, 2009; Waters, Palmer *et al.*, 2011).

Não há dados robustos a cerca da resposta imunológica em bovinos durante a infecção natural. Entretanto, a infecção experimental destes animais com *M. bovis* demonstrou que a produção de mediadores pró-inflamatórios também é realizada por outras subpopulações de células T como CD8 $\alpha\beta$, Th17 e T $\gamma\delta$. Estas células secretam citocinas e quimiocinas (ex. IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF, IL-17) apresentando papel ativo na manutenção da resposta tipo Th1 (Cassidy, Bryson *et al.*, 2001; Kennedy, Welsh *et al.*, 2003; Villarreal-Ramos, Mcaulay *et al.*, 2003; Wangoo, Johnson *et al.*, 2005; Endsley, Endsley *et al.*, 2006; Thacker, Palmer *et al.*, 2007; Vordermeier, Villarreal-Ramos *et al.*, 2009). Além disso, a grande proporção de células T $\gamma\delta$ intragranuloma e circulantes em bovinos infectados sugere que esta população celular possa desempenhar um papel de ligação entre resposta inata e adaptativa, dada a sua capacidade secretória de mediadores com IFN- γ , IL-12, e TGF- β

(Cassidy, Bryson *et al.*, 2001; Pollock e Welsh, 2002; Wangoo, Johnson *et al.*, 2005; Palmer, Waters *et al.*, 2007).

Figura 5 - Diagrama esquemático proposto para a resposta imune celular do hospedeiro à bTB. Após a infecção do hospedeiro, durante a interação *M. bovis* com a APCs (macrófagos e DCs) mediadores (IL-6, IL-12, TNF- α) são liberados. Esta sinalização através de citocinas ativa células T efetoras do sistema imune adaptativo e conseqüentemente elicita a CMI (células CD4, CD8, T $\gamma\delta$; Th17). As APCs também estimulam células T CD4+ e T CD8+ específicas. As células T CD4+ irão gerar uma resposta efetora do tipo Th1 e Th17, com liberação de mediadores pró-inflamatórios (IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF). As células T CD8+ e T $\gamma\delta$ irão gerar uma resposta citotóxica e também induzir produção de IFN- γ . Concomitantemente, ocorre o desenvolvimento de uma resposta através de células T de memória. A resposta protetora por células T CD4+ de memória se dá através da produção de diversas citocinas, como IL-2, TNF e IFN- γ , enquanto a resposta protetora por células T CD8+ de memória é devido à produção de moléculas citotóxicas, IFN- γ e TNF. Com o estabelecimento da CMI efetora ocorre o controle da infecção e os animais podem eliminar o bacilo ou manter a infecção latente. Agentes com atividade imunomodulatória (coinfecções bacterianas, virais, parasitárias) podem induzir uma resposta Th2 ou anti-inflamatória (IL-4, IL-10 e TGF- β) ou afetar os mecanismos de defesa e a infecção pode reativar causando a doença e/ou morte do animal.

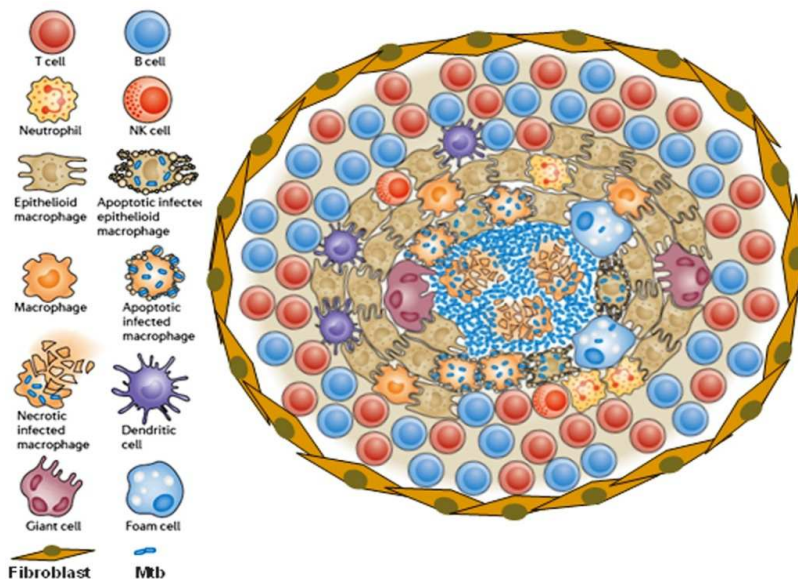


Fonte: Adaptado de (Kaufmann, 2010).

As APCs infectadas no local da infecção, ou ao migrarem para outros órgãos/tecidos, fazem apresentação antigênica e secretam mediadores para o recrutamento de células inflamatórias susceptíveis (Cassidy, 2006; Philips e Ernst, 2011; Walzl, Ronacher *et al.*, 2011; Waters, Palmer *et al.*, 2011). À medida que as células infectadas entram em processo de morte (necrose/autofagia), bacilos são liberados para o espaço extracelular e fagocitados (Endsley, Endsley *et al.*, 2006; Walzl, Ronacher *et al.*, 2011). Esta fase pode representar a expressão focal e o primeiro estágio da reação inflamatória granulomatosa tuberculosa (Seiler, Aichele *et al.*, 2003; Palmer, Waters *et al.*, 2007; Philips e Ernst, 2011; Walzl, Ronacher *et al.*, 2011). O risco de transmissão, bem como a sobrevivência do hospedeiro, está diretamente associado à capacidade deste responder a infecção através da formação de estruturas organizadas chamadas granulomas, capazes de conter a infecção e limitar o dano tecidual (Flynn e Chan, 2001; Cosma, Humbert *et al.*,

2004; Volkman, Clay *et al.*, 2004; Ulrichs e Kaufmann, 2006). O granuloma tuberculoso, estágio mais avançado e evoluído da resposta granulomatosa, é uma estrutura complexa formada em resposta ao estímulo micobacteriano persistente, que envolve o recrutamento de células inflamatórias, representadas principalmente pela população de macrófagos ativados (células epitelióides, células gigantes multinucleadas, macrófagos espumosos), DCs, linfócitos T e B e neutrófilos (Wangoo, Johnson *et al.*, 2005; Ulrichs e Kaufmann, 2006; Palmer, Waters *et al.*, 2007; Russell, 2007; Ramakrishnan, 2012) (**Figura 6**).

Figura 6 - Modelo conceitual da estrutura do granuloma tuberculoso. Representação esquemática das diferentes populações celulares e estruturas da lesão granulomatosa. Mtb: micobactérias tuberculosas



Fonte: Adaptado de (Ramakrishnan, 2012).

O equilíbrio entre a carga infecciosa e a imunopatologia pode representar o maior desafio biológico para a resposta imune do hospedeiro bovino, visto que determina a dinâmica da doença e relaciona-se com a suscetibilidade a bTB (Vordermeier, Chambers *et al.*, 2002; Wangoo, Johnson *et al.*, 2005; Welsh, Cunningham *et al.*,

2005; Thacker, Palmer *et al.*, 2007; Vordermeier, Villarreal-Ramos *et al.*, 2009). Neste contexto, vários trabalhos sugerem que o encapsulamento, processo envolvendo a produção e deposição de tecido conjuntivo que delimita o granuloma, apresenta papel importante no controle do crescimento e disseminação micobacteriana nos tecidos (Cosma, Humbert *et al.*, 2004; Volkman, Clay *et al.*, 2004; Gil, Diaz *et al.*, 2010).

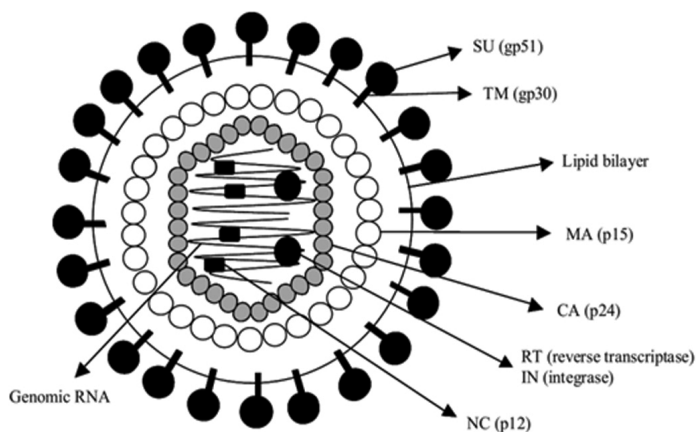
A infecção experimental pelo *M. bovis* possibilitou o estudo detalhado da diversidade da resposta imune do hospedeiro e ao mesmo tempo tem sido uma ferramenta útil para avaliar a eficiência de novos candidatos a antígenos vacinais, bem como para identificar diferentes estágios de evolução da doença (Pollock e Neill, 2002; Vordermeier, Chambers *et al.*, 2002; Welsh, Cunningham *et al.*, 2005; Thacker, Palmer *et al.*, 2007). Além disso, a resposta granulomatosa tuberculosa, composta por células epitelióides, células gigantes multinucleadas, linfócitos e neutrófilos, observada durante a infecção experimental pelo *M. bovis* (Wangoo, Johnson *et al.*, 2005; Palmer, Waters *et al.*, 2007) sugere que essas populações celulares possam desempenhar papel importante no controle da bTB. Embora a variabilidade genética e fatores associados à idade e condições de criação dos animais possam estar potencialmente envolvidos na suscetibilidade à infecção pelo *M. bovis* (Phillips, Foster *et al.*, 2002; Thoen, Lobue *et al.*, 2006; Ameni, Aseffa, Engers *et al.*, 2007; Liebana, Johnson *et al.*, 2008; Brotherstone, White *et al.*, 2009; Driscoll, Hoffman *et al.*, 2011; Finlay, Berry *et al.*, 2012), aspectos fundamentais da resposta do hospedeiro contra a infecção natural pelo *M. bovis* e os fatores que influenciam a resposta granulomatosa durante a infecção natural são pouco compreendidos.

1.4 Papel das coinfeções na suscetibilidade de bovinos ao *M. bovis*

Vários agentes infecciosos podem prejudicar a resposta imune do hospedeiro e aumentar a suscetibilidade a outras infecções ou afetar a eficácia dos ensaios de imunodiagnóstico. A influência das coinfeções por agentes bacterianos (Hope, Thom *et al.*, 2005), virais (Charleston, Hope *et al.*, 2001) e parasitários (Karlson, 1962 ; Hughes, Ball *et al.*, 2005; Flynn, Mannion *et al.*, 2007; Claridge, Diggle *et al.*, 2012) na resposta imune contra *M. bovis*, apesar de ser considerada, ainda é pouco compreendida (Karlson, 1962 ; Charleston, Hope *et al.*, 2001; Hughes, Ball *et al.*, 2005; Claridge, Diggle *et al.*, 2012). Neste contexto,

o vírus da leucose enzoótica bovina (BLV) (**Figura 7**) (Família: *Retroviridae*; Subfamília: *Orthoretrovirinae*, gênero: *Deltaretrovirus*), um oncovírus geneticamente e estruturalmente similar ao vírus linfotrópico símio de células T (STLV-1, STLV-2 e STLV-3) e ao vírus linfotrópico humano de células T (HTLV-1, HTLV-2) (Sagata, Yasunaga *et al.*, 1985; Burny, Cleuter *et al.*, 1988; Franchini, 1995), causa uma doença linfoproliferativa denominada leucose enzoótica bovina, que afeta diretamente a produção dos rebanhos bovinos (Burny, Cleuter *et al.*, 1988; Schwartz e Levy, 1994) e aumenta a suscetibilidade dos animais a enterites, mastites, pneumonias e dermatites (Emanuelson, Scherling *et al.*, 1992; Oie, 2012b). Entretanto, a imunopatogênese e a influência do BLV durante a infecção concomitante com *M. bovis* não foram estudados.

Figura 7 - Representação esquemática da partícula viral do BLV. Duas cópias do RNA genômico fita simples envoltas por uma partícula viral. As proteínas CA (p24) formam o capsídeo, que contém o RNA viral. Duas proteínas enzimáticas (RT e IN) requeridas para a transcrição reversa e integração do genoma viral de forma randômica no DNA cromossômico das células B. A proteína da matriz MA (p15) interliga o capsídeo e o envelope formado por uma dupla camada de lipídios de origem celular, em que um complexo de proteínas virais (gp51 SU e gp30 TM) estão inseridas.



Fonte: Adaptado de (Gillet, Florins *et al.*, 2007).

A leucose enzoótica bovina é uma doença altamente contagiosa que afeta a maioria dos rebanhos bovinos mundiais e compromete o comércio internacional de bovinos (Oie, 2012b). A prevalência da doença entre vacas leiteiras adultas em países da América e da Europa pode variar de 23 a 65% (Sargeant, Kelton *et al.*, 1997; Trono, Perez-Filgueira *et al.*, 2001; Ott, Johnson *et al.*, 2003; Vanleeuwen, Tiwari *et al.*, 2006). No Brasil, a infecção pelo BLV é mais frequente em rebanhos leiteiros, nos quais a prevalência varia de 27-56%, dependendo da região (Castro, Leite *et al.*, 1992; Del Fava, 2004). O BLV pode ser transmitido entre os animais de forma vertical e/ou horizontal (por exemplo, contato com secreções, vetores flebotomíneos e transmissão iatrogênica) (Ghysdael, Bruck *et al.*, 1984; Schwartz e Levy, 1994; Oie, 2012b). Apesar dos bovinos domésticos (*Bos taurus* e *Bos indicus*) serem o hospedeiro natural, a infecção pelo BLV também pode ocorrer em búfalos e capivaras (Burny, Bruck *et al.*, 1985; Schwartz e Levy, 1994; Oie, 2012b). Além disso, a infecção experimental já foi demonstrada em caprinos, ovinos, veados, gatos, cães, macacos rhesus, chimpanzés, ratos, suínos e coelhos (Schwartz e Levy, 1994; Gillet, Florins *et al.*, 2007; Oie, 2012b). Adicionalmente, as evidências de que o BLV pode infectar, replicar e induzir processos tumorais em humanos não foram formalmente excluídas (Calattini, Sereti *et al.*, ; Lee, Kim *et al.*, 2005; Burmeister, Schwartz *et al.*, 2007).

Não existem vacinas ou tratamentos contra BLV. As estratégias efetivas de controle da infecção, semelhante as adotadas para a bTB, são baseadas no diagnóstico, seguido do abate dos animais positivos (Rodriguez, Florins *et al.*, ; Oie, 2012b). Em alguns casos, apesar de pouco efetivas, medidas para minimizar a transmissão do BLV, como mapeamento dos animais infectados e a segregação do rebanho também tem sido adotadas (Rodriguez, Florins *et al.*). O diagnóstico da infecção pelo BLV é realizado através da imunodifusão em gel de ágar (IDGA), que detecta anticorpos contra a proteína p24/gp51 do envelope viral. Entretanto, o teste possui baixa sensibilidade, principalmente nas fases iniciais da infecção (8-16 semanas) (Roberts, Lucas *et al.*, 1988; Roberts, Lucas *et al.*, 1989; Eaves, Molloy *et al.*, 1994). A eficácia do diagnóstico também pode ser comprometida durante a coinfeção pelo vírus da diarréia bovina (BVD) (Roberts, Lucas *et al.*, 1988), por formas virais atípicas ou infecções crônicas em que ocorre pouca ou ausente produção de anticorpos anti-BLV (Fechner, Blankenstein *et al.*, 1997). Em conjunto, os dados da literatura indicam que a infecção pelo BLV é altamente disseminada nos rebanhos bovinos e, pela baixa eficiência do

diagnóstico e ausência de vacinas ou tratamentos, trata-se de uma doença de difícil controle com mínimas ou nulas perspectivas de erradicação na maioria dos países com rebanhos comerciais de bovinos.

O BLV infecta primariamente células B maduras (CD5-(B1a)/CD5+ (B1b), sIgM+, MHCII+, CD11b+, IL-2R ou CD25+) (Letesson, Van Den Broecke *et al.*, 1991; Stone, Hof *et al.*, 1995; Chevallier, Berthelemy *et al.*, 1998), integrando-se de forma randômica no DNA da célula (Murakami, Yamada *et al.*, ; Yildiz, Babalola *et al.*, ; Kettmann, Meunier-Rotival *et al.*, 1979). Embora esteja associada com uma infecção persistente, a maioria dos bovinos permanecem assintomáticos ou aleucêmicos (Burny, Cleuter *et al.*, 1988), enquanto cerca de 30-50% dos animais desenvolvem um quadro de linfocitose persistente (LP) com expansão policlonal de células B (Mirsky, Olmstead *et al.*, 1996). Após um período longo de latência, que pode variar de 1-8 anos, precedido ou não pela LP, 1-5% dos bovinos infectados desenvolvem linfossarcomas (LS) poli ou monoclonais de células B (Schwartz e Levy, 1994; Franchini, 1995; Chevallier, Berthelemy *et al.*, 1998; Gillet, Florins *et al.*, 2007). Apesar da compreensão das etapas associadas à evolução clínica da doença, os mecanismos envolvidos e as implicações decorrentes da transformação celular na interação BLV-hospedeiro permanecem desconhecidos.

A ativação e proliferação dos linfócitos B durante o estado leucêmico (LP) e transformação linfoproliferativa (LS) parece ser mediado por um complexo de oncoproteínas do BVL, entretanto, os mecanismos associados à transformação celular são desconhecidos até o momento (Arainga, Takeda *et al.*, ; Gillet, Florins *et al.*, 2007). Estudos em células de ovinos *in vitro* demonstraram que dentre as proteínas onco-retrovirais, a BLV-Tax, um ativador transcricional da expressão viral, tem papel importante na indução da proliferação das células B, uma vez que é associada ao aumento de Bcl-2 (proteína antiapoptótica) e acúmulo intranuclear de fatores ativadores da via NF- κ B (p50/p50; RelB/p50) (Arainga, Takeda *et al.*, ; Szynal, Cleuter *et al.*, 2003). Apesar do(s) mecanismo(s) serem pouco entendidos, de alguma forma os LT (CD4+) contribuem para indução e/ou manutenção da LP, uma vez que a citocina pró-inflamatória IL-2 secretada pelos LT (CD4+) aumenta a ativação (aumento de IL-2R) e proliferação dos LB *in vitro*, e está associada a um aumento na expressão viral em animais com LP (Tawfeeq, Tagawa *et al.*, ; Stone, Hof *et al.*, 1995; Trueblood, Brown *et al.*, 1998). Ademais, a infecção pelo BLV induz uma resposta humoral formada por anticorpos citolíticos e vírus-neutralizantes anti-proteínas

estruturais (gp51 – envelope; p24 – capsídeo) e regulatórias (BLV-Tax e BLV-Rex) que pode ser detectada 1-8 semanas após a infecção (Naif, Daniel *et al.*, 1992; Franchini, 1995; Nagy, Tyler *et al.*, 2002).

A resposta imune celular anti-BLV em bovinos envolve a ativação e ação de linfócitos T-auxiliares (Th/CD4+), linfócitos T-citotóxicos (CD8+) e linfócitos $T_{\gamma\delta}$, (Stott, Thurmond *et al.*, 1991; Trueblood, Brown *et al.*, 1998; Kabeya, Ohashi *et al.*, 2001; Szynal, Cleuter *et al.*, 2003), entretanto, durante a LP estas subpopulações celulares podem ter suas funções comprometidas (Kabeya, Ohashi *et al.*, 2001; Szynal, Cleuter *et al.*, 2003; Usui, Konnai *et al.*, 2007). Nos animais com LP a excessiva proliferação e proporção de LB no sangue periférico é associada a uma redução da resposta de proliferação celular, sugerindo a existência de um mecanismo de *feedback* envolvido no controle homeostático das populações de linfócitos B e T (Trueblood, Brown *et al.*, 1998; Amills, Norimine *et al.*, 2004). Neste trabalho, realizamos um estudo pioneiro da interação entre BLV e *M. bovis* durante a infecção natural concomitante, fornecendo evidências de que o impacto da coinfeção pelo BLV no sistema imune do hospedeiro está associado a uma doença mais grave, maior suscetibilidade dos bovinos à bTB e ao mesmo tempo, pode reduzir a eficácia do TCC, teste oficial utilizado no diagnóstico da bTB. Estes dados revelam uma condição com graves implicações para os programas de controle/erradicação da bTB, uma vez que poderia explicar em parte a continuidade da transmissão da infecção entre rebanhos, assim como as falhas associadas as estratégias de erradicação da bTB em muitas regiões/países.

Em conjunto, os achados da literatura aqui apresentados, indicam que a bTB representa um grande desafio para a saúde pública e para a economia agropecuária mundial, ressaltando a necessidade urgente de desenvolver novos modelos vacinais, métodos diagnósticos eficientes, além de estratégias racionais de vigilância e controle. Desta forma, aspectos fundamentais da interação *M. bovis*-hospedeiro bovino, especialmente durante a infecção natural, requerem investigação científica. Neste sentido, elementos inerentes à dinâmica da infecção e mecanismos da imunopatogênese da bTB precisam ser estudados. Por esta razão, **a hipótese deste estudo é a de que os padrões da resposta granulomatosa tuberculosa, durante a infecção natural de bovinos pelo *M. bovis*, estão associados com o controle do crescimento do *M. bovis* nos tecidos e assim poderia servir como marcador da atividade e gravidade da doença.** A fim de testar esta hipótese os seguintes objetivos foram definidos.

OBJETIVO GERAL

Avaliar parâmetros imunopatológicos e fisiopatológicos da interação *Mycobacterium bovis*-hospedeiro durante infecção natural de bovinos.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Avaliar os padrões clínico-patológicos da infecção natural por *M. bovis*;
- II. Caracterizar elementos basilares da resposta imunopatológica e fisiopatológica de bovinos frente à infecção natural pelo *M. bovis*;
- III. Estabelecer critérios anatomopatológicos relacionados a gravidade e evolução da doença;
- IV. Identificar correlatos da resposta imune do hospedeiro associados ao controle da infecção pelo *M. bovis*;
- V. Avaliar a dinâmica das coinfeções na imunobiologia da interação patógeno-hospedeiro durante a infecção por *M. bovis*;
- VI. Investigar mecanismos da imunopatogênese da infecção persistente pelo BLV.

MATERIAIS E MÉTODOS

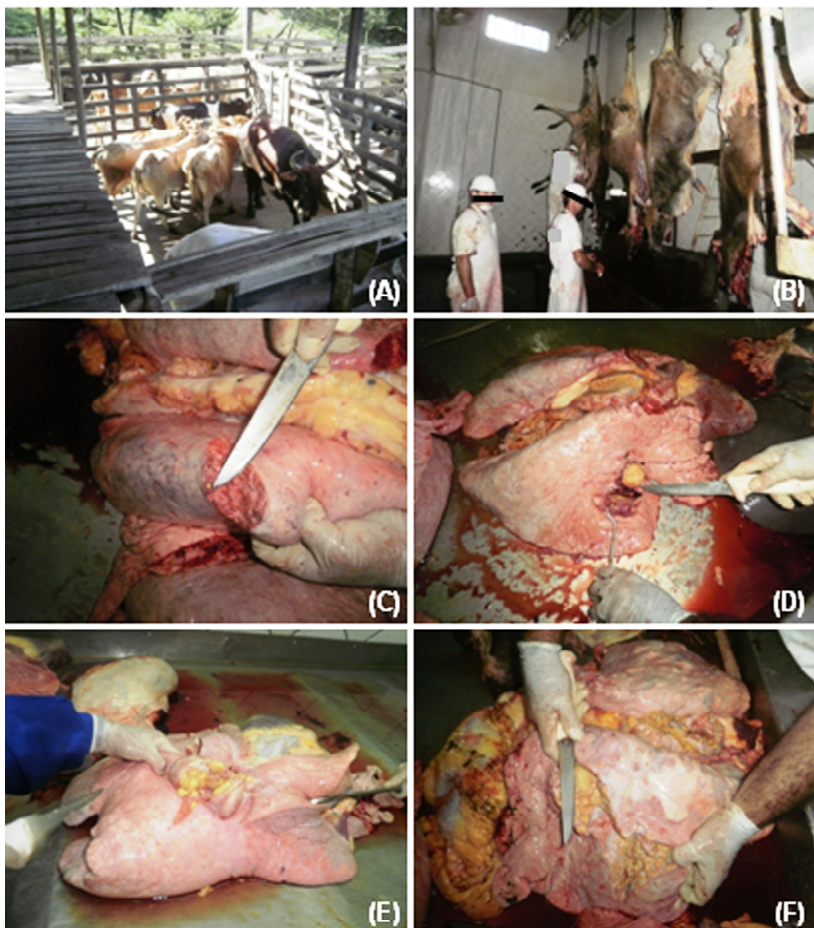
3.1 Populações de estudo e exame pré-abate

Todos os procedimentos com animais estão em acordo e aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal CETEA/UEDESC processo número 1.13.10. A população de estudo foi composta por 349 bovinos, com aproximadamente 1,5-11 anos de idade. Os animais amostrados foram procedentes de 26 focos de tuberculose bovina em 23 unidades de produção com sistema intensivo de produção de leite, localizadas em diferentes regiões do estado de Santa Catarina, avaliados entre o período de 2009 á 2011. Todos os animais foram positivos no teste de tuberculina cervical comparativo (TCC). Destes, 303 foram positivos para *M. bovis* (grupo de animais *M. bovis*-positivos), seja na cultura, PCR ou exame direto do granuloma, utilizando a coloração pelo método de Ziehl-Neelsen (ZN), para detecção de bacilos álcool-ácido resistente (BAAR). Os bovinos naturalmente infectados pelo *M. bovis* (grupo de animais, *M. bovis*-positivos) foram submetidos ao exame sorológico para vírus da leucose enzoótica bovina (LBV), vírus da diarreia viral bovina (BVD), vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), *Neospora caninum* e *Leptospira* spp.

O TCC, teste oficial para o diagnóstico da bTB, foi realizado com base nos procedimentos do regulamento técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) (Brasil, 2001; 2004). Resumidamente, dois pontos no terço médio cervical, a aproximadamente 20 cm da cernelha, distanciados entre si 15-20 cm, foram tricotomizados e a prega da pele medida com cutímetro calibrado. Em ambos os pontos foi inoculado 0,1 mL de tuberculina bovina (PPDb) e 0,1 mL tuberculina aviária (PPDa). A leitura e interpretação dos resultados foram realizadas 72 ± 6 horas após a inoculação, quando a espessura da prega da pele nos locais de aplicação das tuberculinas foi medida. Foi considerado positivo o animal que apresentou uma diferença entre a reação para PPDb e PPDa no TCC $\geq 4,0$ cm (Brasil, 2004; Oie, 2011). O PPDb utilizado foi produzido a partir da amostra AN5 de *M. bovis* e usado na concentração de 1,0mg de proteína/mL (32.500 UI), já o PPDa foi produzido a partir da amostra D4 de *M. avium* e utilizado na concentração de 0,5mg de proteína/mL (25.000 UI)(Brasil, 2004; Oie, 2011). Com base no regulamento técnico do PNCEBT todos os animais PPDb positivos devem ser abatidos em um prazo máximo de 30 dias (Brasil, 2004; Oie, 2011).

Na fase pré-abate, durante o exame clínico, os animais foram classificados em três estágios clínicos: **assintomáticos (AS)**, ausência de sinais clínicos; **sinais moderados (MS)**, perda de peso, hiporexia e tosse intermitente; **sinais graves (SS)**, animais apresentando perda de peso, fraqueza, hiporexia, hemoptise, dispneia, tosse progressiva e mastite tuberculosa (**Figura 8 A**). Em seguida os animais foram abatidos de acordo com as leis e regulamentos brasileiros (Mapa/Sda, 2006) e submetidos a um minucioso e sistemático exame *post mortem* (**Figura 8 B**).

Figura 8 - Exame clínico e exame anatomopatológica de bovinos naturalmente infectados pelo *M. bovis*. (A) exame clínico dos aninais PPD-positivos. (B) Abate sanitário sob acompanhamento de Médico Veterinário oficial. (C-F) Análise da gravidade de lesões pulmonares utilizando escore semiquantitativo (I-V) conforme (Vordermeier, Chambers *et al.*, 2002), considerando tamanho e coalescência das lesões. (C) Escore II, lesões únicas até 10 mm. (D) Escore III, lesões únicas maiores que 10 mm. (E) mais que uma lesão maior que 10 mm. (F) Lesões coalescentes.



Fonte: o autor.

3.2 Exame post mortem

Os órgãos/tecidos (pulmão, pleura, pericárdio, fígado, baço, intestino delgado/grosso, mesentério, rim, coração, grandes músculos, sistema geniturinário, úbere, linfonodos parotídeos, retrofaringeais, mandibulares, tonsilas palatinas traqueobronquiais, bronquiais, mediastinais, hepático, mesentéricos, ilíacos, isquiáticos) foram examinados quanto a presença de lesões visíveis sugestivas de bTB através de secções transversais, com intervalos de 0,5 cm a 1 cm (**Figura 8 C-F**). Amostras dos diferentes tecidos, com e sem lesão de bTB, foram colhidas para cultura de *M. bovis*, detecção de *M. bovis* pela PCR, bem como para análise histopatológico e pesquisa de BAAR.

Para estudar o padrão da disseminação anatômica das lesões de bTB nos diferentes órgãos/ tecidos e sua correlação com a gravidade da doença, com base na localização anatômica das lesões sistematizamos a seguinte classificação:

Nível I = presença de lesões de bTB em linfonodos da cabeça, incluindo retrofaríngeos esquerdo, direito, medial e lateral, mandibulares esquerdos e direito e parotídeos esquerdo e direito;

Nível II = presença de lesões de bTB nos linfonodos torácicos, incluindo mediastinais cranial e caudal, traqueobrônquicos cranial, esquerdo e direito ou lesões em linfonodos abdominais, incluindo mesentéricos, inguinais profundos e superficial, hepático, gástrico, esplênico, subilíacos, renal e ilíacos medial e lateral;

Nível III = presença simultânea de lesões de bTB nos linfonodos torácicos e abdominais, incluindo os linfonodos já anteriormente mencionados;

Nível IV = presença de lesões de bTB em órgãos da cavidade torácica (coração, pulmões) ou abdominais (fígado, baço, rins, intestino e trato reprodutivo), com ou sem envolvimento dos linfonodos drenantes;

Nível V = presença simultânea de lesões de bTB em órgãos das cavidades torácica e abdominal, com ou sem a presença de lesões nos linfonodos de drenagem associados com o órgão afetado.

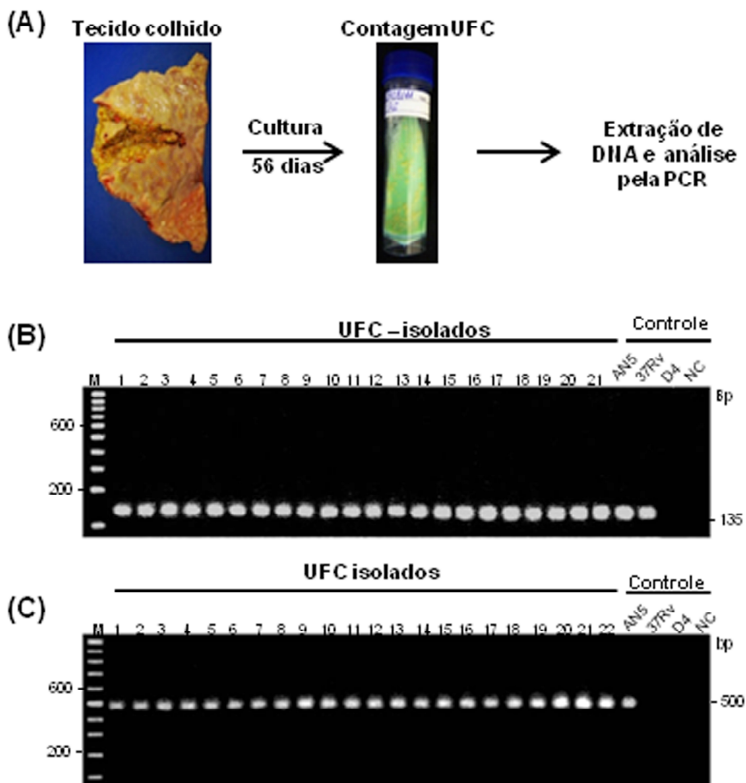
A gravidade anatomopatológica das lesões de bTB, nos diferentes órgãos/tecidos e linfonodos, foi classificada aplicando o escore semi-quantitativo, previamente descrito por (Vordermeier, Chambers *et al.*, 2002). Resumidamente, cada lóbulo do pulmão (**Figura 8 E-F**), incluindo caudal esquerdo, cranial esquerdo, cranial direito, caudal direito, médio e acessório foram seccionados em intervalos de 0,5 a 1,0 cm sendo as lesões classificadas de zero a cinco, com base no número e

extensão destas, sendo valor zero, no caso de ausência de lesões visíveis e cinco para lesões anatomopatológicas coalescentes. O valor final representa o índice médio das lesões nos diferentes lobos pulmonares. O mesmo escore foi aplicado para as lesões observadas nos principais órgãos/tecidos, incluindo a pleura, pericárdio, fígado, baço, intestino, mesentério e sistema reprodutivo. No caso dos linfonodos, incluindo mandibulares, parotídeos, retrofaríngeos medial, tonsilas palatinas, linfonodos brônquicos, mediastinais e traqueobrônquicos, hepático, mesentérico, ilíacos, isquiáticos, pré-escapulares e pré-crurais, estes foram seccionados transversalmente em intervalos 0,5-1,0 cm e a gravidade das lesões estimada considerando um escore de zero a três, sendo zero no caso de ausência de lesões sugestivas de bTB visíveis e três para lesões coalescentes.

3.3 Cultura bacteriológica e identificação dos isolados de *M. bovis* obtidos de amostras clínicas de animais naturalmente infectados

Amostras de tecido lesionado (granuloma) foram homogeneizadas utilizando sistema específico para homogeneização de tecido animal (Tissue ruptor®). Um mililitro do tecido homogeneizado sem adição de tampão foi descontaminado e concentrado utilizando o Método de Petroff modificado (Oie, 2011). Para a realização da cultura, 100 µL de homogenato de tecido, previamente descontaminado, foram inoculados em meio Ogawa-Kudoh (OK) suplementado com piruvato de sódio (12mg/mL). As amostras foram incubadas a 37°C em aerobiose e acompanhadas semanalmente quanto a presença de contaminantes e/ou positividade para colônias sugestivas de micobactérias. A contagem de unidades formadoras de colônias (UFC.mL⁻¹ homogenato de tecido) foi realizada após oito semanas de cultivo. Foram utilizadas como controle positivo para *M. bovis* a cepa de referência AN5 e D4 para *M. avium*, gentilmente doadas pelo MAPA/Lanagro-MG. As amostras positivas na cultura e BAAR-positivas foram submetidas à identificação pela PCR. Para tal o DNA extraído e purificado a partir de colônias de micobactérias (Wards, Collins *et al.*, 1995), foi utilizado como molde para amplificação pela PCR dos genes IS1081 (Aproximadamente 135 pb) (**Figura 1B**), conforme descrito por (Taylor, Worth *et al.*, 2007) e RvD1Rv2031c (aproximadamente 500 pb) (Rodriguez, Fissanoti *et al.*, 1999), que amplifica uma região polimórfica de 2900 pb no genoma do *M. bovis* não homóloga no genoma de *M. tuberculosis* e *M. avium*. (**Figura 9**).

Figura 9 - Análise bacteriológica e identificação dos isolados de *M. bovis*. (A) homogenato de tecido obtido a partir dos animais PPD-positivos foi inoculado em meio Ogawa-Kudoh (OK) suplementado com piruvato de sódio (12mg/mL) e incubado a 37 °C durante oito semanas. Em seguida, as colônias foram contadas e submetidas à extração de DNA. O DNA purificado obtido a partir de (A) foi utilizado como molde para a amplificação por PCR das sequências dos genes (B) IS1081 (aproximadamente 135 pb) ou (C) RvD1Rv2031c (aproximadamente 500 pb). Os produtos de amplificação das amostras representativas são mostrados, onde M: marcador de peso molecular de 100 pb; colunas 1-22 produtos de amplificação por PCR de isolados de *M. bovis*. AN5, controle positivo *M. bovis*. 37Rv, controle positivo *M. tuberculosis* (H37Rv). D4 – controle positivo *M. avium*; NC, controle negativo.



Fonte: o autor.

3.4 Análise histopatológica e histomorfológica das lesões granulomatosas tuberculosas dos animais naturalmente infectados pelo *M. bovis*

As amostras de tecido destinadas ao exame histopatológico foram fixadas em solução de formalina 10% tamponada em PBS (pH 7,2-7,4) e desidratadas em concentrações crescentes de etanol. Após a desidratação as amostras foram embebidas em parafina, seccionados (4µm) em micrótomo semi-automático, coradas pelo método de hematoxilina e eosina (H&E) e Tricrômico de Masson para coloração de fibras de colágeno (fibrose) e estudo histopatológico/histomorfológico e pelo método de Ziehl-Neelsen para pesquisa direta de BAAR.

Microscopicamente, granulomas presentes nos diferentes órgãos/tecidos (pericárdio, pleura, linfonodos, fígado, baço, intestino, mesentério, rins e trato reprodutivo) foram classificados em quatro categorias de acordo com o estágio de desenvolvimento da lesão (Wangoo, Johnson *et al.*, 2005):

- ✓ **Estágio I** – inicial ou lesão precoce;
- ✓ **Estágio II** - granulomas sólidos;
- ✓ **Estágio III** – presença de pequenas áreas de necrose;
- ✓ **Estágio IV** – presença de necrose e mineralização.

Além disso, três níveis de encapsulamento dos granulomas foram identificados, conforme a classificação proposta neste estudo:

- ✓ **Nível I** - encapsulamento definido e pouco espesso;
- ✓ **Nível II** – presença de cápsula fibrosa bem delimitada e pouco densa;
- ✓ **Nível III** – cápsula espessa e densa.

Todos os granulomas pulmonares foram submetidos a exame histopatológico/histomorfológico. Conforme este estudo, as lesões pulmonares primárias foram classificadas em quatro diferentes grupos:

Grupo I (score = 1): granulomas circunscritos por cápsula fibrosa com áreas de necrose caseosa; macrófagos epitelióides, poucas células gigantes multinucleadas do tipo Langhans e densos focos de neutrófilos podem ser observados circundando as áreas de necrose; presença de infiltrado difuso de linfócitos próximo à cápsula.

Grupo II (score = 2): granuloma circunscrito por cápsula fibrosa com extensas áreas de necrose caseosa central; resposta celular granulomatosa composta principalmente por populações de macrófagos epitelióides, linfócitos, pequena quantidade de células gigantes

multinucleadas tipo Langhans e focos de neutrófilos circundando as áreas de necrose estendendo-se até a cápsula.

Grupo III (score = 3): granulomas circunscritos por cápsula de tecido conjuntivo fibroso, com extensas áreas de necrose caseosa multicêntrica e mineralização distrófica central; resposta celular granulomatosa composta de macrófagos epitelióides e moderada quantidade de células gigantes multinucleadas do tipo Langhans que se apresentam de forma difusa circundando a área de necrose; presença de linfócitos e poucos ou ausentes neutrófilos próximo à cápsula.

Grupo IV (score = 4): granulomas encapsulados, com extensas áreas de necrose caseosa multicêntrica e mineralização distrófica central; resposta celular granulomatosa composta por grande quantidade de macrófagos epitelióides e células gigantes multinucleadas do tipo Langhans circundando as áreas de necrose, com pouca quantidade ou ausência de neutrófilos; presença de grande quantidade de linfócitos organizados de forma difusa próxima à cápsula.

A análise semi-quantitativa das populações celulares que compõem a resposta granulomatosa foi realizada em 10 campos (objetiva de 100 vezes), em três cortes histológicos para cada granuloma pulmonar primário. A leitura foi realizada considerando três campos no terço superior, quatro campos no terço médio e três campos no terço inferior da lesão. A quantidade de cada população celular que compõe a resposta granulomatosa na lesão foi estimada como sendo a média em 10 campos. A média e o desvio padrão foram determinados para cada grupo. No caso de lesões coalescentes ou multicêntricas, para a análise histomorfológica foi considerada a lesão primária ou mais crônica/avançada. O número médio de BAAR encontrados em cada corte histológico corado por Ziehl-Neelsen foi estimado em 50 campos (objetiva de 100 vezes), sendo considerados 15 campos nos terços superior inferior e 20 campos no terço médio da lamina histológica corada.

3.5 Exame sorológico

A pesquisa de anticorpos contra o vírus da leucose enzoótica bovina (BLV) foi realizada através do teste de imunodifusão em gel de agarose (IDGA) utilizando os antígenos p24 e gp51 produzidos comercialmente (TECPAR, Brasil), conforme metodologia descrita por (Miller e Van Der Maaten, 1977) (**Figura 10**). Para a pesquisa de anticorpos contra os diferentes sorovares de *Leptospira interrogans* (L.

australis, *L. autumnalis*, *L. bratislava*, *L. canicola*, *L. copenhageni*, *L. grippotyphosa*, *L. hardjo*, *L. hebdomadis*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. pomona*, *L. pyrogenes*, *L. tarassovi* e *L. wolffi*) foi utilizada a técnica de microaglutinação, proposta por (Galton, Sulzer *et al.*, 1965; Cole, Sulzer *et al.*, 1973). Apenas foram considerados positivos animais com título \geq 200.

A pesquisa de anticorpos contra o vírus da BVD, vírus da IBR e NCI foi realizado através do teste de ELISA utilizando os kits IDEXX BVDV Ab Test, IDEXX IBR gB Test e HerdChek Anti-*Neospora caninum* (IDEXX Laboratories). Os procedimentos do teste e interpretação dos resultados das análises foram realizados conforme as recomendações do fabricante.

3.6 Análise da reação de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) e reação proliferativa de linfócitos em bovinos com leucose enzoótica bovina (LP-BLV)

3.6.1. Grupos experimentais

Formam utilizados 34 bovinos fêmeas da raça Holandesa/Jersey ou cruzamento, com idade variando de 2 á 6,5 anos e negativos no TCC para bTB. Com base no exame sorológico para BLV e hemograma com contagem diferencial de leucócitos, os animais foram classificados em BLV-positivos com linfocitose persistente (LP-BLV+), e não infectados pelo BLV (BLV-), agrupados conforme a **Tabela 2**. Os animais do grupo LP-BLV+ (n=17) foram positivos para BLV no teste de imunodifusão em gel de agarose (IDGA) e apresentavam contagem de linfócitos no sangue periférico acima de 8.000 células/mL, por um período superior a seis meses. Os animais BLV- (n=17) foram negativos no teste sorológico para BLV e apresentavam uma contagem de linfócitos definida como normal para bovinos adultos de raças europeias com aptidão leiteira (2.500 - 7.500 células/mL) (Fossum, Burny *et al.*, 1988; Lewin, Wu *et al.*, 1988; Trueblood, Brown *et al.*, 1998). Durante o período experimental os animais foram mantidos sob as condições de rotina de criação na respectiva unidade de produção. Para avaliar a reação de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) e a reação proliferativa de linfócitos, 12 animais do grupo LP-BLV+ e 12 animais do grupo BLV- foram inoculados com 10mg de extrato protéico obtido do sobrenadante de cultura de *M. bovis* cepa AN5 (CFPb) e *M. avium* cepa D4 (CFPa), ressuspenso em 1 ml de solução salina estéril. A inoculação foi realizada na região da barbeta por via subcutânea. O

grupo controle negativo foi formado por cinco animais LP-BLV e 5 animais BLV-, que receberam a aplicação de 1 mL de PBS estéril. A esterilidade do inóculo foi confirmada através da cultura bacteriológica. A concentração protéica foi determinada utilizando o Micro BCA Protein Assay Kit, conforme instruções do fabricante (Thermo Scientific), utilizando como padrão soroalbumina bovina.

Tabela 2 - Resumo das características dos grupos experimentais utilizados na análise da DTH e resposta proliferativa de linfócitos.

Grupos experimentais ⁽¹⁾	Número de animais	Sexo	BLV - IDGA ⁽²⁾	Inóculo (mg)	
				CFPb ⁽³⁾	CPPa ⁽⁴⁾
BLV-	12	F	(-)	10	10
LP-BLV+	12	F	(+)	10	10
BLV-	5	F	(-)	PBS	PBS
LP-BLV+	5	F	(+)	PBS	PBS

Fonte: o autor.

Notas: sinais convencionais utilizados:

(-) Resultado negativo no exame diagnóstico IDGA;

(+) Resultado positivo no exame diagnóstico IDGA;

F Sexo feminino;

PBS Solução salina tamponada com fosfatos;

(1) Grupos experimentais: LP-BLV, grupo de animais positivos para o vírus da leucose enzoótica bovina com linfocitose persistente;

(2) BLV-IDGA, teste de imunodifusão em gel de agarose para BLV;

(3) CFPb, extrato protéico do sobrenadante de cultura de *M. bovis* cepa AN5;

(4) CPPa, extrato protéico obtido do sobrenadante de cultura de *M. avium* cepa D4.

3.6.2 Determinação da intensidade e padrão histomorfológico da reação de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH)

A reação DTH foi determinada pela medida do aumento da espessura da prega cutânea (mm) após 56 dias da sensibilização. Dois pontos na região cervical medial, distanciados 15-20 cm, foram tricotomizados ($\pm 3 \text{ cm}^2$) e a prega da pele medida com cutímetro calibrado. Em seguida em ambos os pontos foi injetado 0,1 mL de (CFPb) e (CPPa). A leitura foi realizada 72 ± 6 horas após a inoculação, quando a espessura da prega da pele nos locais de aplicação das CFPs

foi mensurada. O tamanho da reação DTH foi determinado para cada animal individualmente e os valores para cada grupo comparados. Foram considerados anérgicos e/ou excluídos da análise animais que apresentaram, no local da aplicação, reação $\leq 0,5$ mm para um ou ambos os antígenos. Após a leitura da DTH foi realizada a biópsia da pele no local da reação. Os fragmentos de tecido obtidos foram fixados em solução de formalina 10% tamponada (pH 7,2-7,4) por um período de 48 horas. Em seguida, as amostras de tecido foram embebidas em parafina, emblocadas e os cortes (4 μ m) histológicos corados utilizando método hematoxilina e eosina (H&E). A análise histomorfológica e captura das imagens foi realizada em microscópio óptico Olympus BX-40.

3.6.3. *Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)*

Para o isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), foram coletados 50 mL de sangue total de cada bovino em frascos estéreis com anticoagulante (citrato de sódio/dextrose, 500 mg/mL) através de punção da veia jugular. As PBMC foram isoladas por sedimentação em gradiente de densidade utilizando Ficoll (Sigma-Aldich Ltda.) conforme as instruções protocolares do fabricante. As PBMCs obtidas foram contadas e avaliadas quanto a sua viabilidade em câmara de Neubauer, após diluição de 10 vezes em corante de exclusão azul de tripan. Em seguida as células foram suspensas em meio RPMI 1640 completo, que contém 10 U/mL e 10 μ g/ml de penicilina e estreptomicina (Gibco), respectivamente, 2 mM de L-glutamina (Gibco); 1 mM de piruvato de sódio (Sigma), 25 μ M de HEPES (Cellgro), 10% de FBS e 10 μ g/mL de Concanavalina A (ConA). 2×10^5 foram adicionadas em placas de poliestireno com fundo em U e incubadas a 37 °C, com atmosfera umidificada 5% de CO₂ (Rennie, Filion *et al.*, ; Meade, Gormley *et al.*, 2006). Periodicamente a proliferação das PBMCs foi monitorada e fotografada.

3.7 **Análise estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc.). A correlação entre carga bacteriana, nível de encapsulamento dos granulomas, intensidade da resposta

granulomatosa, escore anatomopatológico e disseminação das lesões foi estimada por análise não paramétrica aplicando o teste de Spearman. Nas análises são apresentados os valores do coeficiente de correlação de Spearman (r_s) e valor de p . A diferença de carga micobacteriana e reação DTH entre dois grupos foi estimada utilizando o teste não paramétrico de Mann Whitney. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p \leq 0,05$. Os dados apresentados estão expressos como média \pm erro padrão da média (SEM).

RESULTADOS

A carga micobacteriana tecidual correlaciona com a gravidade anatomopatológica das lesões de bTB em bovinos naturalmente infectados pelo *M. bovis*

Dados experimentais e observacionais têm demonstrado que bovinos apresentam resistência à infecção pelo *M. bovis* (Neill, Bryson *et al.*, 2001; Pollock e Neill, 2002; Liebana, Johnson *et al.*, 2008; Bermingham, More *et al.*, 2009; Widdison, Watson *et al.*, 2009). Essa resistência pode ter impacto sobre os programas de vigilância e controle da bTB, bem como na disseminação micobacteriana, principalmente nos casos em que há demora entre o teste para diagnóstico da bTB e a eliminação dos animais positivos. Para conhecer os elementos da imunobiologia da interação *M. bovis*-hospedeiro bovino durante a infecção natural pelo *M. bovis*, foram estudados uma coorte de 349 bovinos PPD-positivos. A análise sorológica e micobacteriológica dos animais PPD-positivos permitiu estabelecer o cenário epizootico e a análise sistematizada da dinâmica de infecção do rebanho **Tabela 3**.

Tabela 3 - Perfil sorológico e micobacteriológico dos animais estudados.

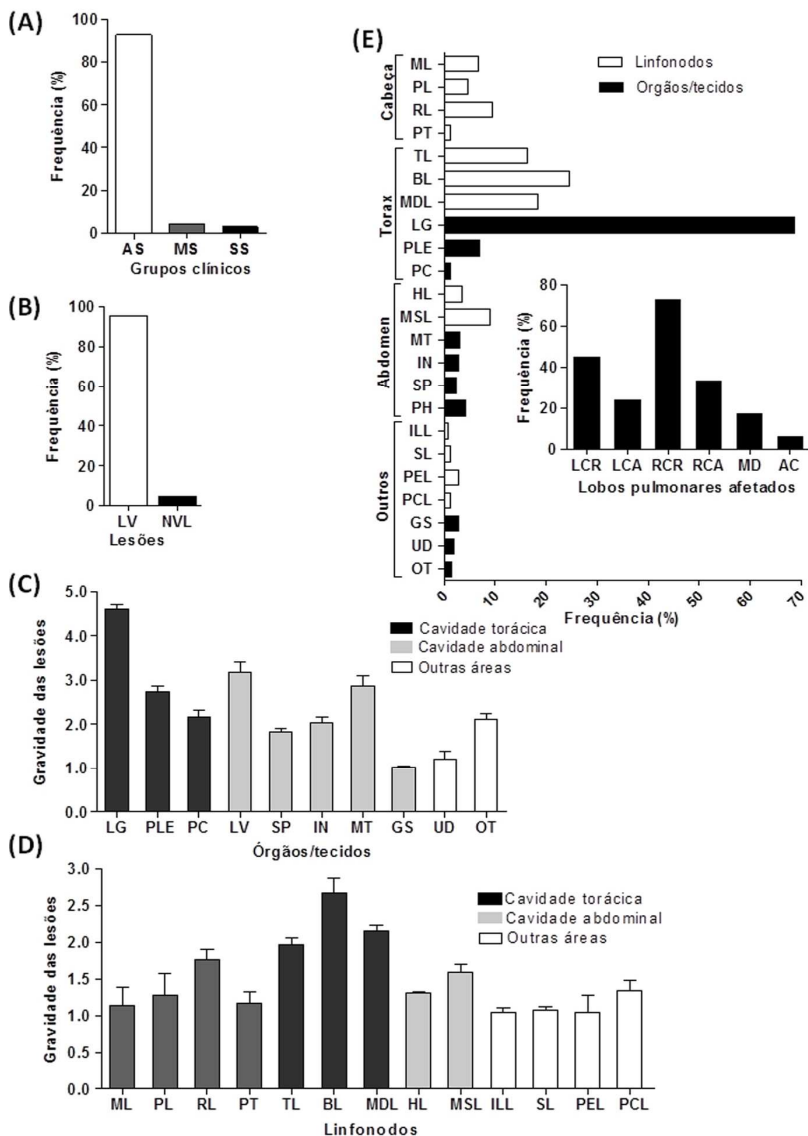
Grupos de análise	Número de animais (n)
Animais PPD-positivo	349
<i>M. bovis</i> -negativos	46
<i>M. bovis</i> -positivos	303
Não coinfectados	247
Coinfectados	56
Vírus da leucose enzoótica bovina (BLV)	17
Vírus da diarreia viral bovina (BVD)	13
Vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR)	10
<i>Neospora caninum</i>	10
<i>Leptospira</i> spp.	6

Fonte: o autor.

Para conhecer e entender os padrões basilares da resposta imunopatológica induzida durante o período compreendido entre a infecção e o aparecimento dos sinais clínicos associados à bTB,

avaliamos o grupo de bovinos PPD-positivos naturalmente infectados pelo *M. bovis* (grupo de bovinos não coinfectados, NR) (n=247). Nesta análise, 92,3% dos animais (228/247) não apresentaram sinais clínicos sugestivos de bTB (grupo assintomático, AS) (**Figura 10 A**). Surpreendentemente, na avaliação *post mortem*, 217 bovinos (95,2% do grupo AS) apresentaram lesões visíveis de bTB (**Figuras 10 A-B**), com diferentes graus de gravidade (**Figura 10 C-D**). A maioria dos animais apresentou lesões nos pulmões, principalmente no lobo cranial direito e nos linfonodos associados ao trato pulmonar (**Figura 10 E**), sugerindo que a via de transmissão aerógena foi provavelmente a principal via de infecção nos rebanhos bovinos estudados. Assim, estes resultados demonstram que diferentes órgãos são afetados pelo *M. bovis* e sugerem que após a infecção primária a bactéria pode se disseminar para diferentes tecidos ou sítios anatômicos durante a infecção natural.

Figura 10 - Aspectos clínico-patológicos de bovinos naturalmente infectados com *M. bovis*. (**A**) Após o exame clínico, os animais PPD-positivos (n = 247) foram classificados de acordo com seu estado clínico em assintomáticos (AS, n = 228), com sinais clínicos moderados (MS, n = 11), e sinais clínicos graves (SS, n = 8). (**B**) Exame *post mortem* dos animais PPD-positivos assintomáticos: presença de lesões visíveis (VL) ou ausência de lesões visíveis (NVL). (**C - D**) A gravidade das lesões foi estimada com base no escore anatomopatológico semi-quantitativo. Os resultados mostrados são a média do escore \pm SEM. (**C**) órgãos / tecidos: órgãos e tecidos da cavidade torácica (pulmão (LG), pleura (PLE), pericárdio (PC)); cavidade abdominal (fígado (LV), baço (SP), intestino (IN), mesentério (MT), sistema genito-urinário (GS)); outras áreas: úbere (UD), outros tecidos: (OT)). (**D**) linfonodos: linfonodos da cabeça (mandibulares (ML), parotídeos (PL), retrofaríngeos (RL) e tonsilas palatinas (PT)); linfonodos torácicos (traqueobrônquicos (TL), brônquicos (BL) e mediastininais (MDL)); linfonodos abdominais: (hepático (HL), mesentéricos (MSL)), ilíacos (ILL), isquiáticos (SL), pré-escapulares (PEL) e pré-crurais (PCL). (**E**) Frequência de lesões de bTB nos diferentes órgãos / linfonodos afetados. Legenda segue descrição de (**C**) e (**D**). (**Detalhe de E**): Frequência de lobos pulmonares afetados (lobo cranial direito (LCR), lobo caudal esquerdo (LCA), lobo cranial direito (RCR), lobo caudal direito (RCA), lobo médio (MD) e lobo acessório (AC)).



Fonte: o autor.

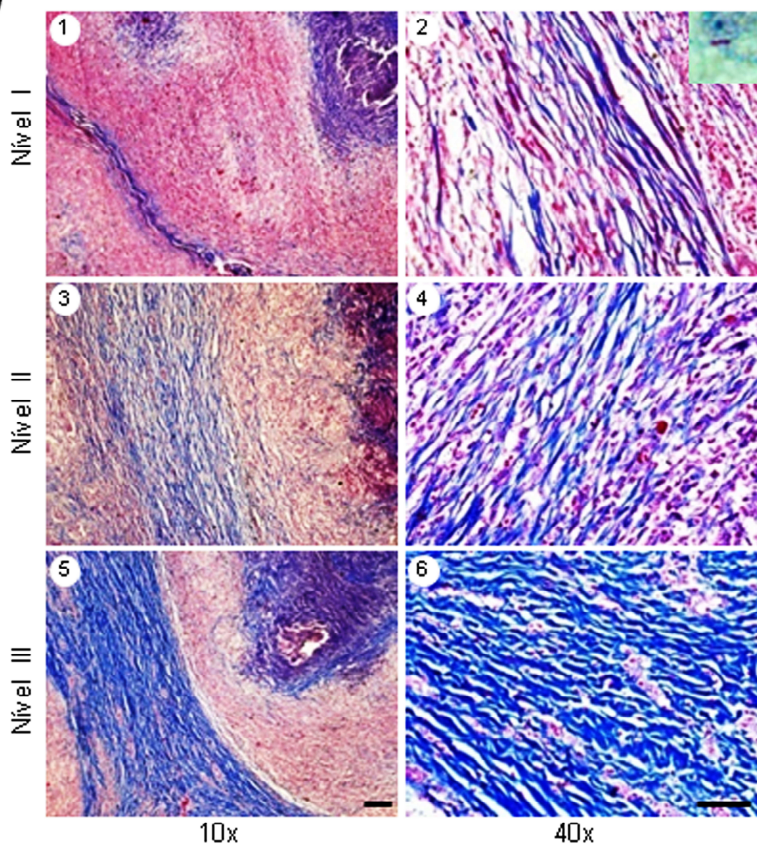
Para estudar a gravidade da doença e possíveis correlações imunopatológicas da infecção pelo *M. bovis* foi desenvolvido um sistema simples de escore baseado na disseminação anatômica das lesões sugestivas de bTB (**Figura 11 A**). Usando este sistema simples, 66,2% (n = 151) dos bovinos do grupo de animais assintomáticos (AS) foram classificados nas categorias IV e V, indicando para uma possível associação entre a disseminação da infecção e a atividade da doença. Para validar essa hipótese, realizamos um estudo de correlação, aplicando o método de Spearman (r), entre as variáveis carga bacteriana (UFC, **Figura 9 A**), gravidade das lesões anatomopatológicas (**Figura 10 C-D**) e disseminação das lesões de bTB. Conforme demonstrado (**Figura 11 A-B**), nosso sistema de escore está correlacionado com a gravidade das lesões bem como com a carga bacteriana nos tecidos (**Figura 11 C-D**). Estes resultados demonstram que bovinos naturalmente infectados com patologia grave apresentam maiores cargas de *M. bovis* viável nos tecidos, principalmente pulmonar. Além disso, estes achados sugerem que animais assintomáticos podem desempenhar um importante papel na transmissão do *M. bovis* e manutenção da doença antes do diagnóstico e abate e/ou eliminação dos animais infectados do rebanho.

Figura 11 - Disseminação anatômica das lesões de bTB e desafio infeccioso em bovinos naturalmente infectados com *M. bovis*. (**A**) Níveis de disseminação das lesões, de acordo com as regiões anatômicas, e a frequência de distribuição destas na população estudada: nível I, lesões de bTB nos linfonodos da cabeça, incluindo retrofaríngeos, mandibulares, e parotídeos; nível II, presença de lesões de bTB em linfonodos torácicos, incluindo mediastinais, brônquicos, traqueobrônquicos, ou em linfonodos abdominais, incluindo linfonodos mesentéricos, inguinais, hepático, sub-ilíacos, linfonodos ilíacos; nível III, presença simultânea de lesões de bTB em linfonodos torácicos e abdominais; nível IV, presença de lesões de bTB em órgãos da cavidade torácica ou abdominal; e, nível V, presença simultânea de lesões de bTB em órgãos das cavidades torácica e abdominal. No desenho esquemático a linha contínua representa ambas as cavidades afetadas (torácica e abdominal); linha pontilhada representa apenas uma cavidade afetada; balões verdes indicam órgãos afetados e balões azuis indicam linfonodos afetados. (**B e C**) Correlação entre os níveis de disseminação das lesões: (**B**) gravidade das lesões e (**C**) carga micobacteriana tecidual. Índices de correlação de Spearman (r de Spearman e valores de p) são

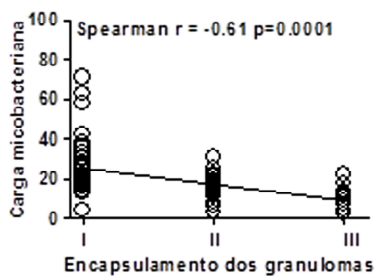
Russell, 2007; Ramakrishnan, 2012). Após a análise das lesões primárias de 217 animais infectados do grupo AS (573 granulomas), três níveis (I-III) de intensidade de encapsulamento foram identificados (**Figura 12 A**), nos quais a maior parte dos animais (64%) apresentou nível III (encapsulamento fibroso e espesso), o que indica uma tentativa fisiopatológica do organismo de limitar a infecção. Consistente com estes resultados, uma correlação negativa significativa entre encapsulamento e carga bacteriana viável (Spearman $r = -0,61$ $p = 0,0001$) foi observada (**Figura 12 B**). Além disso, a gravidade das lesões anatomopatológicas (Spearman $r = -0,50$ $p < 0,0001$) (**Figura 12 C**) e o número de BAAR (Spearman $r = -0,41$ $p < 0,0001$) também estão negativamente correlacionados com o nível de encapsulamento. Curiosamente, BAAR foram observados principalmente no centro caseo-necrótico do granuloma e raramente no interior de macrófagos, células gigantes multinucleadas ou debris mineralizados (**Detalhe Figura 12A**). Estes dados sugerem que a formação do encapsulamento do granuloma pode ser importante para conter o crescimento e/ou disseminação do *M. bovis* nos tecidos em bovinos naturalmente infectados.

Figura 12 - Análise histopatológica do nível de encapsulamento dos granulomas primários em bovinos naturalmente infectados com *M. bovis*. **(A)** Fragmentos das lesões de bTB foram fixados em solução de formalina tamponada 10%, embebidos em parafina, e as secções (4 μ m) coradas utilizando tricromo de Masson e classificados de acordo com a espessura e intensidade do encapsulamento do granuloma em três níveis: (1 e 2) nível I, encapsulamento fino e pouco denso; (3 e 4) nível II, cápsula espessa e pouco densa; (5 e 6) nível III, capsula espessa fibrosa e densa. (Detalhe de A) BAAR. (Painéis da esquerda, são apresentados em aumento de 10x, Escala = 100 μ m. Painéis da direita, são apresentados em aumento de 40x, Escala = 50 μ m. **Detalhe de A2**, mostrado em aumento de 200x. **(B e C)** Correlação entre a intensidade de encapsulamento dos granulomas e a carga de micobactérias viáveis **(B)** ou **(C)** gravidade das lesões em bovinos naturalmente infectados com *M. bovis* são apresentados. Índices de correlação de Spearman (r de Spearman e valores de p) são mostrados na área dos gráficos.

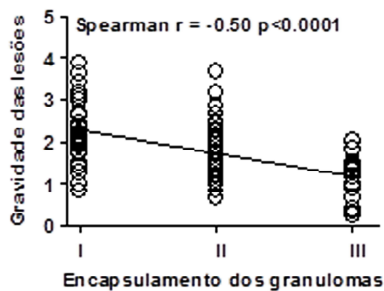
(A)



(B)



(C)



Fonte: o autor.

Análise do perfil celular da resposta pulmonar granulomatosa de bovinos naturalmente infectados com *M. bovis*

As características estruturais do granuloma podem estar associadas a evolução da bTB (Pollock e Neill, 2002). Com base na análise histológica da resposta granulomatosa em linfonodos de bovinos experimentalmente infectados com *M. bovis* descrita por Wangoo e colaboradores é possível classificar as lesões em quatro estagios de desenvolvimento (Wangoo, Johnson *et al.*, 2005) **Tabela 4**.

Tabela 4 - Distribuição e estágio de desenvolvimento histológico de granulomas primários em bovinos naturalmente infectados pelo *M. bovis*.

Distribuição dos granulomas		Estágio de desenvolvimento dos granulomas (%)			
		I	II	III	IV
Órgãos/tecidos					
Tórax	Pulmão	1,9 (3/159)	1,2 (2/159)	11,3 (13/159)	85,5 (136/159)
	Pleura	0	22,2 (4/18)	5,6 (1/18)	72,2 (13/18)
	Pericárdio	0	0	0	100 (6/6)
	Fígado	0	12,5 (1/8)	0	87,5 (7/8)
Abdominal	Baço	0	0	16,7 (1/6)	83,3 (5/6)
	Intestino	0	0	28,6 (2/7)	71,4 (5/7)
	Mesentério	0	0	25 (2/8)	75 (6/8)
Carçaça	Sistema Geniturinário	0	28,6 (2/7)	0	71,4 (5/7)
	Úbere	0	0	0	100 (5/5)
	Outros tecidos	25 (1/4)	75 (3/4)	0	0

Tabela 4 - Distribuição e estágio de desenvolvimento histológico de granulomas primários em bovinos naturalmente infectados pelo *M. bovis*.
(conclusão)

Distribuição dos granulomas	dos	Estágio de desenvolvimento dos granulomas (%)			
		I	II	III	IV
Linfonodos					
	Parotídeos	0	16,7 (2/12)	0	83,3 (10/12)
Cabeça	Retrofaringeais	4,2 (1/24)	0	16,7 (4/24)	79,2 (19/24)
	Mandibulares	0	5,9 (1/17)	52,9 (9/17)	41,2 (7/17)
	Tonsilas palatinas	0	0	0	100 (3/3)
	Traqueobronquiais	2,4 (1/42)	4,7 (2/42)	14,3 (6/42)	85,7 (36/42)
Tórax	Bronquiais	1,6 (1/63)	3,2 (2/63)	4,7 (3/63)	90,5 (57/63)
	Mediastinais	4,3 (2/47)	2,1 (1/47)	4,3 (2/47)	89,4 (42/47)
Abdominal	Hepático	0	0	22,2 (2/9)	77,8 (7/9)
	Mesentéricos	0	9,1 (3/33)	12,1 (4/33)	69,7 (23/33)
	Íliacos	0	0	0	100 (2/2)
Outros	Isquiáticos	0	0	0	100 (3/3)
	Pré-escapulares	0	14,3 (1/7)	0	85,7 (6/7)
	Precurrais	0	0	0	100 (3/3)

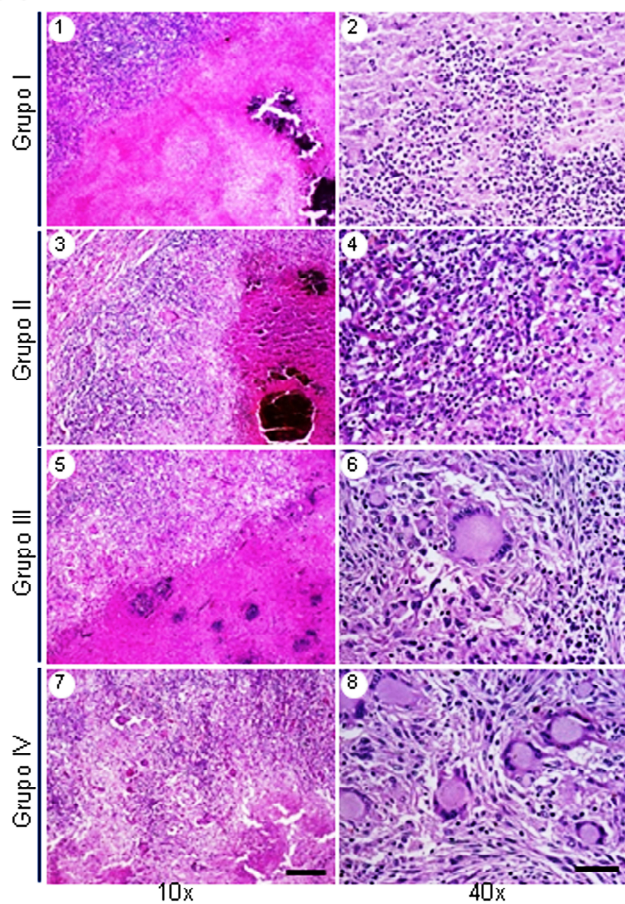
Fonte: o autor.

Na sequência realizamos uma análise detalhada do perfil histomorfológico da resposta granulomatosa pulmonar dos animais assintomáticos. Como demonstrado na **Figura 13 A**, a análise histopatológica da resposta granulomatosa tuberculosa revelou quatro padrões histomorfológicos (graus I-IV), que diferem quanto ao perfil das populações celulares associadas ao granuloma: células gigantes multinucleadas, macrófagos epitelióides, neutrófilos e linfócitos (**Figura**

13 B). Como esperado, a população de células gigantes multinucleadas tipo Langhans apresentou uma correlação positiva com os diferentes graus histopatológicos identificados (Spearman $r = 0,55$, $p = <0,0001$). Em contraste, o número de neutrófilos apresentou correlação negativa (Spearman $r = -2,55$, $p = <0,0001$) (**Figura 13 C**). Estes dados sugerem que os granulomas pulmonares de bovinos naturalmente infectados com *M. bovis*, embora sejam lesões crônicas e encapsuladas, são locais de crescimento micobacteriano que, de forma dinâmica, recrutam neutrófilos. Em apoio a esta hipótese observou-se uma correlação positiva entre o número de neutrófilos e a carga de *M. bovis* viável (Spearman $r = 0,27$, $p = 0,021$) (**Figura 13 D**). Além disso, o número de UFC de *M. bovis* correlacionou-se negativamente com o número de células gigantes multinucleadas (Spearman $r = -0,25$, $p = 0,03$) (**Figura 13 E**) e com os graus histomorfológicos das lesões pulmonares (Spearman $r = -0,30$, $p = 0,009$) (**Figura 13 F**). Em conjunto, estas evidências sugerem que o ambiente intragranuloma é dinâmico e os neutrófilos e células gigantes multinucleadas podem desempenhar um papel importante na regulação do crescimento do *M. bovis* no pulmão durante a infecção natural em bovinos.

Figura 13 - Análise histopatológica do perfil celular da reação granulomatosa tuberculosa no pulmão de bovinos naturalmente infectados com *M. bovis*. **(A)** Lesões pulmonares foram agrupadas (I-IV) de acordo com o perfil das populações celulares da resposta granulomatosa tuberculosa e remodelamento do tecido lesional. Padrões representativos da resposta granulomatosa das lesões pulmonares são mostrados: (1 e 2) grupo I granuloma encapsulado, com necrose caseosa central, densos focos de neutrófilos e macrófagos epitelióides circundando as áreas de necrose e infiltrado difuso de linfócitos próximo à cápsula; (3 e 4) grupo II, granuloma encapsulado, com extensas áreas de necrose caseosa central, com a presença de macrófagos epitelióides, linfócitos, células gigantes multinucleadas e pequenos focos de neutrófilos; (5 e 6) grupo III, granuloma encapsulado, com extensas áreas de necrose caseosa multicêntrica e mineralização distrófica central. Resposta granulomatosa composta por macrófagos epitelióides, moderada quantidade de células gigantes multinucleadas, que circundam as áreas de necrose e infiltrado denso de linfócitos próximo a cápsula; (7 e 8) grupo IV, granuloma encapsulado com extensas áreas de necrose caseosa multicêntrica e mineralização distrófica central. Resposta granulomatosa composta por macrófagos epitelióides, grande quantidade de células gigantes multinucleadas tipo Langhans e aglomerados densos de linfócitos. Coloração hematoxilina e eosina (H&E). Painéis da esquerda são apresentados em aumento de 10x, escala = 100µm. Painéis da direita são apresentados em aumento de 40x, escala = 50µm. **(B)** Os resultados apresentados são a média ± SEM para cada grupo mostrado em **(A)**. Correlação entre número de neutrófilos e agrupamentos histológicos **(C)**, correlação entre carga micobacteriana viável (UFC) e a população de neutrófilos **(D)**, células gigantes multinucleadas tipo Langhans **(E)**, bem como padrão histomorfológico da resposta granulomatosa das lesões pulmonares **(F)**. Índices de correlação de Spearman (r de Spearman e valores de p) são mostrados na área do gráfico.

(A)



(B)

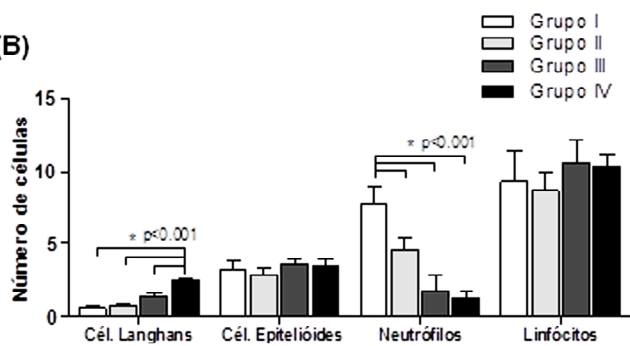
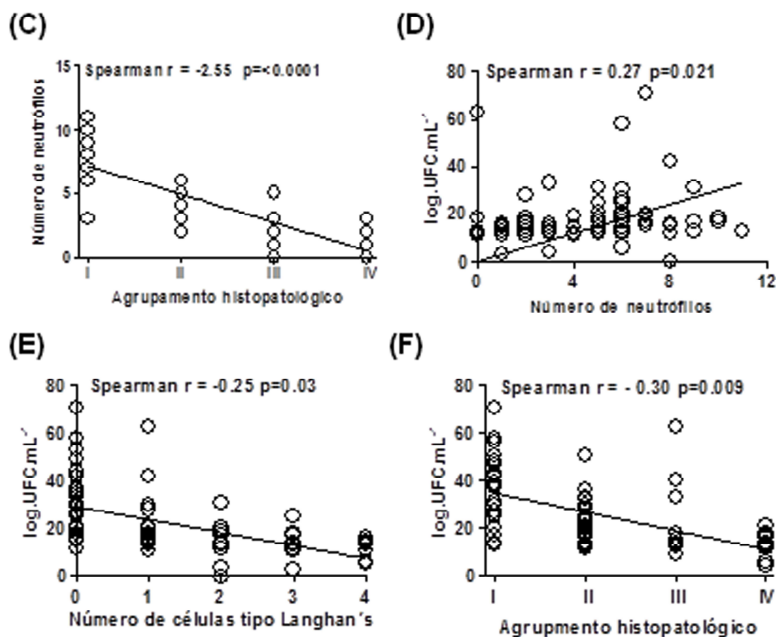


Figura 13 - Análise histopatológica do perfil celular da reação granulomatosa tuberculosa no pulmão de bovinos naturalmente infectados com *M. bovis*.
(conclusão)



Fonte: o autor.

Bovinos *M. bovis*-positivos coinfetados pelo vírus da leucose enzoótica bovina (BLV) apresentam maior carga micobacteriana e bTB mais grave

O estabelecimento e evolução da bTB dependem basicamente da capacidade do bacilo sobreviver no ambiente intracelular e da efetividade do hospedeiro regular o crescimento do *M. bovis* (Molloy, Laochumroonvorapong *et al.*, 1994; Gutierrez, Master *et al.*, 2004). Neste contexto, condições ambientais como as co-infecções virais, bacterianas e/ou parasitárias podem comprometer a efetividade dos mecanismos de defesa do hospedeiro e aumentar a suscetibilidade à bTB (Karlson, 1962 ; Charleston, Hope *et al.*, 2001; Hughes, Ball *et al.*, 2005; Claridge, Diggle *et al.*, 2012). Para entender como as co-infecções podem afetar a resposta imunopatológica contra o *M. bovis* durante a infecção natural, analisamos os padrões de gravidade da patologia e carga micobacteriana, indicativos da atividade da infecção no grupo de animais sorologicamente reagentes para BLV (n=17), BVD (n=13), IBR (n=10), *Neospora caninum* (n=10); *Leptospira* spp. (n=6). Os animais BLV-positivos apresentaram bTB mais grave quando comparados com os animais não coinfetados (grupo não reagente, NR) dos respectivos surtos de bTB (**Figura 14**). A maioria dos animais apresentou maior disseminação das lesões (**Figura 14 A**), maior gravidade da patologia (**Figura 14 B**) e carga micobacteriana intragranuloma (**Figura 14 C**), sugerindo que a coinfeção pelo BLV compromete a resposta imune dos bovinos, e afeta o equilíbrio patógeno-hospedeiro, aumentando a suscetibilidade dos bovinos à infecção pelo *M. bovis*. Nesta coorte os animais positivos para *M. bovis* com infectados (BVD, IBR, *Neospora caninum* ou *Leptospira* spp.) não apresentaram alterações significativas no quadro clínico de bTB (dados não mostrados). Em conjunto, estes resultados demonstram que a coinfeção por BLV aumenta a carga micobacteriana e gravidade da doença em bovinos.

Para estudar os fatores do sistema imune associados a maior gravidade da bTB nos animais BLV-positivos e entender os possíveis correlatos imunopatológicos, realizamos uma análise detalhada do perfil celular da resposta granulomatosa tuberculosa nos animais coinfetados pelo BLV. Os dados da análise aqui apresentados (**Figura 14**) mostram padrões histomorfológicos e de remodelamento tecidual particulares em que se pode notar uma menor população de linfócitos residentes, principalmente no ambiente intragranulomatoso, associados a uma maior população de células epitelióides e neutrófilos (**Figura 14 D**).

Adicionalmente, também observamos menor nível de encapsulamento dos granulomas pulmonares neste grupo de animais (**Figura 14 D**). Nossos achados indicam que os animais BLV-positivos apresentam alteração no recrutamento de células para o ambiente da resposta granulomatosa tuberculosa alterado, no qual a diminuição no número de linfócitos no ambiente intragranulomatoso sugere um comprometimento da resposta imune celular adaptativa. Além disso, o aumento de células epitelióides e neutrófilos intragranuloma pode representar uma reação compensatória do sistema imune inato para a defesa do hospedeiro, associada a maior proliferação micobacteriana. Contudo, este padrão de resposta poderia ser considerado indicativo de maior suscetibilidade do hospedeiro à infecção natural pelo *M. bovis*.

Figura 14 - Gravidade da patologia de bTB em bovinos durante a infecção natural concomitante pelo BLV e *M. bovis*. **(A-B)** Análise histomorfológica do perfil celular da resposta granulomatosa tuberculosa e remodelamento do tecido lesional. Painéis da esquerda são apresentados em aumento de 10x, escala = 200 μ m. Painéis da direita são apresentados em aumento de 40x, escala = 50 μ m. Os resultados apresentados em **(B)** correspondem à média \pm SEM. Os valores de *p* são mostrados no gráfico.

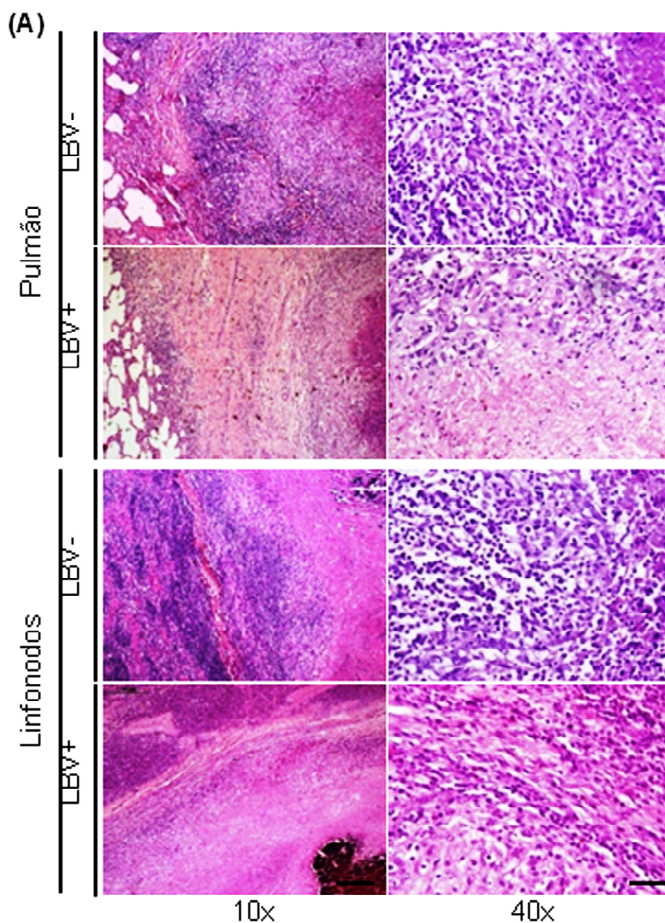
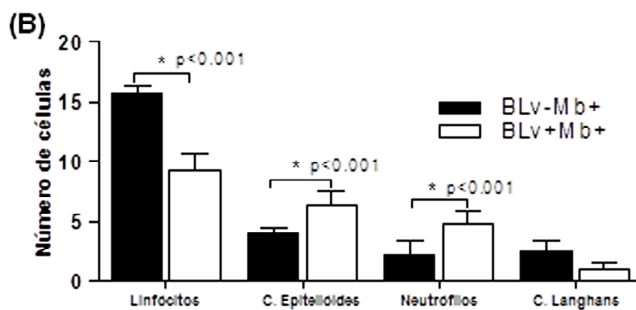


Figura 14 - Gravidade da patologia de bTB em bovinos durante a infecção natural concomitante pelo BLV e *M. bovis*. (conclusão)

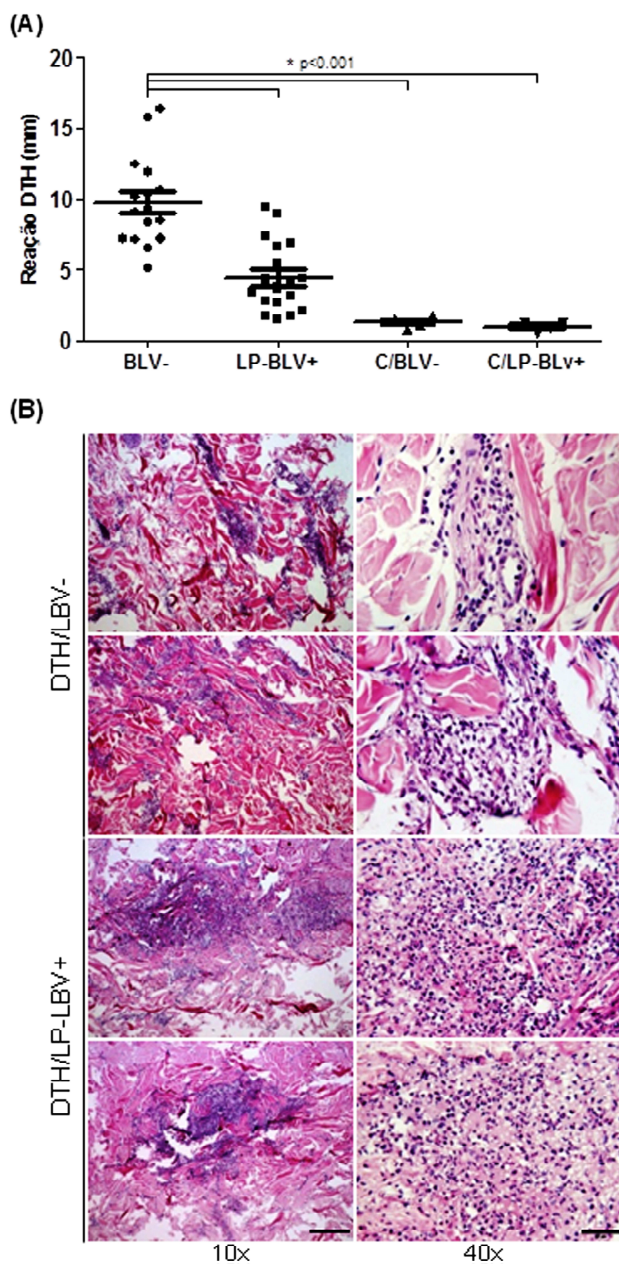


Fonte: o autor.

Bovinos LP-BLV apresentam menor reação de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) e resposta linfoproliferativa *in vitro*

Uma resposta imune anti-micobacteriana efetora, bem como o resultado nos testes diagnósticos oficiais, como TCC e ensaio de IFN- γ , são primariamente orquestrados por células T antígeno-específicas, secretoras de IFN- γ (Cooper, Dalton *et al.*, 1993; Boom, 1996; Flynn e Chan, 2001; Vordermeier, Chambers *et al.*, 2002; Welsh, Cunningham *et al.*, 2005). Com o intuito de estudar a resposta adaptativa dependente de linfócitos T durante a coinfeção *M. bovis* e BLV, analisamos a intensidade da reação de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) em 36 bovinos BLV-positivos com linfocitose persistente (LP-BLV). Como mostrado na (**Figura 15 A**), os animais LP-BLV apresentaram menor reação do tipo DTH quando comparados com animais BLV-negativos, sugerindo um comprometimento da resposta imune celular, controlada por linfócito T antígeno-específicos. Na análise histomorfológica da reação DTH observamos que a resposta inflamatória, formada primariamente por linfócitos e macrófagos, foi menos intensa nos bovinos LP-BLV (**Figura 15 B**), indicando que elementos da patogênese do BLV comprometem o fluxo de células e a intensidade da DTH.

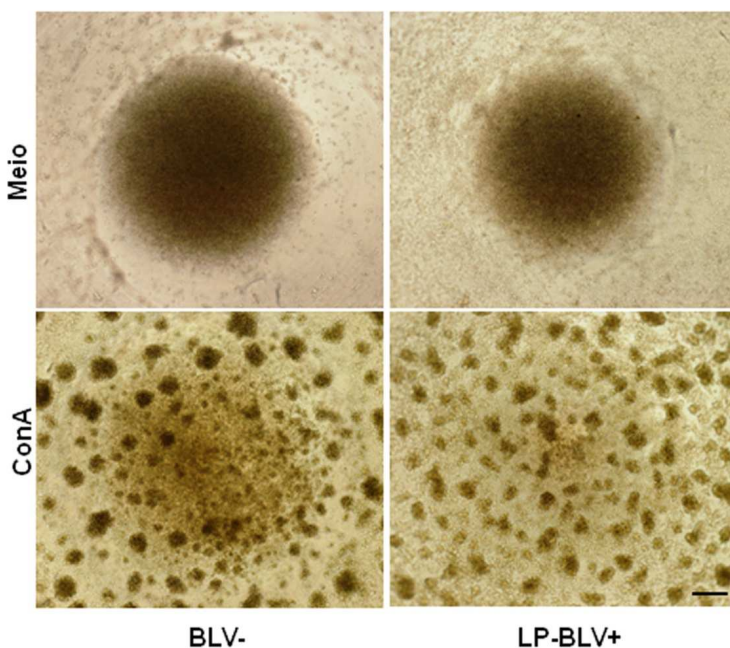
Figura 15 - Intensidade e perfil histomorfológico da reação de hipersensibilidade de tipo tardia (DTH) em bovinos naturalmente infectados com BLV. Bovinos BLV-positivos com linfocitose persistente (LP-BLV+) (n=12) e bovinos BLV-negativos (BLV-) (n=12), foram inoculados com 10mg de extrato protéico obtido do sobrenadante de cultura de *M. bovis* cepa AN5 (CFPb) e *M. avium* cepa D4 (CFPa). O grupo controle, LP-BLV+ n=5 e bovinos BLV- (n=5) recebeu 1 mL de PBS. (A) 56 dias após a sensibilização foi injetado, pela via intradérmica, 0,1 mL de CFPb e CFPa. 72±6 horas após a inoculação a espessura da prega cutânea (mm) foi mensurada e o tamanho da reação DTH foi determinado para cada animal individualmente e os grupo comparados. C/BLV-, controle negativo para BLV. C/LP-BLV+, controle positivo para BLV. (B) Fragmentos de tecido obtidos através da biópsia da pele no local da reação DTH foram fixados em formol a 10% por um período de 48 horas. Em seguida, as amostras foram embebidas em parafina, emblocadas, e os cortes (4µm) corados pelo método hematoxilina e eosina (H&E). A análise histomorfológica do perfil celular da DTH mostrou intenso infiltrado linfohistiocitário com denso agrupamento de linfócitos e macrófagos distribuídos difusamente (1 e 2) e leve (3 e 4). Painéis da esquerda são apresentados em aumento de 10x, escala = 200µm. Painéis da direita são apresentados em aumento de 40x, escala = 50µm. (C) A análise histomorfológica do perfil celular da DTH. Os resultados apresentados em (A) e (C) correspondem à média ± SEM. Os valores de *p* são mostrados no gráfico.



Fonte: o autor.

Experimentos *in vitro* utilizando células de ovinos mostraram que o BLV pode comprometer a resposta de proliferação e sobrevivência dos linfócitos B (Kabeya, Ohashi *et al.*, 2001; Szynal, Cleuter *et al.*, 2003; Usui, Konnai *et al.*, 2007), bem como diminuir a resposta imune celular efetora (Trueblood, Brown *et al.*, 1998; Amills, Norimine *et al.*, 2004). Consistente com estes dados, observamos que a expansão celular de PBMCs foi menos intensa em bovinos LP-BLV (Figura 16), sugerindo a diminuição da proliferação celular.

Figura 16 - Expansão proliferativa de PBMCs em animais LP-BLV+. PBMCs obtidas de bovinos LP-BLV+ n=8 e BLV- n=8 foram estimuladas com concanavalina A (ConA) (10 µg/mL) e incubadas. A expansão da proliferação das PBMCs foi monitorada e fotografada após 72 horas. Escala = 500 µm.



Fonte: o autor.

DISCUSSÃO

A bTB é considerada uma importante zoonose negligenciada, com grande impacto na produção dos rebanhos bovinos e na saúde pública. Entretanto, a dinâmica da interação do *M. bovis* com o hospedeiro durante a infecção natural é pouco entendida. Além disso, os parâmetros imunopatológicos associados com a resposta protetora durante a infecção natural pelo *M. bovis* não são bem compreendidos. Neste estudo, realizamos uma análise detalhada de importantes componentes da resposta de defesa anti-micobacteriana em bovinos naturalmente infectados pelo *M. bovis*, bem como, avaliamos o impacto da co-infecção e infecção natural pelo BLV na resposta imune do hospedeiro.

A análise sistemática dos padrões imunopatológicos basilares correlatos da resposta de defesa anti-micobacteriana em 247 bovinos naturalmente infectados pelo *M. bovis* (grupo de animais não coinfectedos, NR) mostrou que apesar da ausência de sinais clínicos da doença, a maioria dos animais infectados apresentou alta frequência e gravidade de lesões de bTB, principalmente nos pulmões (68,6%), com maior frequência no lobo cranial direito e nos linfonodos associados ao trato respiratório (**Figura 10 E**). A análise anatomopatológica das lesões de bTB em bovinos naturalmente infectados pelo *M. bovis*, oriundos de sistemas intensivos de criação, demonstrou que as lesões de bTB eram mais graves e mais frequentemente associadas ao trato respiratório (Corner, 1994; Liebana, Johnson *et al.*, 2008; Ameni, Vordermeier *et al.*, 2011). Portanto, é possível que sistemas intensivos/semi-intensivos de criação, como é o caso da maioria das unidades de produção de leite bovino no Brasil, favoreçam a disseminação do *M. bovis* entre os animais através da via respiratória, devido ao maior agrupamento e contato entre os animais (Ameni, Aseffa, Sirak *et al.*, 2007; Berg, Firdessa *et al.*, 2009). De fato, verificamos que 66% dos animais apresentaram disseminação sistêmica ou pulmonar do *M. bovis* (níveis III/IV) (**Figura 11 A**), sugerindo que a exposição ao agente patogênico ocorreu primariamente no tecido pulmonar. Estas evidências são apoiadas por estudos anteriores, que demonstraram que bovinos infectados experimentalmente pela via intranasal com *M. bovis* desenvolvem um quadro patológico com lesões confinadas ao trato respiratório, incluindo linfonodos drenantes (Whipple, Bolin *et al.*, 1996; Dean, Rhodes *et al.*, 2005; Cassidy, 2006). Em contraste, estudos da distribuição das lesões de bTB em bovinos naturalmente infectados

pelo *M. bovis*, mantidos em condições de criação extensiva, demonstraram que a maioria (aproximadamente 95%) das lesões concentram-se nos linfonodos mesentéricos ou tecido linfoide associado ao intestino (Ameni, Aseffa, Engers *et al.*, 2007; Ameni, Vordermeier *et al.*, 2011). Sob estas circunstâncias a eliminação do *M. bovis* através das secreções nasais, fezes/urina, seguido da ingestão do bacilo com a pastagem e/ou água contaminada, parece ser rota de infecção primária (Morris, Pfeiffer *et al.*, 1994; Cosivi, Meslin *et al.*, 1995; Ameni, Aseffa, Engers *et al.*, 2007). A presença de lesões de bTB nos linfonodos mesentéricos também foi observado em nosso estudo, embora com uma frequência significativamente menor (8,8%) (**Figura 10 E**), indicando que a infecção pela via oral e respiratória podem ocorrer simultaneamente durante a infecção natural. Estas evidências indicam que as duas vias de transmissão do *M. bovis*, respiratória e oral, ocorrem nos rebanhos bovinos de Santa Catarina e devem ser consideradas pelos programas de controle da bTB durante a implementação das estratégias de erradicação da doença.

Neste estudo também observamos que 13% (46/349) dos bovinos PPD-positivos foram negativos para *M. bovis*. Nestes casos, o diagnóstico negativo para *M. bovis* no isolamento e/ou PCR pode estar associado à eliminação do bacilo pelo sistema imune do hospedeiro (animal reagente não infectado), ao limite de sensibilidade do ensaio ou especificidade do TCC (animais não infectados) (Rodriguez, Fissanoti *et al.*, 1999; Pollock e Neill, 2002; Wedlock, Skinner *et al.*, 2002; Taylor, Worth *et al.*, 2007; Liebana, Johnson *et al.*, 2008). No exame anatomopatológico verificamos que aproximadamente 5% (17/349) dos bovinos *M. bovis*-negativos apresentaram patologia grave e 8% (29/349) não apresentam lesões da doença. Nos casos em que as lesões de bTB não são observadas (fase inicial da infecção) a sensibilidade do isolamento e PCR para a detecção de bovinos infectados é ínfima (Norby, Bartlett *et al.*, 2004). Entretanto, na análise de amostras de tecido lesional de animais PPD-positivos, a sensibilidade do isolamento e da PCR podem chegar a 80-90% e 50%, respectivamente (Taylor, Worth *et al.*, 2007; Medeiros, Marassi *et al.*, 2011). Assim, considerando necessidade de erradicação da bTB dos rebanhos bovinos (Oie, 2011; 2012a) e o risco que animais doentes representam para a manutenção do *M. bovis* no ambiente (Fine, Bolin *et al.*), estes achados indicam a necessidade urgente de estudos voltados a descoberta de novos testes diagnósticos mais específicos e sensíveis.

É comumente aceito que *M. bovis* infecta primariamente macrófagos, onde é capaz de sobreviver, replicar e se disseminar para diferentes sítios anatômicos (Cosma, Humbert *et al.*, 2004; Volkman, Clay *et al.*, 2004; Russell, 2007). Após o estabelecimento da infecção as lesões podem regredir (animal controla a infecção), estabilizar (tuberculose latente) ou progredir (tuberculose progressiva) (Corner, 1994; Rhodes, Buddle *et al.*, 2000; Cousins, 2001; Buddle, B., Livingstone, P. *et al.*, 2009). Na tuberculose progressiva, a doença pode assumir forma miliar (que ocorre de maneira precoce e abrupta) ou protraída (forma mais comum, de evolução lenta, que esta associada a uma fase mais tardia da doença) (Corner, 1994; Rhodes, Buddle *et al.*, 2000; Cassidy, 2006; Palmer, Waters *et al.*, 2007). Em ambas as situações, o bacilo dissemina-se para diferentes órgãos/tecidos através da circulação linfática ou sanguínea (Corner, 1994; Rhodes, Buddle *et al.*, 2000; Wangoo, Johnson *et al.*, 2005; Cassidy, 2006; Palmer, Waters *et al.*, 2007). Assim, a progressão da doença micobacteriana e a sobrevivência do hospedeiro parecem depender de sua capacidade de limitar o crescimento das micobactérias através de uma resposta granulomatosa eficiente (Wedlock, Aldwell *et al.*, 1999; Cosma, Humbert *et al.*, 2004; Volkman, Clay *et al.*, 2004; Ulrichs e Kaufmann, 2006; Russell, 2007; Egen, Rothfuchs *et al.*, 2011). No caso da infecção experimental de bovinos com *M. bovis*, diferentes estágios de desenvolvimento dos granulomas foram observados, sendo estes associados com a progressão da doença (Wangoo, Johnson *et al.*, 2005; Palmer, Waters *et al.*, 2007), indicando que a estrutura do granuloma tuberculoso é dinâmica. Nossos resultados confirmam e dão suporte a estudos prévios (Wangoo, Johnson *et al.*, 2005; Palmer, Waters *et al.*, 2007), que sugerem um papel importante da resposta granulomatosa contra *M. bovis* durante a infecção natural. Neste contexto, observamos que aproximadamente 66% dos animais do grupo assintomático, AS, apresentaram uma forma disseminada da infecção (**Figura 11 A**), onde os níveis de disseminação anatômica da infecção/lesões está correlacionada com a carga micobacteriana no tecido, bem como com a gravidade da patologia, sugerindo a existência de uma resposta imune dinâmica do hospedeiro durante a infecção natural. Em acordo com nossos dados Ameni e colaboradores observaram patologia grave e intensa disseminação de lesões em 82% dos animais analisados na Etiópia, sugerindo uma doença ativa, grave e progressiva nestes animais (Ameni, Aseffa, Engers *et al.*, 2007). Assim, estes parâmetros poderiam ser utilizados como biomarcadores preditivos da progressão e atividade

da infecção, auxiliando os programas de vigilância e controle da bTB visto que, quanto maior a carga infecciosa nos animais, maior é a persistência do *M. bovis* no ecossistema (Fine, Bolin *et al.*, ; Wedlock, Skinner *et al.*, 2002).

A suscetibilidade à bTB é maior em bovinos mais velhos, que desenvolvem frequentemente formas progressivas e ativas da doença (Phillips, Foster *et al.*, 2002). A variação de resistência genética à infecção por *M. bovis* entre famílias e espécies de bovídeos foi demonstrada por vários autores, embora não seja ainda bemcompreendida, principalmente sob condições de infecção natural e desafio infeccioso variável (Phillips, Foster *et al.*, 2002; Brotherstone, White *et al.*, 2009; Driscoll, Hoffman *et al.*, 2011). Em nossa coorte, não observamos diferença significativa na gravidade da patologia ou carga micobacteriana entre raças, faixa etária, sexo e localização geográfica (dados não mostrados). Em contraste com nossos achados, diferenças na gravidade da patologia entre rebanhos de raças leiteiras foram demonstrados na Irlanda, Inglaterra e Etiópia (Ameni, Aseffa, Engers *et al.*, 2007; Bermingham, More *et al.*, 2009; Driscoll, Hoffman *et al.*, 2011). Esta diferença possivelmente está associada a diferenças nas condições de criação, manejo e fatores de transmissão do *M. bovis* que influenciam diretamente na dinâmica da infecção (Phillips, Foster *et al.*, 2002; Brotherstone, White *et al.*, 2009).

Com base em dados de infecção experimental, o número e extensão das lesões de bTB permite uma inferência da progressão e atividade da doença (Vordermeier, Chambers *et al.*, 2002; Wangoo, Johnson *et al.*, 2005; Palmer, Waters *et al.*, 2007). Durante o exame *post mortem*, foi possível observar em um mesmo sítio anatómico granulomas com diferentes tamanhos ou mesmo confluentes. Na análise macroscópica, as lesões apresentavam necrose caseosa, e com frequência mineralização. Com base em trabalhos anteriores, a extensão, encapsulamento e presença de calcificação estão associadas à atividade da infecção (Corner, 1994; Rhodes, Buddle *et al.*, 2000; Wangoo, Johnson *et al.*, 2005; Cassidy, 2006; Palmer, Waters *et al.*, 2007). Observamos de forma consistente que granulomas pulmonares maduros, bem delimitados e com intensa calcificação albergam menor número de bactérias viáveis e, portanto, podem, representar uma fase avançada do controle da infecção. Neste contexto, a necrose de caseificação está associada à diminuição da vascularização/hipoxia, aumento do metabolismo lipídico e redução nos níveis de IFN- γ intragranuloma (Rhodes, Buddle *et al.*, 2000; Cassidy, 2006; Sakamoto, 2012). Menores

níveis de IFN- γ possivelmente refletem uma diminuição do estímulo antigênico às células T (CD4⁺;CD8⁺; T γ δ) exercido pela multiplicação micobacteriana, sugerindo o controle permanentemente ou provisório do crescimento bacteriano (Cassidy, 2006; Sakamoto, 2012). Além disso, a alcalinização do microambiente da lesão diminui a solubilidade do carbonato de Cálcio (CaCO₃) que se deposita na matriz proteica (material necrótico) e colágeno formando áreas de mineralização distrófica, que em grandes proporções está associada a uma condição de estabilização ou resolução da lesão (Collins e Grange, 1983).

A deposição de tecido conjuntivo, visando o encapsulamento e delimitação da lesão granulomatosa tuberculosa, limita a disseminação das micobactérias e diminui o dano tecidual, desempenhando um papel crítico no controle da proliferação micobacteriana por representar uma estrutura de aprisionamento dos bacilos no interior das lesões (Pollock e Neill, 2002; Volkman, Clay *et al.*, 2004; Russell, 2007; Gil, Diaz *et al.*, 2010). Com o intuito de investigar melhor o desenvolvimento das lesões de bTB em bovinos naturalmente infectados, primeiramente aplicamos a metodologia de análise histológica descrita por Wangoo e colaboradores, que realizaram um estudo descritivo da resposta granulomatosa em linfonodos de bovinos experimentalmente infectados com *M. bovis* (Wangoo, Johnson *et al.*, 2005). Com a aplicação desta metodologia a maioria das lesões nos diferentes órgãos/tecidos foi classificada como crônica (70-100%), isto é, estágio IV **Tabela 4**. Devido a resistência dos bovinos à infecção pelo *M. bovis* (Thoen, Lobue *et al.*, 2006; Brotherstone, White *et al.*, 2009; Driscoll, Hoffman *et al.*, 2011), é possível que durante a infecção natural a maioria das lesões de bTB encontradas estejam em estágio avançado de desenvolvimento. Curiosamente, verificamos que apesar do estágio crônico das lesões, a espessura do encapsulamento pode ser utilizada como um marcador de desenvolvimento das lesões primárias que permite classificar os granulomas em três grupos principais (I-III) de acordo com a espessura e densidade da cápsula que envolve ou delimita a reação granulomatosa tuberculosa (**Figura 12**). A quantidade de tecido conjuntivo em torno do granuloma (encapsulamento fino e pouco denso – encapsulamento fibroso espesso e denso) está negativamente correlacionada com o número de UFC de *M. bovis* ou BAAR, sugerindo um papel crucial do encapsulamento do granuloma como uma resposta do hospedeiro para o controle da proliferação micobacteriana durante a infecção natural. Em contraste, lesões tuberculosas no linfonodo retrofaríngeo de bovinos experimentalmente infectados com *M. bovis*

apresentaram maior número de BAAR em estágios de desenvolvimento mais crônico, com maiores níveis de encapsulamento e mineralização (Wangoo, Johnson *et al.*, 2005; Palmer, Waters *et al.*, 2007). Estes dados estão em contraste direto com os resultados obtidos no presente estudo, que pode ser explicado pela diferença nos modelos de infecção, isto é, infecção experimental comparada à infecção natural, sugerindo que o microambiente intragranuloma é dinâmico durante a progressão da doença e a resposta do remodelamento tecidual à infecção por *M. bovis* pode depender do sítio anatômico, via de infecção e desafio infeccioso. Adicionalmente, realizamos a análise quantitativa da carga de micobactérias viáveis no tecido (intragranuloma), que em comparação com número de BAAR reflete de forma mais representativa a carga de *M. bovis* viável presente nas lesões de bTB. O encapsulamento possivelmente pode ser induzido pela carga micobacteriana nos granulomas. Além disso, animais com lesões mais densamente encapsuladas apresentaram menor disseminação da infecção, sugerindo que a indução do encapsulamento com tecido conjuntivo maduro (estruturado e denso) delimita o granuloma e participa ativamente como uma resposta do hospedeiro para o controle do *M. bovis* durante a infecção natural.

Na análise histopatológica, a maioria dos granulomas pulmonares investigados no nossa coorte grupo de animais não co-infetados (NR) apresentaram-se encapsulados com múltiplas áreas intragranulomatosas de necrose de caseificação com presença de mineralização distrófica central. De acordo com os critérios estabelecidos para a análise da fase de desenvolvimento do granuloma no tecido linfóide durante a infecção experimental, os granulomas analisados neste estudo podem ser classificados como lesões crônicas (fase III / IV) (Wangoo, Johnson *et al.*, 2005; Palmer, Waters *et al.*, 2007). Além disso, a análise histomorfológica dos granulomas pulmonares revelou diferenças significativas nas populações celulares que compõem a resposta granulomatosa (**Figura 13**). Consistente com estes resultados, o processo de maturação do granuloma envolve a migração dos fagócitos e linfócitos para o local da inflamação em resposta a persistentes estímulos micobacterianos (Cosma, Humbert *et al.*, 2004; Ulrichs e Kaufmann, 2006; Russell, 2007; Gil, Diaz *et al.*, 2010; Egen, Rothfuchs *et al.*, 2011). Uma resposta anti-micobacteriana efetiva do hospedeiro depende principalmente da resposta imune celular, controlada por citocinas produzidas por células T antígeno-específicas, como IFN- γ (Cooper, Dalton *et al.*, 1993; Boom, 1996; Flynn e Chan, 2001;

Vordermeier, Chambers *et al.*, 2002; Welsh, Cunningham *et al.*, 2005). Embora o papel protetor da resposta imune mediada por células seja desconhecido em bovinos naturalmente infectados pelo *M. bovis*, no presente estudo observou-se uma correlação significativa entre o número de neutrófilos ou de células gigantes multinucleadas do tipo Langhans e a carga micobacteriana intragranuloma. O infiltrado neutrofílico pode ser observado particularmente nas fases iniciais da infecção (Wangoo, Johnson *et al.*, 2005; Palmer, Waters *et al.*, 2007) e pode ser importante para a formação dos granulomas. Além disso, têm sido sugerido que os neutrófilos podem desempenhar um papel regulador anti-micobacteriano (Seiler, Aichele *et al.*, 2003; Feng, Kaviratne *et al.*, 2006). Também observamos correlação positiva entre o número de neutrófilos e o número de UFC, sugerindo que a carga bacilar ou proliferação do *M. bovis* induz o recrutamento de neutrófilos e/ou manutenção desta população celular no interior do granuloma. Consistente com estes dados, Taylor e colaboradores demonstraram que camundongos infectados com *M. tuberculosis*, quando repetidamente estimulados com antígenos micobacterianos, apresentavam intenso infiltrado de neutrófilos (Taylor, Turner *et al.*, 2003), sugerindo que o fluxo dos neutrófilos pode ser modulado por estímulos micobacterinos. Em contraste, os neutrófilos também podem desempenhar potencialmente um papel no favorecimento do crescimento de micobactérias no interior do granuloma durante a infecção natural (Eruslanov, Lyadova *et al.*, 2005; Keller, Hoffmann *et al.*, 2006). A correlação negativa entre o número de células gigantes multinucleadas tipo Langhans e o número de UFC de *M. bovis* intragranuloma sugere, como esperado, que macrófagos multinucleados ativados contribuem para o controle da bTB. Dados provenientes de modelos experimentais têm demonstrado que células gigantes multinucleadas tipo Langhans, podem ser encontradas em todos os estágios de desenvolvimento do granuloma no linfonodo (Wangoo, Johnson *et al.*, 2005; Palmer, Waters *et al.*, 2007). Em conjunto, nossos resultados indicam que granulomas induzidos durante a infecção pelo *M. bovis* nos pulmões são lesões dinâmicas em que as populações de células mudam ao longo do curso da doença, criando um microambiente diversificado e complexo durante a infecção. Além disso, fornecem informações relevantes sobre possíveis biomarcadores de gravidade da doença durante a infecção natural por este importante patógeno para o rebanho bovino mundial.

A compreensão da fisiopatologia da resposta granulomatosa tuberculosa é fundamental para o desenvolvimento de novos modelos

vacinais e fármacos para o tratamento da tuberculose (Sakamoto, ; Waters, Palmer *et al.*). Neste contexto, diferentes modelos experimentais tem sido implementados e testados para entender a evolução e progressão da tuberculose (Endsley, Hogg *et al.*, 2007; Ramakrishnan, 2012; Sakamoto, 2012). No modelo murino apesar de ser o mais frequentemente utilizado para estudo dos mecanismos de defesa antimicobacteriana, quando infectado através das vias aéreas por *M. bovis* ou *M. tuberculosis*, ocorre a formação de lesões pulmonares granulomatosas sem a presença de necrose caseosa e encapsulamento com características distintas dos granulomas típicos observados em grandes animais (suínos, bovinos, equinos e humanos) (Tsai, Chakravarty *et al.*, 2006; Huynh, Joshi *et al.*, 2011). Em grandes animais, a estrutura e subdivisão do parênquima pulmonar em septos (1-2 cm³), bem como elementos da resposta imune parecem desempenhar um papel fundamental na formação da estrutura clássica do granuloma (Tsai, Chakravarty *et al.*, 2006; Huynh, Joshi *et al.*, 2011; Waters, Palmer *et al.*, 2011). Adicionalmente, a grande quantidade de tecido conjuntivo intra/interlobular que une os grandes vasos e brônquios à superfície pleural e a camada de tecido conjuntivo que reveste os pulmões com a superfície mesotelial voltada para o espaço pleural podem servir de base para a circunscrição das lesões e limitar a expansão da resposta granulomatosa, dando o formato estrutural e anatômico clássico ao granuloma (Plopper, Mariassy *et al.*, 1983). Estas estruturas não estão presentes em espécies de animais menores como ratos, cobaias, coelhos ou macacos, limitando o estudo de determinados elementos da fisiopatologia do granuloma nestes modelos experimentais (Plopper, Mariassy *et al.*, 1983; Tsai, Chakravarty *et al.*, 2006). Assim, o padrão clássico de resposta granulomatosa tuberculosa e remodelamento tecidual apresentados neste trabalho pode representar uma oportunidade de estudo e compreensão dos elementos da imunopatogênese da tuberculose humana e animal. Além disso, como os granulomas não estão restritos a infecções micobacterianas, o conhecimento acumulado sobre estas estruturas de defesa podem ser úteis para estudar outras doenças infecciosas e até mesmo doenças inflamatórias não-infecciosas.

A estrutura da resposta granulomatosa tuberculosa e a evolução da doença estão associadas à capacidade do hospedeiro responder a infecção pelo *M. bovis* (Phillips, Foster *et al.*, 2002; Pollock e Neill, 2002; Welsh, Cunningham *et al.*, 2005). Neste contexto, as co-infecções podem contribuir para diminuir intensidade da resposta imune

antimicobacteriana (Charleston, Hope *et al.*, 2001; Phillips, Foster *et al.*, 2002; De La Rúa-Domenech, Goodchild *et al.*, 2006) como observado durante a infecção concomitante pelo *M. bovis* e *M. avium* (Hope, Thom *et al.*, 2005), vírus da Diarreia Viral Bovina (BVD) (Charleston, Hope *et al.*, 2001) ou *Fasciola hepatica* (Karlson, 1962 ; Hughes, Ball *et al.*, 2005; Flynn, Mannion *et al.*, 2007; Claridge, Diggle *et al.*, 2012). Neste estudo, nós realizamos uma análise sistemática de elementos correlatos da defesa anti-micobacteriana em 17 bovinos, durante a infecção natural concomitante pelo BLV e *M. bovis* (grupo de animais positivos para o vírus da leucose enzoótica bovina, BLV). Os animais coinfectados pelo BLV apresentaram bTB mais grave (**Figura 14**), com maior de disseminação das lesões, gravidade da patologia e carga micobacteriana viável intragranuloma, quando comparados com os animais não coinfectados (grupo de animais não coinfectados, NR). Estes dados indicam que a co-infecção pelo BLV deve ser considerada um fator de risco adicional para a bTB, pois influencia a capacidade do hospedeiro limitar o crescimento micobacteriano e conter a disseminação da infecção nos tecidos, favorecendo uma infecção progressiva. Consistente com estes resultados, Emanuelson e colaboradores (Emanuelson, Scherling *et al.*, 1992; Oie, 2012b) observaram associação entre a infecção pelo BLV e o aumento da incidência de outras infecções como enterites, mastites e pneumonias em rebanhos de bovinos leiteiros, entretanto, os mecanismos associados a maior suscetibilidade, dos animais BLV-positivos à outras infecções não foram descritos. Do ponto de vista prático, estes bovinos com bTB grave e maior carga micobacteriana viável, representam um risco potencial para transmissão do agente (Cassidy, 2006; Berg, Firdessa *et al.*, 2009; Ameni, Vordermeier *et al.*, 2011) entre bovinos, rebanhos e possíveis hospedeiros selvagens.

Um granuloma organizado (típico) é estruturado por macrófagos infectados, células epitelióides, macrófagos espumosos, células gigantes multinucleadas do tipo Langhans, com um intenso recrutamento periférico de linfócitos e deposição de cápsula fibrosa (Palmer, Waters *et al.*, 2007; Ramakrishnan, 2012; Sakamoto, 2012). Neste estudo, mostramos que os animais coinfectados pelo BLV apresentam uma resposta granulomatosa tuberculosa em que a população de linfócitos, principalmente no ambiente intragranulomatoso, é diminuída e o número de neutrófilos aumentado (**Figura 14**), sugerindo uma mudança no perfil de recrutamento de células para o granuloma e possivelmente no papel desta estrutura para o controle e contenção da infecção. Além

disso, observamos também um menor nível de encapsulamento dos granulomas pulmonares primários. A população de linfócitos T e B representam cerca de 50-60% do total de leucócitos do granuloma, sendo 15-50% linfócitos T (cerca de 60-70% das células T CD4 (Th1, Th17 e Treg), 15-30% células T CD8 α/β , 2% células T $\gamma\delta$ e células NK) e 1-10% linfócitos B (Wangoo, Johnson *et al.*, 2005; Tsai, Chakravarty *et al.*, 2006; Palmer, Waters *et al.*, 2007). Assim sendo, a diminuição no recrutamento/fluxo de linfócitos para o granuloma pode alterar a homeostase da resposta antimicobacteriana, visto que os linfócitos CD4 (Th1/Th17), T CD8 α/β e T $\gamma\delta$ (principais fontes de TNF e IFN- γ) (Cooper, Dalton *et al.*, 1993; Wangoo, Johnson *et al.*, 2005; Palmer, Waters *et al.*, 2007; Plattner, Huffman *et al.*, 2012) e as células B (Tsai, Chakravarty *et al.*, 2006) participam ativamente dos mecanismos de formação, organização e função do granuloma. Ao mesmo tempo, o maior fluxo de neutrófilos para o interior da resposta granulomatosa crônica em animais com bTB mais grave e com maior carga micobacteriana sugere que o recrutamento seja modulado por mecanismos ligados ao crescimento micobacteriano no tecido, podendo refletir tanto um mecanismo antimicobacteriano compensatório (Seiler, Aichele *et al.*, 2003; Feng, Kaviratne *et al.*, 2006) quanto o favorecimento a infecção (Eruslanov, Lyadova *et al.*, 2005; Keller, Hoffmann *et al.*, 2006). Coletivamente, nossos dados indicam que a homeostase do fluxo ou recrutamento de células para o ambiente da resposta granulomatosa tuberculosa nos animais BLV-positivos está afetada e a diminuição da população de linfócitos compromete a resposta imune adaptativa e possivelmente as propriedades de controle e/ou contenção micobacteriana, tornando os bovinos mais suscetíveis à infecção pelo *M. bovis*.

A manutenção da estrutura do granuloma é mediada por uma resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) contra moléculas imunoestimulatórias do *M. bovis* (McCune, Feldmann *et al.*, 1966; Palmer, Waters *et al.*, 2007; Ramakrishnan, 2012; Sakamoto, 2012). Vários patógenos de bovinos apresentam propriedades imunomodulatórias (Charleston, Hope *et al.*, 2001; Flynn, Mannion *et al.*, 2007). Trabalhos anteriores demonstram que a co-infecção pela *Fasciola hepática/M. bovis* afeta o equilíbrio entre a resposta Th1/Th2, mantendo os níveis de IL-4 (citocina anti-inflamatória) (Flynn, Mannion *et al.*, 2007; Claridge, Diggle *et al.*, 2012), comprometendo a intensidade e atividade da resposta imune celular efetora e a sensibilidade dos testes de diagnóstico dependentes de IFN- γ . De forma

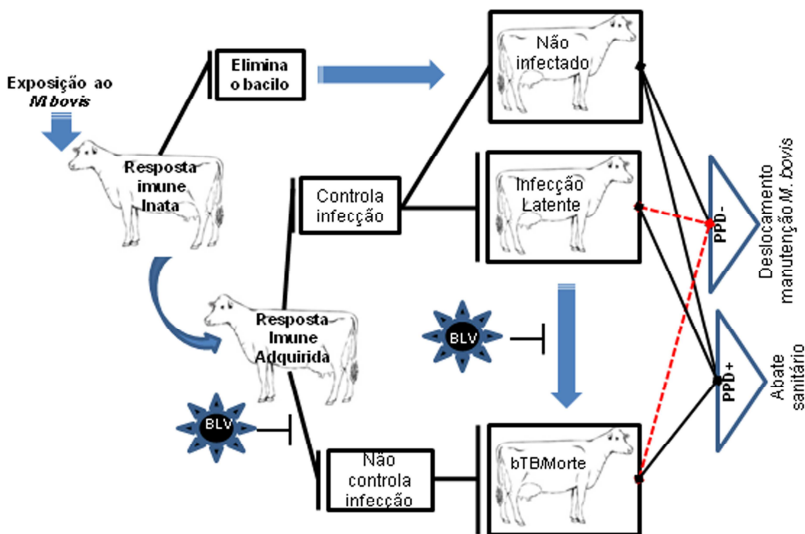
semelhante, Charleston e colaboradores (Charleston, Hope *et al.*, 2001), demonstraram que a infecção persistente por uma cepa não citopática do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) suprime fortemente a resposta proliferativa de linfócitos e a produção IFN- γ nas fases iniciais da infecção. Surpreendentemente, a análise da DTH em bovinos com LP-LBV mostrou que estes animais apresentam uma reação do tipo DTH significativamente menor que animais LBV-negativos (**Figura 15 A**). Estes resultados foram confirmados através da análise histomorfológica da DTH (**Figura 15 B**), sugerindo que a infecção pelo BLV compromete a resposta antimicobacteriana, assim como, o resultado positivo nos testes diagnósticos (TCC e quantificação de IFN- γ), ambos dependentes de uma resposta antígeno-específica robusta (Welsh, Cunningham *et al.*, 2005; De La Rua-Domenech, Goodchild *et al.*, 2006). Adicionalmente, estas evidências podem ter importantes implicações sobre os programas de controle da bTB, visto que 55% (10/18) dos animais seria considerada negativa no TCC (Oie, 2011). Sob estas circunstâncias é plausível que animais com resultado inconclusivo ou fraco positivo para *M. bovis* no TCC, sob as condições de co-infecção pelo BLV (LP-BLV), podem apresentar reação negativa, diminuindo as chances dos casos de bTB serem diagnosticados. A diminuição da sensibilidade do TCC (27-38%) também foi reportada durante a co-infecção natural (Flynn, Mannion *et al.*, 2007; Claridge, Diggle *et al.*, 2012) e infecção experimental concomitante por *Fasciola hepatica* e *M. bovis* (10^7 CFU de *M. bovis* – BCG) (Flynn, Mannion *et al.*, 2007). Estes dados demonstram a importância das co-infecções para a resposta antimicobacteriana e capacidade preditiva dos testes diagnósticos (Claridge, Diggle *et al.*, 2012).

A infecção pelo BLV aumenta a expressão de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade tipo II (MHC II) e receptores para IL-2 (IL-2R), afetando a resposta dos linfócitos B e T (Stone, Hof *et al.*, 1995; Stone, Norton *et al.*, 2000; Hughes, Ball *et al.*, 2005). Adicionalmente, Erskine e colaboradores demonstraram que bovinos BLV-positivos apresentam PBMCs com menor proporção de linfócitos T e maior proporção de células B quando comparados com animais BLV-negativos (Erskine, Corl *et al.*, 2011). Além disso, observaram menor proliferação de linfócitos T em animais LP-BLV quando estimulados com concanavalina (ConA) (Hughes, Ball *et al.*, 2005). De forma semelhante, nossos resultados mostram que os PBMCs provenientes dos animais LP-BLV apresentem menor expansão celular quando estimuladas com ConA (**Figura 16**). Em conjunto estes dados

sugerem que bovinos BLV-positivos apresentam alterações nas proporções de linfócitos (B e T) e mecanismos de proliferação, comprometendo a competência imunológica e possivelmente a resposta antimicobacteriana dos animais (Stone, Norton *et al.*, 2000; Hughes, Ball *et al.*, 2005). Os mecanismos pelos quais os linfócitos desregulados durante a infecção pelo BLV modificam a resposta de bovinos contra *M. bovis* merecem uma investigação detalhada. É possível que os linfócitos T de animais BLV-positivos apresentem uma maior taxa de morte durante a ativação com antígenos de *M. bovis*.

O estudo da interação entre BLV e *M. bovis* durante a infecção natural, além de ser pioneiro, proporciona evidências diretas de que a co-infecção pelo BLV está associado com uma doença mais grave e maior suscetibilidade dos bovinos a bTB, aumentando o risco de transmissão e disseminação do *M. bovis*. Além disso, nos casos de LP-BLV, a redução ou supressão da resposta antígeno específica pode reduzir a eficácia do TCC e favorecer a permanência de animais *M. bovis*-positivos nos rebanhos (**Figura 17**). Esta condição possui graves implicações para os programas de controle/erradicação da bTB, uma vez que por se tratar de um agente altamente prevalente, poderia explicar em parte a continuidade da disseminação da infecção do *M. bovis*, bem como o fracasso dos programas de vigilância e erradicação da bTB em muitas regiões/países.

Figura 17 - Diagrama mostrando os eventos prováveis durante a exposição do bovino ao *M. bovis*. Após exposição ao *M. bovis*, este pode ser eliminado pelos mecanismos da imunidade inata ou induzir uma resposta imune adaptativa. Dependendo do resultado final da interação patógeno-hospedeiro pode ocorrer a eliminação da infecção, desenvolvimento de uma infecção latente ou quadro de tuberculose clássica. Bovinos com infecção latente a medida que são submetidos a condições imunossupressoras (ex. infecção pelo BLV) podem desenvolver uma infecção ativa. Sob diversas situação, como por exemplo imunossupressão os bovinos podem não responder adequadamente aos testes convencionais de diagnóstico como TCC/PPD. (---) fatores interferentes (ex. infecção por BLV). (⊥) possível interferência da coinfeções por BLV. BLV, vírus da leucose bovina. TCC/PPD, teste tuberculínico ou medida de interferon.



Fonte: o autor.

CONCLUSÕES

Resumo dos principais avanços no estudo da imunopatogênese da bTB alcançados com a realização deste estudo:

- ✓ A disseminação anatômica das lesões de bTB esta correlacionado com a gravidade da infecção e atividade da doença;
- ✓ O encapsulamento do granuloma pode ser um importante mecanismo de resposta do hospedeiro para conter o crescimento e/ou disseminação do *M. bovis* nos tecidos.
- ✓ Os neutrófilos e células gigantes multinucleadas podem desempenhar um papel na regulação do crescimento do *M. bovis* durante a infecção natural em bovinos;
- ✓ Durante a infecção pelo BLV os animais apresentam tuberculose mais grave e redução na resposta antígeno-específica *in vivo*.

Em conjunto, os dados apresentados neste estudo revelam novos elementos da resposta imunopatológica e fisiopatológica do hospedeiro durante a infecção natural pelo *M. bovis* que poderiam ser utilizadas como uma fonte potencial de biomarcadores para orientar o estudo de novos modelos vacinais/candidatos a moléculas adjuvantes, bem como, métodos diagnósticos mais eficientes. Além disso, podem contribuir de forma efetiva para a implantação de estratégias racionais de vigilância e controle da tuberculose bovina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, A. M. et al. Type VII secretion--mycobacteria show the way. **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 11, p. 883-91, Nov 2007.

ALDERWICK, L. J. et al. Structure, function and biosynthesis of the *Mycobacterium tuberculosis* cell wall: arabinogalactan and lipoarabinomannan assembly with a view to discovering new drug targets. **Biochem Soc Trans**, v. 35, n. Pt 5, p. 1325-8, Nov 2007.

ALEXANDER, K. et al. *Mycobacterium tuberculosis*: an emerging disease of free-ranging wildlife. **Emerg Infect Dis**, v. 8, n. 6, p. 598-601, Jun 2002.

ALMEIDA, M. A. Z. Tuberculose bovina. In: (Ed.). **Manual de Zoonoses**. 1. Florianópolis: CRMV, v.1, 2009. p.162.

AMENI, G. et al. High prevalence and increased severity of pathology of bovine tuberculosis in Holsteins compared to zebu breeds under field cattle husbandry in central Ethiopia. **Clin Vaccine Immunol**, v. 14, n. 10, p. 1356-61, Oct 2007.

AMENI, G. et al. Effect of skin testing and segregation on the prevalence of bovine tuberculosis, and molecular typing of *Mycobacterium bovis*, in Ethiopia. **Vet Rec**, v. 161, n. 23, p. 782-6, Dec 8 2007.

AMENI, G.; ERKIHUN, A. Bovine tuberculosis on small-scale dairy farms in Adama Town, central Ethiopia, and farmer awareness of the disease. **Rev Sci Tech**, v. 26, n. 3, p. 711-9, Dec 2007.

AMENI, G. et al. *Mycobacterium tuberculosis* infection in grazing cattle in central Ethiopia. **Vet J**, v. 188, n. 3, p. 359-61, Jun 2011.

AMILLS, M. et al. Cytokine mRNA expression in B cells from bovine leukemia virus-infected cattle with persistent lymphocytosis. **Cytokine**, v. 28, n. 1, p. 25-8, Oct 7 2004.

ARAINGA, M.; TAKEDA, E.; AIDA, Y. Identification of bovine leukemia virus tax function associated with host cell transcription,

signaling, stress response and immune response pathway by microarray-based gene expression analysis. **BMC Genomics**, v. 13, p. 121,

AREND, S. M. et al. Detection of active tuberculosis infection by T cell responses to early-secreted antigenic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10. **J Infect Dis**, v. 181, n. 5, p. 1850-4, May 2000.

BAFICA, A. et al. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. **J Exp Med**, v. 202, n. 12, p. 1715-24, Dec 19 2005.

BERG, S. et al. The burden of mycobacterial disease in ethiopian cattle: implications for public health. **PLoS One**, v. 4, n. 4, p. e5068, 2009.

BERMINGHAM, M. L. et al. Genetics of tuberculosis in Irish Holstein-Friesian dairy herds. **J Dairy Sci**, v. 92, n. 7, p. 3447-56, Jul 2009.

BERTHET, F. X. et al. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). **Microbiology**, v. 144 (Pt 11), p. 3195-203, Nov 1998.

BHOWRUTH, V. et al. Tuberculosis: a balanced diet of lipids and carbohydrates. **Biochem Soc Trans**, v. 36, n. Pt 4, p. 555-65, Aug 2008.

BOOM, W. H. The role of T-cell subsets in *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Infect Agents Dis**, v. 5, n. 2, p. 73-81, Mar 1996.

BRASIL. **Instrução Normativa Ministerial n° 02 de 2001 - Institui o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose bovina e bubalina. IN/MAPA/SDA n° 02/2001** 2001.

BRASIL. **Instrução Normativa SDA n° 06 de 2004 - Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose bovina e bubalina. IN/MAPA/SDA n° 06/2004** 2004.

BRENNAN, P. J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 83, n. 1-3, p. 91-7, 2003.

BRENNAN, P. J.; NIKAIDO, H. The envelope of mycobacteria. **Annu Rev Biochem**, v. 64, p. 29-63, 1995.

BROSCH, R. et al. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 6, p. 3684-9, Mar 19 2002.

BROTHERSTONE, S. et al. Evidence of genetic resistance of cattle to infection with Mycobacterium bovis. **J Dairy Sci**, v. 93, n. 3, p. 1234-42, Mar 2009.

BUDDLE, B.; LIVINGSTONE, P.; DE LISLE, G. Advances in ante-mortem diagnosis of tuberculosis in cattle. **N Z Vet J**, v. 57, n. 4, p. 173-80, Aug 2009.

BUDDLE, B. M.; LIVINGSTONE, P. G.; DE LISLE, G. W. Advances in ante-mortem diagnosis of tuberculosis in cattle. **N Z Vet J**, v. 57, n. 4, p. 173-80, Aug 2009.

BUDDLE, B. M. et al. Use of ESAT-6 in the interferon-gamma test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing. **Vet Microbiol**, v. 80, n. 1, p. 37-46, May 3 2001.

BUDDLE, B. M. et al. Identification of immune response correlates for protection against bovine tuberculosis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 108, n. 1-2, p. 45-51, Oct 18 2005.

BURMEISTER, T. et al. No genetic evidence for involvement of Deltaretroviruses in adult patients with precursor and mature T-cell neoplasms. **Retrovirology**, v. 4, p. 11, 2007.

BURNY, A. et al. Bovine leukemia virus, a versatile agent with various pathogenic effects in various animal species. **Cancer Res**, v. 45, n. 9 Suppl, p. 4578s-4582s, Sep 1985.

BURNY, A. et al. Bovine leukemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. **Adv Vet Sci Comp Med**, v. 32, p. 149-70, 1988.

CALATTINI, S. et al. Detection of EBV genomes in plasmablasts/plasma cells and non-B cells in the blood of most patients with EBV lymphoproliferative disorders by using Immuno-FISH. **Blood**, v. 116, n. 22, p. 4546-59, Nov 25

CAMACHO, L. R. et al. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. **Mol Microbiol**, v. 34, n. 2, p. 257-67, Oct 1999.

CASSIDY, J. P. The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. **Vet Microbiol**, v. 112, n. 2-4, p. 151-61, Feb 25 2006.

CASSIDY, J. P. et al. Lymphocyte subtypes in experimentally induced early-stage bovine tuberculous lesions. **J Comp Pathol**, v. 124, n. 1, p. 46-51, Jan 2001.

CASTRO, R. S. et al. Prevalence of antibodies to selected viruses in bovine embryo donors and recipients from Brazil, and its implications in international embryo trade. **Trop Anim Health Prod**, v. 24, n. 3, p. 173-6, Aug 1992.

CHARLESTON, B. et al. Masking of two in vitro immunological assays for *Mycobacterium bovis* (BCG) in calves acutely infected with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus. **Vet Rec**, v. 149, n. 16, p. 481-4, Oct 20 2001.

CHEVALLIER, N. et al. Bovine leukemia virus-induced lymphocytosis and increased cell survival mainly involve the CD11b+ B-lymphocyte subset in sheep. **J Virol**, v. 72, n. 5, p. 4413-20, May 1998.

CLARIDGE, J. et al. *Fasciola hepatica* is associated with the failure to detect bovine tuberculosis in dairy cattle. **Nat Commun**, v. 3, p. 853, 2012.

CLEAVELAND, S. et al. *Mycobacterium bovis* in rural Tanzania: risk factors for infection in human and cattle populations. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 87, n. 1, p. 30-43, Jan 2007.

COBO, J. et al. Risk factors for nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* among HIV-infected patients. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 5, n. 5, p. 413-8, May 2001.

COLE, J. R., JR.; SULZER, C. R.; PURSELL, A. R. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. **Appl Microbiol**, v. 25, n. 6, p. 976-80, Jun 1973.

COLEMAN, J. D.; COLEMAN, M. C.; WARBURTON, B. Trends in the incidence of tuberculosis in possums and livestock, associated with differing control intensities applied to possum populations. **N Z Vet J**, v. 54, n. 2, p. 52-60, Apr 2006.

COLLINS, C. H.; GRANGE, J. M. The bovine tubercle bacillus. **J Appl Bacteriol**, v. 55, n. 1, p. 13-29, Aug 1983.

COLLINS, D. M. Advances in molecular diagnostics for *Mycobacterium bovis*. **Vet Microbiol**, v. 151, n. 1-2, p. 2-7, 2011 2011.

COOPER, A. M. et al. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. **J Exp Med**, v. 178, n. 6, p. 2243-7, Dec 1 1993.

CORNER, L. A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Vet Microbiol**, v. 40, n. 1-2, p. 53-63, May 1994.

COSIVI, O. et al. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. **Emerg Infect Dis**, v. 4, n. 1, p. 59-70, 1998.

COSIVI, O. et al. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. **Emerg Infect Dis**, v. 4, n. 1, p. 59-70, Jan-Mar 1998.

COSIVI, O. et al. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans, with particular reference to Africa. **Rev Sci Tech**, v. 14, n. 3, p. 733-46, Sep 1995.

COSMA, C. L.; HUMBERT, O.; RAMAKRISHNAN, L. Superinfecting mycobacteria home to established tuberculous granulomas. **Nat Immunol**, v. 5, n. 8, p. 828-35, Aug 2004.

COUSINS, D. Mycobacterium bovis infection and control in domestic livestock. **Rev Sci Tech**, v. 20, n. 1, p. 71-85, Apr 2001.

COUSINS, D.; FLORISSON, N. A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species. **Rev Sci Tech**, v. 24, n. 3, p. 1039-59, Dec 2005.

DALEKE, M. H. et al. General secretion signal for the mycobacterial type VII secretion pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 28, p. 11342-7, 2012 2012.

DE KANTOR, I. N. et al. Human Mycobacterium bovis infection in ten Latin American countries. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 88, n. 4, p. 358-65, Jul 2008.

DE LA RUA-DOMENECH, R. et al. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. **Res Vet Sci**, v. 81, n. 2, p. 190-210, Oct 2006.

DE LISLE, G.; BUDDLE, B.; COLLINS, D. Bovine tuberculosis--another view from down under. **Vet J**, v. 173, n. 2, p. 233-4, Mar 2007.

DEAN, G. S. et al. Minimum infective dose of Mycobacterium bovis in cattle. **Infect Immun**, v. 73, n. 10, p. 6467-71, Oct 2005.

DEL FAVA, C., PITUCO, E.M. Infecção pelo vírus da leucemia bovina (BLV) no Brasil. **Biológico** v. 66, n. 1/2, p. 1-8, 2004.

DRISCOLL, E. E. et al. A preliminary study of genetic factors that influence susceptibility to bovine tuberculosis in the British cattle herd. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e18806, 2011.

EAVES, F. W. et al. A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle. **Vet Microbiol**, v. 39, n. 3-4, p. 313-21, Apr 1994.

EGEN, J. G. et al. Intravital imaging reveals limited antigen presentation and T cell effector function in mycobacterial granulomas. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 807-19, May 27 2011.

EHLERS, M.; RAVETCH, J. V. Opposing effects of Toll-like receptor stimulation induce autoimmunity or tolerance. **Trends Immunol**, v. 28, n. 2, p. 74-9, Feb 2007.

EMANUELSON, U.; SCHERLING, K.; PETTERSSON, H. Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 12, n. 1-2, p. 121-131, 1992.

ENDSLEY, J. J.; ENDSLEY, M. A.; ESTES, D. M. Bovine natural killer cells acquire cytotoxic/effector activity following activation with IL-12/15 and reduce *Mycobacterium bovis* BCG in infected macrophages. **J Leukoc Biol**, v. 79, n. 1, p. 71-9, Jan 2006.

ENDSLEY, J. J. et al. *Mycobacterium bovis* BCG vaccination induces memory CD4⁺ T cells characterized by effector biomarker expression and anti-mycobacterial activity. **Vaccine**, v. 25, n. 50, p. 8384-94, Dec 5 2007.

ERSKINE, R. J. et al. Effect of infection with bovine leukosis virus on lymphocyte proliferation and apoptosis in dairy cattle. **Am J Vet Res**, v. 72, n. 8, p. 1059-64, Aug 2011.

ERUSLANOV, E. B. et al. Neutrophil responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection in genetically susceptible and resistant mice. **Infect Immun**, v. 73, n. 3, p. 1744-53, Mar 2005.

EVANS, J. T. et al. Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. **Lancet**, v. 369, n. 9569, p. 1270-6, Apr 14 2007.

FABRE, M. et al. High genetic diversity revealed by variable-number tandem repeat genotyping and analysis of hsp65 gene polymorphism in a large collection of "*Mycobacterium canettii*" strains indicates that the *M. tuberculosis* complex is a recently emerged clone of "*M. canettii*". **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 7, p. 3248-55, Jul 2004.

FECHNER, H. et al. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. **Virology**, v. 237, n. 2, p. 261-9, Oct 27 1997.

FENG, C. G. et al. NK cell-derived IFN-gamma differentially regulates innate resistance and neutrophil response in T cell-deficient hosts infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **J Immunol**, v. 177, n. 10, p. 7086-93, Nov 15 2006.

FINE, A. E. et al. A Study of the Persistence of *Mycobacterium bovis* in the Environment under Natural Weather Conditions in Michigan, USA. **Vet Med Int**, v. 2011, p. 765430,

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 61, n. 2, p. 136-69, Jun 1997.

FINLAY, E. K. et al. A genome wide association scan of bovine tuberculosis susceptibility in Holstein-Friesian dairy cattle. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e30545, 2012.

FLYNN, J. L.; CHAN, J. Immunology of tuberculosis. **Annu Rev Immunol**, v. 19, p. 93-129, 2001.

FLYNN, R. J. et al. Experimental *Fasciola hepatica* infection alters responses to tests used for diagnosis of bovine tuberculosis. **Infect Immun**, v. 75, n. 3, p. 1373-81, Mar 2007.

FOSSUM, C. et al. Detection of B and T cells, with lectins or antibodies, in healthy and bovine leukemia virus-infected cattle. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 18, n. 3, p. 269-78, Apr 1988.

FRANCHINI, G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. **Blood**, v. 86, n. 10, p. 3619-39, Nov 15 1995.

GAGNEUX, S. Host-pathogen coevolution in human tuberculosis. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 367, n. 1590, p. 850-9, 2012 2012.

GALTON, M. M. et al. Application of a Microtechnique to the Agglutination Test for Leptospiral Antibodies. **Appl Microbiol**, v. 13, p. 81-5, Jan 1965.

GARNIER, T. et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 13, p. 7877-82, Jun 24 2003.

GHYSDAEL, J. et al. Bovine leukemia virus. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 112, p. 1-19, 1984.

GIL, O. et al. Granuloma encapsulation is a key factor for containing tuberculosis infection in minipigs. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. e10030, 2010.

GILLERON, M. et al. *Mycobacterium smegmatis* phosphoinositols-glyceroarabinomannans. Structure and localization of alkali-labile and alkali-stable phosphoinositides. **J Biol Chem**, v. 272, n. 1, p. 117-24, Jan 3 1997.

GILLERON, M. et al. Structural study of the lipomannans from *Mycobacterium bovis* BCG: characterisation of multiacylated forms of the phosphatidyl-myo-inositol anchor. **J Mol Biol**, v. 285, n. 5, p. 2147-60, Feb 5 1999.

GILLET, N. et al. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. **Retrovirology**, v. 4, p. 18, 2007.

GOOD, M.; DUGNAN, A. Perspectives on the History of Bovine TB and the Role of Tuberculin in Bovine TB Eradication. **Vet Med Int**, v. 2011, p. 410470, 2011.

GRANGE, J. M. The biology of the genus *Mycobacterium*. **Soc Appl Bacteriol Symp Ser**, v. 25, p. 1S-9S, 1996.

GRANGE, J. M.; COLLINS, C. H. Bovine tubercle bacilli and disease in animals and man. **Epidemiol Infect**, v. 99, n. 2, p. 221-34, Oct 1987.

GUENIN-MACE, L.; SIMEONE, R.; DEMANGEL, C. Lipids of pathogenic Mycobacteria: contributions to virulence and host immune suppression. **Transbound Emerg Dis**, v. 56, n. 6-7, p. 255-68, Aug 2009.

GUO, S. et al. The CFP-10/ESAT-6 complex of Mycobacterium tuberculosis potentiates the activation of murine macrophages involvement of IFN-gamma signaling. **Med Microbiol Immunol**, v. 199, n. 2, p. 129-37, 2010 2010.

GUTACKER, M. M. et al. Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in Mycobacterium tuberculosis complex organisms: resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. **Genetics**, v. 162, n. 4, p. 1533-43, Dec 2002.

GUTIERREZ, M. C. et al. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of Mycobacterium tuberculosis. **PLoS Pathog**, v. 1, n. 1, p. e5, Sep 2005.

GUTIERREZ, M. G. et al. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. **Cell**, v. 119, n. 6, p. 753-66, Dec 17 2004.

HOPE, J. C. et al. Dendritic cells induce CD4+ and CD8+ T-cell responses to Mycobacterium bovis and M. avium antigens in Bacille Calmette Guerin vaccinated and nonvaccinated cattle. **Scand J Immunol**, v. 52, n. 3, p. 285-91, Sep 2000.

HOPE, J. C. et al. Exposure to Mycobacterium avium induces low-level protection from Mycobacterium bovis infection but compromises diagnosis of disease in cattle. **Clin Exp Immunol**, v. 141, n. 3, p. 432-9, Sep 2005.

HOTTER, G. S.; COLLINS, D. M. Mycobacterium bovis lipids: virulence and vaccines. **Vet Microbiol**, v. 151, n. 1-2, p. 91-8, Jul 5 2011.

HOTTER, G. S. et al. Transposon mutagenesis of Mb0100 at the ppe1-nrp locus in Mycobacterium bovis disrupts phthiocerol dimycocerosate (PDIM) and glycosylphenol-PDIM biosynthesis, producing an avirulent

strain with vaccine properties at least equal to those of *M. bovis* BCG. **J Bacteriol**, v. 187, n. 7, p. 2267-77, Apr 2005.

HUGHES, M. S. et al. Molecular analyses of mycobacteria other than the *M. tuberculosis* complex isolated from Northern Ireland cattle. **Vet Microbiol**, v. 108, n. 1-2, p. 101-12, Jun 15 2005.

HUNTER, R. L. et al. Multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavitory tuberculosis, including a revised description of the pathology of secondary disease. **Ann Clin Lab Sci**, v. 36, n. 4, p. 371-86, Autumn 2006.

HUYNH, K. K.; JOSHI, S. A.; BROWN, E. J. A delicate dance: host response to mycobacteria. **Curr Opin Immunol**, v. 23, n. 4, p. 464-72, Aug 2011.

INDRIGO, J.; HUNTER, R. L., JR.; ACTOR, J. K. Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages. **Microbiology**, v. 149, n. Pt 8, p. 2049-59, Aug 2003.

JO, E. K. Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs. **Curr Opin Infect Dis**, v. 21, n. 3, p. 279-86, Jun 2008.

KABEYA, H.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Host immune responses in the course of bovine leukemia virus infection. **J Vet Med Sci**, v. 63, n. 7, p. 703-8, Jul 2001.

KARLSON, A. G. Non-specific or cross sensitivity reactions to tuberculin in cattle. **Advances in Veterinary Science**, v. 7, p. 147-181, 1962

KATOCH, V. M. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). **Indian J Med Res**, v. 120, n. 4, p. 290-304, Oct 2004.

KAUFMANN, S. H. Future vaccination strategies against tuberculosis: thinking outside the box. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 567-77, 2010.

KELLER, C. et al. Genetically determined susceptibility to tuberculosis in mice causally involves accelerated and enhanced recruitment of granulocytes. **Infect Immun**, v. 74, n. 7, p. 4295-309, Jul 2006.

KENNEDY, H. et al. The role of WC1(+) gamma delta T-cells in the delayed-type hypersensitivity (DTH) skin-test reaction of Mycobacterium bovis-infected cattle. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 93, n. 3-4, p. 169-76, Jun 2003.

KENNEDY, H. E. et al. Modulation of immune responses to Mycobacterium bovis in cattle depleted of WC1(+) gamma delta T cells. **Infect Immun**, v. 70, n. 3, p. 1488-500, Mar 2002.

KETTMANN, R. et al. Integration of bovine leukemia virus DNA in the bovine genome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 76, n. 10, p. 4822-6, Oct 1979.

LEE, J. et al. Investigation of the bovine leukemia virus proviral DNA in human leukemias and lung cancers in Korea. **J Korean Med Sci**, v. 20, n. 4, p. 603-6, Aug 2005.

LETESSON, J. J. et al. FACS analysis of bovine leukemia virus (BLV)-infected cell lines with monoclonal antibodies (mAbs) to B cells and to monocytes/macrophages. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 27, n. 1-3, p. 207-13, Jan 1991.

LEWIN, H. A. et al. Peripheral B lymphocyte percentage as an indicator of subclinical progression of bovine leukemia virus infection. **J Dairy Sci**, v. 71, n. 9, p. 2526-34, Sep 1988.

LIEBANA, E. et al. Pathology of naturally occurring bovine tuberculosis in England and Wales. **Vet J**, v. 176, n. 3, p. 354-60, Jun 2008.

MAPA/SDA. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose bovina e bubalina**. Brasília, DF: MAPA/SDA: 188 p. 2006.

MCCUNE, R. M.; FELDMANN, F. M.; MCDERMOTT, W. Microbial persistence. II. Characteristics of the sterile state of tubercle bacilli. **J Exp Med**, v. 123, n. 3, p. 469-86, Mar 1 1966.

MCT/CTNBIO. Cadernos de biossegurança e legislação. In: (Ed.). Brasília: MCT, 2002. p.283.

MEADE, K. G. et al. Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from *Mycobacterium bovis* infected cattle after in vitro antigenic stimulation with purified protein derivative of tuberculin (PPD). **Vet Immunol Immunopathol**, v. 113, n. 1-2, p. 73-89, Sep 15 2006.

MEDEIROS, L. et al. Comparison of decontamination methods for primary isolation of *Mycobacterium bovis* in paucibacillary bovine tissues. **Lett Appl Microbiol**, v. 54, n. 3, p. 182-6, Mar 2011.

MEDJAHED, H.; GAILLARD, J. L.; REYRAT, J. M. *Mycobacterium abscessus*: a new player in the mycobacterial field. **Trends Microbiol**, v. 18, n. 3, p. 117-23, Mar 2010.

MICHEL, A. et al. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* isolates from free-ranging wildlife in South African game reserves. **Vet Microbiol**, v. 133, n. 4, p. 335-43, Feb 2009.

MICHEL, A.; MÜLLER, B.; VAN HELDEN, P. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: A problem, or not? **Vet Microbiol**, Sep 2009.

MICHEL, A. L. et al. Wildlife tuberculosis in South African conservation areas: implications and challenges. **Vet Microbiol**, v. 112, n. 2-4, p. 91-100, Feb 25 2006.

MILLER, J. M.; VAN DER MAATEN, M. J. Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. **Eur J Cancer**, v. 13, n. 12, p. 1369-75, Dec 1977.

MIRSKY, M. L. et al. The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection. **J Virol**, v. 70, n. 4, p. 2178-83, Apr 1996.

- MOLLOY, A.; LAOCHUMROONVORAPONG, P.; KAPLAN, G. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin. **J Exp Med**, v. 180, n. 4, p. 1499-509, Oct 1 1994.
- MONAGHAN, M. L. et al. The tuberculin test. **Vet Microbiol**, v. 40, n. 1-2, p. 111-24, May 1994.
- MORRIS, R. S.; PFEIFFER, D. U.; JACKSON, R. The epidemiology of Mycobacterium bovis infections. **Vet Microbiol**, v. 40, n. 1-2, p. 153-77, May 1994.
- MORTAZ, E. et al. New Aspects in Immunopathology of Mycobacterium tuberculosis. **ISRN Immunology**, v. 2012, p. 11, 2012.
- MURAKAMI, H. et al. Bovine leukemia virus integration site selection in cattle that develop leukemia. **Virus Res**, v. 156, n. 1-2, p. 107-12, Mar
- NAGY, D. W. et al. Association between the strength of serologic recognition of bovine leukosis virus and lymphocyte count in bovine leukosis virus-infected cows. **J Am Vet Med Assoc**, v. 220, n. 11, p. 1681-4, Jun 1 2002.
- NAIF, H. M. et al. Early detection of bovine leukemia virus by using an enzyme-linked assay for polymerase chain reaction-amplified proviral DNA in experimentally infected cattle. **J Clin Microbiol**, v. 30, n. 3, p. 675-9, Mar 1992.
- NARANJO, V. et al. Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of Mycobacterium tuberculosis complex. **Vet Microbiol**, v. 127, n. 1-2, p. 1-9, Feb 5 2008.
- NEILL, S. D.; BRYSON, D. G.; POLLOCK, J. M. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 81, n. 1-2, p. 79-86, 2001.

NIGOU, J. et al. Structural definition of arabinomannans from *Mycobacterium bovis* BCG. **Glycoconj J**, v. 16, n. 6, p. 257-64, Jun 1999.

NORBY, B. et al. The sensitivity of gross necropsy, caudal fold and comparative cervical tests for the diagnosis of bovine tuberculosis. **J Vet Diagn Invest**, v. 16, n. 2, p. 126-31, Mar 2004.

O'BRIEN D, J. et al. Managing the wildlife reservoir of *Mycobacterium bovis*: the Michigan, USA, experience. **Vet Microbiol**, v. 112, n. 2-4, p. 313-23, Feb 25 2006.

O'REILLY, L.; DABORN, C. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. **Tuber Lung Dis**, v. 76 Suppl 1, p. 1-46, Aug 1995.

OIE. **The manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: Bovine tuberculosis.** World Animal Health Information Database (WAHID): The World Organization for Animal Health (OIE): 590 p. 2011.

OIE. **Bovine tuberculosis: December 2012.** World animal health information database (WAHID): OIE 2012a.

OIE. **The manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: Enzootic Bovine Leukosis.** World Animal Health Information Database (WAHID): The World Organization for Animal Health OIE: 590 p. 2012b.

OTT, S. L.; JOHNSON, R.; WELLS, S. J. Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. **Prev Vet Med**, v. 61, n. 4, p. 249-62, Dec 12 2003.

PALMER, M. V.; WATERS, W. R.; THACKER, T. C. Lesion development and immunohistochemical changes in granulomas from cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. **Vet Pathol**, v. 44, n. 6, p. 863-74, Nov 2007.

PALMER, P. E. S. **The Imaging of Tuberculosis: With Epidemiological, Pathological, and clinical correlation.** New York: Springer, 2002. 147 ISBN 3540418210.

PARKASH, O.; SINGH, B.; PAI, M. Regions of differences encoded antigens as targets for immunodiagnosis of tuberculosis in humans. **Scand J Immunol**, v. 70, n. 4, p. 345-57, Oct 2009.

PEREZ, R. L. et al. Cytokine message and protein expression during lung granuloma formation and resolution induced by the mycobacterial cord factor trehalose-6,6'-dimycolate. **J Interferon Cytokine Res**, v. 20, n. 9, p. 795-804, Sep 2000.

PHILIPS, J. A.; ERNST, J. D. Tuberculosis pathogenesis and immunity. **Annu Rev Pathol**, v. 7, p. 353-84, 2011.

PHILLIPS, C. J. et al. Genetic and management factors that influence the susceptibility of cattle to *Mycobacterium bovis* infection. **Anim Health Res Rev**, v. 3, n. 1, p. 3-13, Jun 2002.

PLATTNER, B. L.; HUFFMAN, E. L.; HOSTETTER, J. M. Gamma-Delta T-Cell Responses During Subcutaneous *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* Challenge in Sensitized or Naive Calves Using Matrix Biopolymers. **Vet Pathol**, Oct 9 2012.

PLOPPER, C. G.; MARIASSY, A. T.; LOLLINI, L. O. Structure as revealed by airway dissection. A comparison of mammalian lungs. **Am Rev Respir Dis**, v. 128, n. 2 Pt 2, p. S4-7, Aug 1983.

PLUDEMANN, A.; MUKHOPADHYAY, S.; GORDON, S. The interaction of macrophage receptors with bacterial ligands. **Expert Rev Mol Med**, v. 8, n. 28, p. 1-25, 2006.

POLLOCK, J. M.; NEILL, S. D. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. **Vet J**, v. 163, n. 2, p. 115-27, Mar 2002.

POLLOCK, J. M. et al. Pathogenesis of bovine tuberculosis: the role of experimental models of infection. **Vet Microbiol**, v. 112, n. 2-4, p. 141-50, Feb 25 2006.

POLLOCK, J. M.; WELSH, M. D. The WC1(+) gammadelta T-cell population in cattle: a possible role in resistance to intracellular infection. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 89, n. 3-4, p. 105-14, Oct 28 2002.

PRITCHARD, D. G. A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. **J Comp Pathol**, v. 99, n. 4, p. 357-99, Nov 1988.

PYM, A. S. et al. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. **Nat Med**, v. 9, n. 5, p. 533-9, May 2003.

RAMAKRISHNAN, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 5, p. 352-66, May 2012.

RENNIE, B.; FILION, L. G.; SMART, N. Antibody response to a sterile filtered PPD tuberculin in *M. bovis* infected and *M. bovis* sensitized cattle. **BMC Vet Res**, v. 6, p. 50,

RENWICK, A. R.; WHITE, P. C.; BENGIS, R. G. Bovine tuberculosis in southern African wildlife: a multi-species host-pathogen system. **Epidemiol Infect**, v. 135, n. 4, p. 529-40, May 2007.

RHODES, S. et al. Bovine tuberculosis: immune responses in the peripheral blood and at the site of active disease. **Immunology**, v. 99, n. 2, p. 195-202, Feb 2000.

ROBERTS, D. H.; LUCAS, M. H.; SWALLOW, C. Comparison of the agar gel immunodiffusion test and ELISA in the detection of bovine leukosis virus antibody in cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 22, n. 3, p. 275-81, Oct 1989.

ROBERTS, D. H. et al. Response of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus to bovine leukosis virus. **Vet Rec**, v. 122, n. 13, p. 293-6, Mar 26 1988.

RODRIGUEZ, J. G. et al. Amplification of a 500-base-pair fragment from cultured isolates of *Mycobacterium bovis*. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 7, p. 2330-2, Jul 1999.

RODRIGUEZ, S. M. et al. Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. **Viruses**, v. 3, n. 7, p. 1210-48, Jul

ROTHFUCHS, A. G. et al. Dectin-1 interaction with *Mycobacterium tuberculosis* leads to enhanced IL-12p40 production by splenic dendritic cells. **J Immunol**, v. 179, n. 6, p. 3463-71, Sep 15 2007.

RUSSELL, D. G. Who puts the tubercle in tuberculosis? **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 1, p. 39-47, Jan 2007.

RYFFEL, B. et al. Toll-like receptors and control of mycobacterial infection in mice. **Novartis Found Symp**, v. 279, p. 127-39; discussion 139-41, 216-9, 2006.

SAGATA, N. et al. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 82, n. 3, p. 677-81, Feb 1985.

SAKAMOTO, K. The pathology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Vet Pathol**, v. 49, n. 3, p. 423-39, May

SAKAMOTO, K. The pathology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Vet Pathol**, v. 49, n. 3, p. 423-39, May 2012.

SARGEANT, J. M. et al. Associations between farm management practices, productivity, and bovine leukemia virus infection in Ontario dairy herds. **Prev Vet Med**, v. 31, n. 3-4, p. 211-21, Aug 1997.

SCHWARTZ, I.; LEVY, D. Pathobiology of bovine leukemia virus. **Vet Res**, v. 25, n. 6, p. 521-36, 1994.

SEILER, P. et al. Early granuloma formation after aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection is regulated by neutrophils via

CXCR3-signaling chemokines. **Eur J Immunol**, v. 33, n. 10, p. 2676-86, Oct 2003.

SPICKLER, A. R. **Bovine Tuberculosis**. Iowa: CFSPH: 6 p. 2009.

SREEVATSAN, S. et al. Restricted structural gene polymorphism in the Mycobacterium tuberculosis complex indicates evolutionarily recent global dissemination. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 18, p. 9869-74, Sep 2 1997.

STONE, D. M.; HOF, A. J.; DAVIS, W. C. Up-regulation of IL-2 receptor alpha and MHC class II expression on lymphocyte subpopulations from bovine leukemia virus infected lymphocytotic cows. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 48, n. 1-2, p. 65-76, Sep 1995.

STONE, D. M. et al. CD4 T lymphocyte activation in BLV-induced persistent B lymphocytosis in cattle. **Clin Immunol**, v. 96, n. 3, p. 280-8, Sep 2000.

STOTT, M. L. et al. Integrated bovine leukosis proviral DNA in T helper and T cytotoxic/suppressor lymphocytes. **J Gen Virol**, v. 72 (Pt 2), p. 307-15, Feb 1991.

SZYNAL, M. et al. Disruption of B-cell homeostatic control mediated by the BLV-Tax oncoprotein: association with the upregulation of Bcl-2 and signaling through NF-kappaB. **Oncogene**, v. 22, n. 29, p. 4531-42, Jul 17 2003.

TAWFEEQ, M. M. et al. Overexpression of interleukin 2 receptor, thymidine kinase and immunoglobulin-associated alpha-1 messenger RNA in a clinical case of enzootic bovine leukosis. **J Vet Med Sci**, v. 74, n. 9, p. 1203-6, Sep

TAYLOR, G. M. et al. Rapid detection of Mycobacterium bovis DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. **BMC Vet Res**, v. 3, p. 12, 2007.

TAYLOR, J. L. et al. Pulmonary necrosis resulting from DNA vaccination against tuberculosis. **Infect Immun**, v. 71, n. 4, p. 2192-8, Apr 2003.

THACKER, T. C.; PALMER, M. V.; WATERS, W. R. Associations between cytokine gene expression and pathology in *Mycobacterium bovis* infected cattle. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 119, n. 3-4, p. 204-13, Oct 15 2007.

THOEN, C.; LOBUE, P.; DE KANTOR, I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. **Vet Microbiol**, v. 112, n. 2-4, p. 339-45, Feb 25 2006.

TRONO, K. G. et al. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. **Vet Microbiol**, v. 83, n. 3, p. 235-48, Nov 26 2001.

TRUEBLOOD, E. S. et al. B-lymphocyte proliferation during bovine leukemia virus-induced persistent lymphocytosis is enhanced by T-lymphocyte-derived interleukin-2. **J Virol**, v. 72, n. 4, p. 3169-77, Apr 1998.

TSAI, M. C. et al. Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. **Cell Microbiol**, v. 8, n. 2, p. 218-32, Feb 2006.

ULRICHS, T.; KAUFMANN, S. H. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. **J Pathol**, v. 208, n. 2, p. 261-9, Jan 2006.

USUI, T. et al. Interferon-gamma expression associated with suppression of bovine leukemia virus at the early phase of infection in sheep. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 115, n. 1-2, p. 17-23, Jan 15 2007.

VANLEEUEWEN, J. A. et al. Seroprevalences of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhoea virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum* in beef and dairy cattle in Manitoba. **Can Vet J**, v. 47, n. 8, p. 783-6, Aug 2006.

VILLARREAL-RAMOS, B. et al. Investigation of the role of CD8+ T cells in bovine tuberculosis in vivo. **Infect Immun**, v. 71, n. 8, p. 4297-303, Aug 2003.

VOLKMAN, H. E. et al. Tuberculous granuloma formation is enhanced by a mycobacterium virulence determinant. **PLoS Biol**, v. 2, n. 11, p. e367, Nov 2004.

VORDERMEIER, H. M. et al. Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis. **Infect Immun**, v. 70, n. 6, p. 3026-32, Jun 2002.

VORDERMEIER, H. M. et al. Viral booster vaccines improve *Mycobacterium bovis* BCG-induced protection against bovine tuberculosis. **Infect Immun**, v. 77, n. 8, p. 3364-73, Aug 2009.

WALZL, G. et al. Immunological biomarkers of tuberculosis. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 5, p. 343-54, May 2011.

WANGOO, A. et al. Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen, gammadelta (WC1+) T cells and CD 68+ cells. **J Comp Pathol**, v. 133, n. 4, p. 223-34, Nov 2005.

WARDS, B. J.; COLLINS, D. M.; DE LISLE, G. W. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. **Vet Microbiol**, v. 43, n. 2-3, p. 227-40, Feb 1995.

WARDS, B. J.; DE LISLE, G. W.; COLLINS, D. M. An esat6 knockout mutant of *Mycobacterium bovis* produced by homologous recombination will contribute to the development of a live tuberculosis vaccine. **Tuber Lung Dis**, v. 80, n. 4-5, p. 185-9, 2000.

WATERS, W. R. et al. Tuberculosis immunity: opportunities from studies with cattle. **Clin Dev Immunol**, v. 2011, p. 768542,

WATERS, W. R. et al. Tuberculosis immunity: opportunities from studies with cattle. **Clin Dev Immunol**, v. 2011, p. 768542, 2011.

WATERS, W. R. et al. Immune responses in cattle inoculated with *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, or *Mycobacterium kansasii*. **Clin Vaccine Immunol**, v. 17, n. 2, p. 247-52, Feb 2009.

WEDLOCK, D. et al. Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. **Microbes Infect**, v. 4, n. 4, p. 471-80, Apr 2002.

WEDLOCK, D. N. et al. 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. **Infect Immun**, v. 67, n. 5, p. 2172-7, May 1999.

WELSH, M. D. et al. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. **Immunology**, v. 114, n. 1, p. 101-11, Jan 2005.

WHIPPLE, D. L.; BOLIN, C. A.; MILLER, J. M. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. **J Vet Diagn Invest**, v. 8, n. 3, p. 351-4, Jul 1996.

WIDDISON, S.; WATSON, M.; COFFEY, T. J. Correlation between lymph node pathology and chemokine expression during bovine tuberculosis. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 89, n. 6, p. 417-22, Nov 2009.

YILDIZ, F. Z.; BABALOLA, K.; SUMMERS, M. F. Identification of a high affinity nucleocapsid protein binding element from the bovine leukemia virus genome. **Virus Res**, Jul 27

ANEXO A - PLoSOne - doi:10.1371/journal.pone.0053884.

Asymptomatic Cattle Naturally Infected with *Mycobacterium bovis* Present Exacerbated Tissue Pathology and Bacterial Dissemination

Álvaro Menin^{1*}, Renata Fleith¹, Carolina Reck², Mariel Marlow³, Paula Fernandes¹, Célio Pilati², André Báfica^{1*}

1 Laboratory of Immunobiology, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil, **2** Laboratory of Histology and Immunohistochemistry, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, Santa Catarina, Brazil, **3** Laboratory of Protozoology, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

Abstract

Rational discovery of novel immunodiagnostic and vaccine candidate antigens to control bovine tuberculosis (bTB) requires knowledge of disease immunopathogenesis. However, there remains a paucity of information on the *Mycobacterium bovis*-host immune interactions during the natural infection. Analysis of 247 naturally PPD+ *M. bovis*-infected cattle revealed that 92% (n = 228) of these animals were found to display no clinical signs, but presented severe as well as disseminated bTB-lesions at *post-mortem* examination. Moreover, dissemination of bTB-lesions positively correlated with both pathology severity score (Spearman $r = 0.48$; $p < 0.0001$) and viable tissue bacterial loads (Spearman $r = 0.58$; $p = 0.0001$). Additionally, granuloma encapsulation negatively correlated with *M. bovis* growth as well as pathology severity, suggesting that encapsulation is an effective mechanism to control bacterial proliferation during natural infection. Moreover, multinucleated giant cell numbers were found to negatively correlate with bacterial counts (Spearman $r = 0.25$; $p = 0.03$) in lung granulomas. In contrast, neutrophil numbers in the granuloma were associated with increased *M. bovis* proliferation (Spearman $r = 0.27$; $p = 0.021$). Together, our findings suggest that encapsulation and multinucleated giant cells control *M. bovis* viability, whereas neutrophils may serve as a cellular biomarker of bacterial proliferation during natural infection. These data integrate host granuloma responses with mycobacterial dissemination and could provide useful immunopathological-based biomarkers of disease severity in natural infection with *M. bovis*, an important cattle pathogen.

Citation: Menin Á, Fleith R, Reck C, Marlow M, Fernandes P, et al. (2013) Asymptomatic Cattle Naturally Infected with *Mycobacterium bovis* Present Exacerbated Tissue Pathology and Bacterial Dissemination. PLoS ONE 8(1): e53884. doi:10.1371/journal.pone.0053884

Editor: Pere-Joan Cardona, Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, CIBERes, Spain

Received: August 2, 2012; **Accepted:** December 4, 2012; **Published:** January 9, 2013

Copyright: © 2013 Menin et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by CAPES (PROCAD), CNPq (INCT/INTEV), National Institutes of Health 394 (GRIP/Fogarty) and the Howard Hughes Medical Institute (ECS Program). AB is a CNPq 395 scientist scholar. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: andre.bafica@ufsc.br (AB); amenin@ccb.ufsc.br (AM)

Introduction

Bovine tuberculosis (bTB), caused by infection with the intracellular acid-fast bacilli *Mycobacterium bovis*, is an important neglected zoonosis, which significantly decreases livestock production and economically affects international trade [1–3]. Additionally, *M. bovis* infection is estimated to be responsible for ~10% of human tuberculosis (TB) in Africa [3] and ~2.5% of human cases in Latin America [4], thus underscoring the importance of disease control programs based on the understanding of infection dynamics [5–8].

Currently, no effective vaccine exists for bovine TB. The main procedures to control/eradicate this intractable disease are diagnosis and compulsory slaughter of positive animals [9]. In this context, the most utilized diagnostic tool for *M. bovis* infection in cattle is the single intradermal comparative cervical tuberculin test (SICCT), which measures a delayed type hypersensitivity response to the tuberculin antigen-purified protein derivative (PPD) [10], but may fail to detect specific pathogen infection [11–13]. Indeed, Claridge et al. have recently reported that *Fasciola hepatica* co-infection in bTB diseased cattle significantly decreases

the numbers of PPD-positive animals [11], demonstrating PPD sensitivity could be affected by parasitic co-infections. Together, these data indicate an urgent need for an effective vaccine as well as better diagnostic tests to control bTB. However, there remains a paucity of information on bTB immunopathogenesis, especially during natural infection.

M. bovis primarily infects macrophages, where they can survive, replicate and disseminate into different anatomical sites [14,15]. The risk of transmission as well as the host's survival relies mainly on the ability of well-organized structures called granulomas to contain mycobacterial infection [14–17]. Tuberculous granuloma is a complex host-protective structure generated in response to persistent mycobacterial stimuli with focal accumulation of inflammatory cells, such as multinucleated giant cells and lymphocytes [16,18–21]. In addition, encapsulation, a process involving production of connective tissue around the granuloma, has been shown to be critical for controlling both mycobacterial growth and tissue dissemination [14,15,22].

The pathological outcome of experimental *M. bovis* infection has been associated with diversity and efficiency of host immune

response as well as a useful tool for evaluating efficiency of new vaccine antigen candidates and disease severity [23–26]. Furthermore, the presence of cellular populations, such as epithelioid cells, multinucleated giant cells, lymphocytes and neutrophils in the tuberculous granuloma [19,21] during experimental *M. bovis* infection, suggests these cells may play important roles in controlling bTB. Although genetic variability and age-associated factors have been shown to potentially be involved in susceptibility to *M. bovis* infection [2,27–32], fundamental host defense aspects of the natural infection by *M. bovis* have not been fully elucidated. Consistently, cellular immune responses against this major bovine pathogen as well as the tuberculous granulomatous response elicited during natural infection in cattle are poorly understood.

In the present study, we have performed a detailed analysis of several host immune and pathology response parameters in a cohort of 247 naturally *M. bovis*-infected cattle. Our findings reveal that, despite the absence of clinical symptoms, naturally-infected bovines displayed severe lung pathology and bacterial dissemination, which correlate with viable mycobacterial loads within the granuloma. Furthermore, immune-related cells and tissue remodeling of the granuloma were found to correlate with bacterial containment during natural infection. Our results provide useful insights on possible biomarkers of disease severity in natural infection with an important cattle pathogen.

Results

Viable Bacterial Loads Correlate with Tissue Pathology in Naturally *M. bovis*-infected Cattle

Experimental and observational data have demonstrated that bovines display increased resistance to *M. bovis* infection [25,31,33–35]. Such resistance has been thought to impact surveillance programs as well as bacterial dissemination given a possible delay between bTB testing and cattle elimination. To gain insight on the immune-pathological responses induced during the window between infection and appearance of bTB-associated clinical signs, we have studied a cohort of 247 PPD-positive bovines naturally infected with *M. bovis* (Figs. 1 and 2). In this cohort, 92.3% of the animals (228 bovines) displayed no clinical signs suggestive of mycobacterial infection (asymptomatic group, AS; Fig. 2A). At the post-mortem evaluation, 217 bovines (95.2% of the AS group) presented severe visible bTB-lesions (Figs. 1A and 2B) with varying degrees of gross pathology scoring (Figs. 2C and D). The majority of animals presented lesions in the lungs, primarily in right cranial lobe and in pulmonary-associated lymph nodes (Fig. 2E and inset), suggesting the aerogenous route of transmission was probably the main via of infection in the studied bovine herds. Thus, these findings demonstrate different organs are affected by *M. bovis* and suggest that following primary infection, the bacterium can disseminate to a variety of tissues during natural infection.

To study disease severity and possible immunopathological correlates of *M. bovis* infection, we developed a score system based on anatomical bTB-lesions dissemination (Fig. 3A). Using this system, 66.2% ($n = 151$) of bovines were defined as levels IV and V (Fig. 3A), pointing out a possible connection between disseminated infection and disease activity. To validate this hypothesis, we then performed Spearman correlations between viable bacterial loads (CFU counting, Fig. 1A), pathology severity (PS score, Fig. 1C and D) and bTB lesion dissemination. As demonstrated in Figure 3 (B and C), our score system positively correlates with gross pathology severity as well as tissue bacterial loads. These results formally demonstrate that naturally infected cattle with increased pathology severity display higher loads of viable *M. bovis*.

These findings suggest asymptomatic animals could play an important role in bacterial transmission and maintenance of disease before diagnostic and elimination of bovine populations in nature.

Granuloma Encapsulation Negatively Correlates with *M. bovis* Loads in Naturally Infected Cattle

The observed dissemination of *M. bovis* and the presence of severe bTB-lesions in asymptomatic animals suggest the existence of a robust immune response during natural infection [23–25,34]. To investigate bovine-protective factors associated with control of natural infection, which could influence host disease-*M. bovis* interplay and transmission, we have performed a detailed study of the granuloma, a major structure known to be associated with containment of mycobacterial dissemination [14–16,20]. Following analysis of primary lesions from 217 infected AS animals (573 tuberculous granulomas), three major degrees (I-III) of encapsulation intensity were observed, (Fig. 4A) in which most of the animals (138; 64%) showed level III (thickly encapsulation), indicating an attempt to limit the infection in such studied cattle. Consistent with these results, a significant negative correlation between encapsulation and viable bacterial loads (Spearman $r = -0.61$, $p = 0.0001$) was observed (Fig. 4B). Moreover, gross pathology severity (Spearman $r = -0.50$, $p < 0.0001$) (Fig. 4C) and AFB staining (Spearman $r = -0.41$, $p < 0.0001$) (data not shown) were also found to negatively correlate with encapsulation. Interestingly, AFBs were found to be located mainly within the necrotic caseum centre of granulomas and rarely within macrophages, multinucleated giant cells or mineralized debris (Fig. 4A, inset). These data suggest generation of granuloma encapsulation is important to contain *M. bovis* growth in naturally-infected bovine herds.

Analysis of cellular profile of lung granulomatous response from bovines naturally infected with *M. bovis*

We next performed a detailed analysis of the cellular profile of pulmonary granulomas of *M. bovis*-infected asymptomatic animals. As demonstrated in figure 5A, histological analysis of the lung tuberculous granulomatous response revealed four major histopathology groups (grades I-IV), which differ on granuloma-associated cell type numbers: Langhans multinucleated giant cells, epithelioid macrophages, neutrophils and lymphocytes (Fig. 5B). As expected, multinucleated giant cells displayed a positive correlation with histopathology grades (Spearman $r = 0.55$, $p = < 0.0001$). In contrast, neutrophil numbers presented a negative correlation with our defined histopathology grades (Spearman $r = -2.55$, $p = < 0.0001$) (Fig. 5C). These data suggest lung granulomas from bovines naturally-infected with *M. bovis*, although chronically infected and encapsulated, are sites of bacterial growth that dynamically recruits neutrophils. In support of this hypothesis, we observed a positive correlation between neutrophil numbers and viable *M. bovis* (Spearman $r = 0.27$, $p = 0.021$) (Fig. 5D). In addition, *M. bovis* CFU counts negatively correlated with multinucleated giant cell numbers (Spearman $r = -0.25$, $p = 0.03$) (Fig. 5E) and lung histopathology grades (Spearman $r = -0.30$, $p = 0.009$) (Fig. 5F). Together, these evidence suggest neutrophils and giant cells may play a role in regulating *M. bovis* growth in the lung during natural infection of bovines.

Discussion

Although bTB is an important neglected zoonosis which significantly decreases livestock production and impacts public

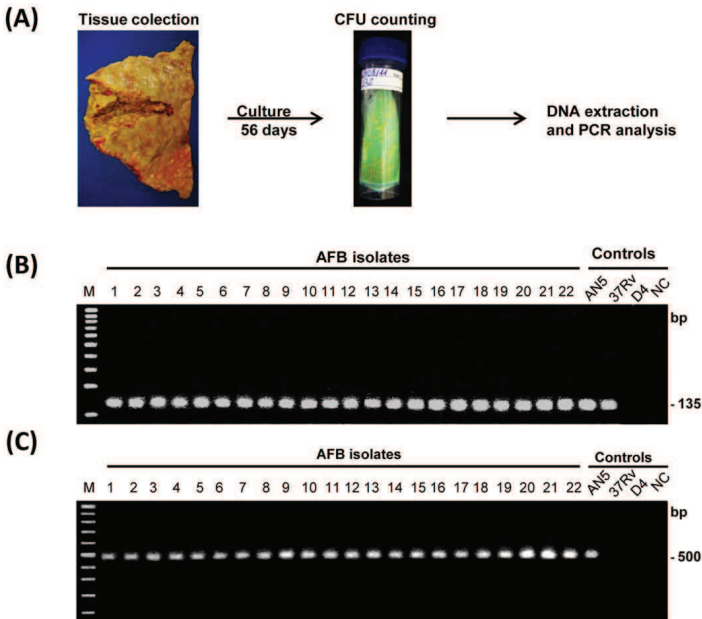


Figure 1. Bacteriology analysis and molecular typing of *M. bovis*. (A) Tissue homogenate obtained from PPD+ asymptomatic animals was inoculated in Ogawa-Kudoh+sodium pyruvate and incubated at 37°C for 8 weeks. After that, colonies were counted and DNA extraction method employed. Purified DNA obtained from (A) was used as template for PCR amplification of (B) IS1081 (~135 bp) or (C) RvD1Rv2031c (~500 bp) gene sequences. Amplification products of single PCR from representative samples are shown. Lane M: 100 bp DNA ladder; lanes 1–22 PCR products of *M. bovis* isolates; AN5 - *Mycobacterium bovis* AN5 strain, standard strain positive control; 37Rv - *Mycobacterium tuberculosis* strain, H37Rv; D4 - *Mycobacterium avium* Subsp. *avium* D4 strain, non-tuberculosis mycobacteria (NMTBC) member; lane NC, negative control (without DNA). doi:10.1371/journal.pone.0053884.g001

health, little is known about the dynamics of host-*M. bovis* interactions during natural infection. Moreover, the immunopathological parameters associated with protective host response in cattle during natural *M. bovis* infection remains largely unknown. In this study, we have performed a detailed analysis of important anti-mycobacteria host defense response components in a cohort of 247 naturally *M. bovis*-infected cattle. Despite the absence of clinical signs of bTB, the majority of infected cattle displayed high frequency and severity of the bTB-lesions in the lung (68.6%) (right cranial lobe) as well as pulmonary-associated lymph nodes. In addition, no correlation between the PPD size reactions and pathology severity was observed in our cohort (Spearman $r = 0.01$ $p = 0.85$).

Observations obtained from naturally *M. bovis*-infected cattle submitted to low-intensive farming conditions have demonstrated that the majority of lesions were present in mesenteric lymph nodes [32,36]. In contrast, naturally *M. bovis*-infected bovines exposed to intensive husbandry systems display augmented frequency of bTB-lesions in the respiratory tract [31,36,37]. Thus, it is possible that intensive husbandry systems favor *M. bovis* dissemination among dairy herds as a result of increased animal contact [5,38]. Consistent with this hypothesis, we have found that 66% of animals displayed pulmonary and systemic spreading of

bTB infection (levels III/IV) (Fig. 3A) suggesting that exposure to the pathogen was first established in the lung tissue. Moreover, the high frequency of lesions observed in the respiratory tract suggests that the major route of *M. bovis* transmission was most likely aerogenous. These evidences are supported by previous studies which demonstrated that bovines infected via the intranasal route by *M. bovis* results in pathology confined to the respiratory tract [39–41]. Involvement of mesenteric lymph nodes was also observed in our cohort, although at a significantly lower frequency (8.8%) (Fig. 2E), suggesting that infection by the oral route may occur simultaneously during natural infection.

It is commonly accepted that *M. bovis* primarily infects macrophages, where they are able to survive, replicate and disseminate into different anatomical sites [14,15,20]. Progression of mycobacterial disease and survival of the host are thought to depend on their ability to limit mycobacterial growth by an effective granulomatous response [14–16,20,42,43]. In the case of experimental *M. bovis* infection in cattle, different stages of granuloma development have been observed to be associated with disease progression [19,21], pointing out a dynamic process of the tuberculous granuloma structure. Our results confirm and extend previous studies [19,21], which suggest an important role for the host granulomatous responses against *M. bovis* during

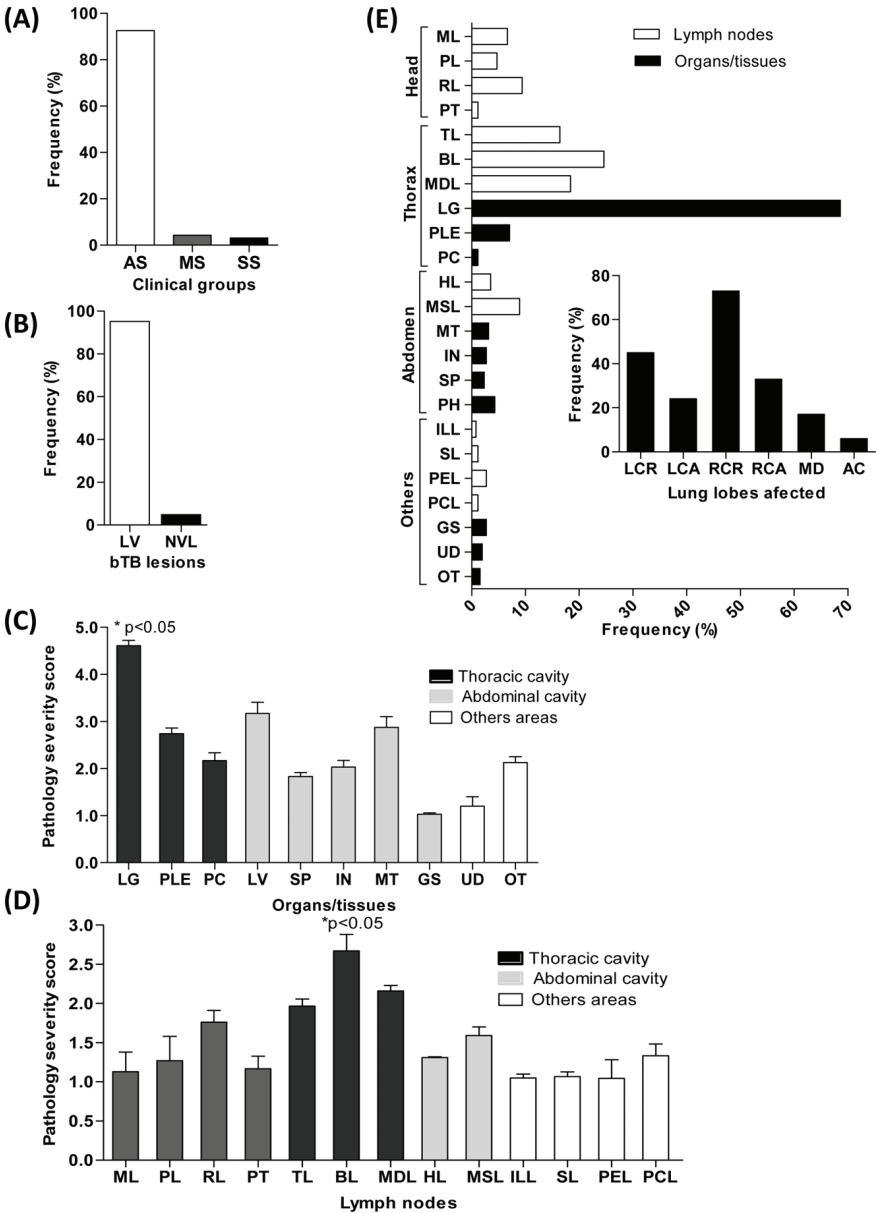


Figure 2. Clinical and gross pathology findings in cattle naturally infected with *M. bovis*. (A) Following clinical examination, animals bTB-positive ($n=247$) were categorized according to their clinical status into asymptomatic (AS, $n=228$), moderate symptoms (MS, $n=11$), severe symptoms (SS, $n=8$). (B) Gross pathology analysis further divided the PPD+ asymptomatic animals into two groups: the presence of visible bTB-lesions (VL) or absence of visible bTB-lesions (NVL). (C and D) Severity of tissue gross pathology in asymptomatic bTB bovines was scored by applying a previously described semi-quantitative scoring system (Vordermeier et al, 2002). Results shown are median of scores \pm SEM. (C) **Organs/Tissues:** thoracic organs and tissues (lung (LG), pleura (PLE), pericardia (PC)); abdominal (liver (LV), spleen (SP), intestine (IN), mesentery (MT), genitor-urinary system (GS), as well as udder (UD), other tissues (OT)); (D) **Lymph nodes:** head lymph nodes (mandibular (ML), parotid (PL), retropharyngeal (RL) lymph nodes and palatine tonsil (PT)); thoracic lymph nodes (tracheobronchial (TL), bronchial (BL and mediastinal (MDL)); abdominal lymph nodes (hepatic (HL), mesenteric (MSL) as well as iliac (ILL), Sciatic (SL), pre-scapular (PEL) and pre-crural (PCL) lymph nodes). (E) Frequency of bTB-lesions in different organs/lymph nodes affected of asymptomatic bTB bovines. Legends as described in (C) and (D). (E, inset) Frequency of lung lobes affected (left cranial lobe (LCR), left caudal lobe (LCA), right cranial lobe (RCR), right caudal lobe (RCA), middle lobe (MD) and accessory lobe (AC) were determined.
doi:10.1371/journal.pone.0053884.g002

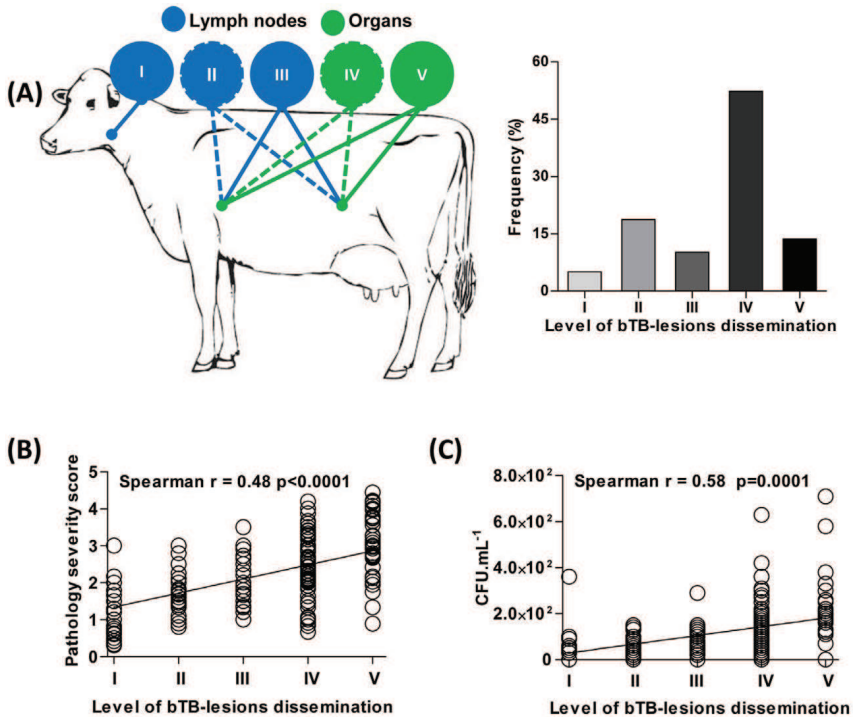


Figure 3. Anatomical dissemination of bTB-lesions and infection burden in asymptomatic cattle naturally infected with *M. bovis*. (A) Frequency of animals categorized according to their anatomical dissemination of bTB-lesions into five levels: I, lesions of bTB in the head lymph nodes, including retropharyngeal, mandibular, and parotid lymph nodes; II, presence of lesions of bTB in thoracic lymph nodes, including the mediastinal, bronchial, tracheobronchial lymph nodes, or in abdominal lymph nodes, including mesenteric, inguinal, gastric, hepatic, splenic, renal, sub-iliac, medial and lateral iliac lymph nodes; III, simultaneous presence of lesions suggestive of bTB in thoracic and abdominal lymph nodes; IV, presence of lesions of bTB in organs of the thoracic or abdominal cavity; and V, simultaneous presence of lesions of bTB in organs of thoracic and abdominal cavities. Schematic cartoon of the scoring system is represented. Continuous line represents both cavities affected (thoracic and abdominal); dotted line represents only one cavity affected. Green balloons indicate affected organs and blue balloons indicate affected lymph nodes. Correlation between levels of lesion dissemination and pathology severity (B) or mycobacterial loads (C) in cattle naturally infected with *M. bovis*. In (B), the results are expressed applying the gross pathology severity semi-quantitative scoring per animal previously described in [26], and (C) as number of CFU.mL⁻¹ (colony-forming units per mL of granulomatous tissue homogenate). Spearman's correlation indexes (Spearman's r and p values) are shown in the graphs.
doi:10.1371/journal.pone.0053884.g003

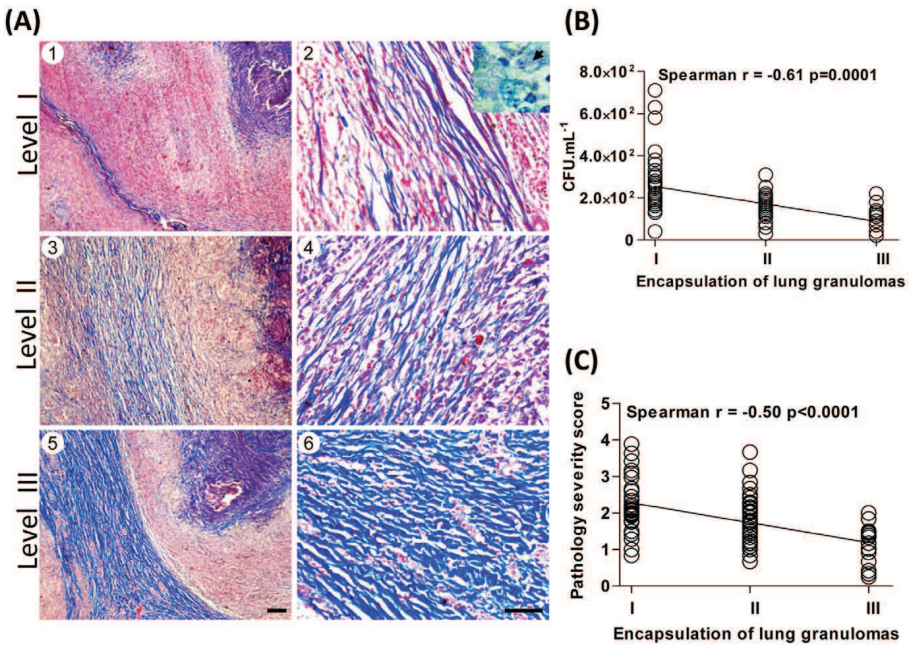


Figure 4. Histopathological analysis of granuloma encapsulation in asymptomatic cattle naturally infected with *M. bovis*. (A) Granulomas were formalin-fixed, paraffin-embedded and 4 μm-sections Masson's trichrome stained, and scored according to their intensity of encapsulation of primary granulomas into three levels: (1 and 2) I, thin encapsulation; (3 and 4) II, dense fibrous capsule; and (5 and 6) III, thickly fibrous encapsulation. (A, inset) Acid Fast-Bacilli (AFB). (Left panels, slides shown at 40× magnification; Scale bar = 100 μm. Right panels, slides shown at 40× magnification; Scale bar = 50 μm. Inset, slides shown at 100× magnification. Correlation between intensity of granuloma encapsulation with mycobacterial loads (B) or gross pathology severity score (C) in cattle naturally infected with *M. bovis* are presented. Spearman's correlation indexes (Spearman's r and p values) are shown in the graphs. doi:10.1371/journal.pone.0053884.g004

natural infection. We found that anatomical dissemination of bacteria/lesions is associated with tissue mycobacterial loads as well as severity of the gross pathology, suggesting the existence of a dynamic host immune response during natural infection. Although further studies are needed to better characterize the process of *M. bovis* dissemination in naturally-infected bovines, the parameters presented here could be employed as predictive biomarkers of disease progression and utilized in control surveillance programs.

Cattle immune responses against *M. bovis* may be a result of several factors, such as strain resistance, infection route and encapsulation of the tuberculous lesions. Connective tissue deposition (encapsulation) is thought to limit dissemination of bacteria and play a critical role in controlling mycobacterial proliferation by entrapping bacilli inside the lesions [14,20,22,25]. However, Liebana et al. have reported the absence of correlation between AFB numbers and stage of granuloma development during natural infection with *M. bovis* in England and Wales [31]. In our study, histological analysis of granulomatous response and tissue remodeling revealed high frequency of chronic lesions in different tissues, which negatively correlated with viable mycobacterial counts (Figs. 4 and 5).

In order to better investigate the lesion development in cattle naturally infected with *M. bovis*, we first applied the methodology described by Wangoo et al. [21], which performed a descriptive study of the granulomatous responses in lymph nodes from cattle infected with *M. bovis* by the intratracheal route. The employment of such methodology in our samples led us to classify the majority of lesions in different organs/tissues (70–100%) as in the final stage of granuloma development, i.e. stage IV (Table 1). Due to increased resistance of cattle to *M. bovis* infection [2,28–30], it is possible that during the natural infection, most of bTB-lesions found in asymptomatic animals are in advanced/chronic stage of development. Interestingly, we found that, despite the observed chronic stage of lesions, thickness of encapsulation could be employed as a marker of lesion development and allowed us to further classify the granulomas into three major groups (I–III) (Fig. 4). The amount of connective tissue surrounding the granuloma (thin encapsulation - thickly fibrous encapsulation) negatively correlated with viable *M. bovis* or AFB staining, suggesting a pivotal role of granuloma encapsulation as a host response controlling mycobacterial proliferation during natural infection. In contrast, lymph nodes from experimentally *M. bovis*

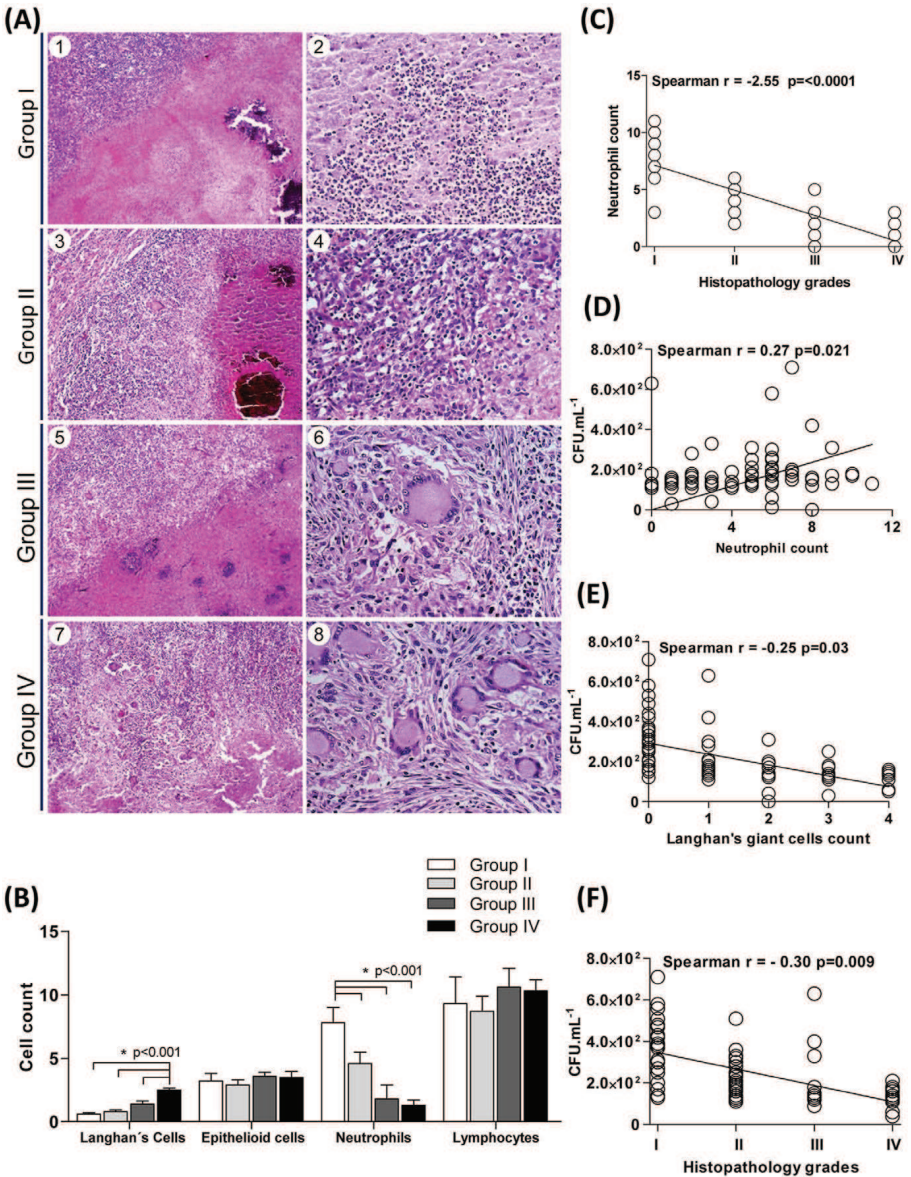


Figure 5. Histopathological analysis of cellular profile of granulomatous response in lung of asymptomatic cattle naturally infected with *M. bovis*. (A) Lung tissues were categorized according to the granuloma cellular response profile and tissue remodeling into four groups: I-V. Representative lung-tuberculous granulomatous response patterns are shown: I (1 and 2) encapsulated granulomas with caseous necrosis areas and presence of several scattered lymphocytes and dense clusters of neutrophils near the capsule; II (3 and 4) encapsulated granuloma, with extensive areas of caseous necrosis. Granulomatous cellular response composed primarily of epithelioid macrophages, lymphocytes, multinucleated Langhans giant cells and clusters of neutrophils; III (5 and 6) encapsulated granulomas, with extensive multicentric areas of caseous necrosis and centralized dystrophic mineralization. Granulomatous cellular response composed of epithelioid macrophages and scattered Langhans' giant cells, which surround the necrotic areas with dense clusters of lymphocytes and few neutrophils; III (7 and 8) encapsulated granulomas, with extensive multicentric areas of caseous necrosis and centralized dystrophic mineralization. Granulomatous cellular response composed of epithelioid macrophages admixed with increased numbers of multinucleated Langhans' giant cells, dense clusters lymphocytes and few neutrophils. Left panels, slides shown at 10 \times magnification; Scale bar = 100 μ m. Right panels, slides shown at 40 \times magnification; Scale bar = 50 μ m. (B) Results presented are mean \pm SEM for each group shown in (A). Correlation between neutrophil counts and histopathology grades (C), Correlation between viable mycobacterial loads and neutrophils (D), multinucleated Langhans giant cells counts (E) as well as lung-granulomatous response profile (F). Spearman's correlation indexes (Spearman's r and p values) are shown in the graphs (n = 168 animals for correlation figures). doi:10.1371/journal.pone.0053884.g005

infected cattle were found to present increased AFB numbers in advanced-stage granulomas [19,21]. These data are in direct contrast with the findings obtained herein and could be explained by the employment of different models of infections, i.e. experimental vs natural infection. In addition, we have performed analysis of viable bacteria, which in comparison with AFB staining, more closely reflects the *M. bovis* loads present in the bTB lesions. The encapsulation response possibly may be induced by the bacillary burden in the granulomas. Nevertheless, animals with increased numbers of thickly encapsulated lesions were found to display lower bTB-lesions dissemination, suggesting induction of a mature connective tissue in the granulomas actively participates of anti-*M. bovis* immune responses during natural infection.

The majority of pulmonary granulomas investigated in our cattle cohort presented as encapsulated lesions with multiple intragranulomatous areas of caseous necrosis and the presence of dystrophic mineralization, which according to the criteria established for granuloma in lymphoid tissue during experimental infection, can be classified as chronic bTB-lesions (stage III/IV) [19,21]. Furthermore, histomorphological analysis of the lung granulomas revealed major differences in cell type counts (Fig. 5). Consistent with these results, the process of granuloma maturation involves the migration of phagocytes and lymphocytes to the inflammation site in response to persistent mycobacterial stimuli [15,16,20,22,42]. An effective anti-mycobacteria host response primarily rely on cell-mediated immune response, controlled by cytokines such as IFN- γ produced by antigen-specific T cells [17,24,26,44,45]. Although the protective role of cell-mediated immune responses is unknown in cattle naturally infected with *M. bovis*, in the present study, we have observed significant correlations between neutrophil or Langhans' giant cell numbers and granuloma mycobacterial loads. Neutrophilic infiltrate was observed particularly in early stages of granuloma infection [19,21] and could be important for granuloma formation. Also, neutrophils have been suggested to play a regulatory anti-mycobacterial role [46,47]. We have found a positive correlation between neutrophil numbers and CFU counts, suggesting that bacillary burden induce neutrophil recruitment and/or maintenance into the granulomas. In contrast, neutrophil could potentially play a detrimental role by favoring mycobacterial growth in granulomas during natural infection [48,49]. A negative correlation between multinucleated giant cell numbers and *M. bovis* CFU counts in granulomas suggests, as expected, that activated multinucleated macrophages contribute to the control of this important bovine pathogen. Data from experimental models have demonstrated Langhans's-type multinucleated giant cells can be found in all stages of development of lymph node granulomas [19,21]. Together, our findings indicate that *M. bovis*-induced granulomas in the lungs are dynamic lesions in which the cell populations change over the course of disease, stimulating a

diverse milieu during infection. The physiopathology of this complex structure during natural infection of *M. bovis* merits further investigation.

Cattle are natural hosts of *M. bovis*, which besides being an economically important pathogen for international trade, is an imminent risk to public health. The evidence presented in this study could reflect a situation of bTB found in Brazil, which may not be transferable to other countries. Nevertheless, the data presented here offer basic information on the host response during the natural infection with *M. bovis*, which could be utilized as a potential source for biomarkers to test novel vaccine/adjunct molecule candidates as well as efficient diagnostic methods. In addition, our findings may be important to reveal new components to understand the immunopathogenesis of the bTB and contribute to the establishment of rational strategies for bTB infection surveillance and control.

Materials and Methods

Animals and Ante-mortem Evaluation

The study obtained ethical clearance from the Universidade do Estado de Santa Catarina ethical review committee (P#1.13.10). Federal government inspection abattoirs comply with PNCETB 06/2004 and MAPA 03/2000, which follow International Ethical Guidelines of Animal Welfare. The study population was comprised of 247 crossbred Holstein/Jersey cows between the ages of \sim 1.6 to 11 years which were mandatorily conducted to abattoirs after a positive reaction for the single intradermal comparative cervical tuberculin test (SICCT; PPD) following Brazilian regulations [50]. These animals derived from 18 dairy farms with intensive husbandry systems, which experienced 23 bTB outbreaks between 2009 and 2011. Farms were located in Santa Catarina State, Brazil, and maintained under surveillance control against bTB following Brazilian's regulations. SICCT tests were performed in accordance with regulations set forth by the Brazilian Department of Agriculture (MAPA) [50]. Briefly, two sites located 12 cm to 15 cm apart on the cervical area of the mid-neck were shaved and skin thickness was measured using calipers. The first site was injected with 0.1 mL of bovine PPD (PPD-B - *M. bovis* strain AN5, 1 mg protein/mL), while the second site was injected with 0.1 mL of avian PPD (PPD-A - *Mycobacterium avium* strain D4, 0.5 mg protein/mL) [50]. After 72 hours, skin thickness at the injection sites was measured, and the difference between the reaction sizes for the two injection sites was determined. An animal was classified as PPD-positive if the skin thickness at the PPD-B injection site was at least 4 mm greater than the skin thickness at the PPD-A injection site [9].

During ante-mortem analysis, animals were classified into the following three clinical stages based on symptoms observed during clinical evaluation: **absence**, absence of clinical signs; **moder-**

Table 1. Distribution and stage of histological development of primary tuberculous granulomas in cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis*.

Distribution of granulomas		Development stages of granulomas (%)			
		I	II	III	IV
Major organs/tissues					
Thorax	Lung	1.9 (3/159)	1.2 (2/159)	11.3 (13/159)	85.5 (136/159)
	Pleura	0	22.2 (4/18)	5.6 (1/18)	72.2 (13/18)
	Hearth	0	0	0	0
	Pericardia	0	0	0	100 (6/6)
Abdominal	Liver	0	12.5 (1/8)	0	87.5 (7/8)
	Spleen	0	0	16.7 (1/6)	83.3 (5/6)
	Intestine	0	0	28.6 (2/7)	71.4 (5/7)
	Mesentery	0	0	25 (2/8)	75 (6/8)
	Genito-urinary system	0	28.6 (2/7)	0	71.4 (5/7)
Carcass	Udder	0	0	0	100 (5/5)
	Other tissues	25 (1/4)	75 (3/4)	0	0
Lymph nodes					
Head	Parotid	0	16.7 (2/12)	0	83.3 (10/12)
	Retropharyngeal	4.2 (1/24)	0	16.7 (4/24)	79.2 (19/24)
	Mandibular	0	5.9 (1/17)	52.9 (9/17)	41.2 (7/17)
	Palatine tonsil	0	0	0	100 (3/3)
Thorax	Tracheobronchial	2.4 (1/42)	4.7 (2/42)	14.3 (6/42)	85.7 (36/42)
	Bronchial	1.6 (1/63)	3.2 (2/63)	4.7 (3/63)	90.5 (57/63)
	Mediastinal	4.3 (2/47)	2.1 (1/47)	4.3 (2/47)	89.4 (42/47)
Abdominal	Hepatic	0	0	22.2 (2/9)	77.8 (7/9)
	Mesenteric	0	9.1 (3/33)	12.1 (4/33)	69.7 (23/33)
Others	Iliac	0	0	0	100 (2/2)
	Sciatic	0	0	0	100 (3/3)
	Prescapular	0	14.3 (1/7)	0	85.7 (6/7)
	Precurral	0	0	0	100 (3/3)

doi:10.1371/journal.pone.0053884.t001

ate, weight loss, hypoxemia, coughing intermittently; and *severe*, extreme weight loss, weakness, hypoxemia, hemoptysis, dyspnea, progressive cough and tuberculous mastitis.

Post-mortem Examination and Pathology Analysis

All major body organs and lymph nodes were examined for the presence of visible lesions suggestive of bTB disease. Organs and lymph nodes were cross-sectioned in 0.5 cm to 1 cm intervals and examined individually for the presence of lesions. Organ and tissue samples from animals with or without bTB visible lesions (VL) were collected for *M. bovis* culture and PCR analysis as well as for histopathological examination. Only animals displaying sample tissues positive for *M. bovis* by culture, PCR or direct examination (Ziehl-Neelsen – acid fast bacilli - staining) were included in the study. The anatomical dissemination of the visible gross pathological lesions in different organs and tissues were scored according to the following system: I = presence of bTB-lesions in the lymph nodes of the head, including the left and right medial and lateral retropharyngeal, left and right mandibular, and left and right parotid lymph nodes; II = presence of bTB-lesions in thoracic lymph nodes, including the cranial and caudal mediastinal, cranial tracheobronchial, left and right tracheobronchial lymph nodes, or in abdominal lymph nodes, including mesenteric, deep and

superficial inguinal, gastric, hepatic, splenic, renal, subiliac, medial and lateral iliac lymph nodes; III = simultaneous presence of bTB-lesions in thoracic and abdominal lymph nodes, including lymph nodes already mentioned above; IV = presence of bTB-lesions in organs of the thoracic or abdominal cavity, with or without the presence of lesions in the draining lymph nodes associated with the organ; and V = simultaneous presence of bTB-lesions in organs of thoracic and abdominal cavities, with or without the presence of lesions in the draining lymph nodes associated with the organ. Out of the cattle with score IV or V, most of them (85%) displayed also lesions in draining lymph nodes.

The severity of the visible gross pathological changes in the major body organs and lymph nodes were classified by applying the semi-quantitative scoring of gross lesions previously described by Vordermeier et al. [26]. Briefly, each lung lobe, including left cranial, left caudal, right cranial, right caudal/middle, and accessory lobes, was cross-sectioned at 0.5 to 1.0 cm intervals and scored from 0 to 5 depending on the number of lesions and extent of pathology observed, 0 being no visible lesions and 5 being coalescing gross lesions. The scores of the individual lobes were summed to calculate the lung score. The major **organs/tissues**, including the pleura, pericardia, liver, spleen, intestine, mesentery, uterus, ovaries, kidney, bladder and muscular tissue,

were scored as well. The **lymph nodes**, including the mandibular, parotid, medial retropharyngeal, palatine tonsil, bronchial, mediastinal and tracheobronchial, hepatic, mesenteric, iliac, sciatic, pre-scapular and pre-crural lymph nodes, were cross-sectioned at 0.5 cm intervals and were scored using a score of 0 to 3, 0 being no visible lesions and 3 being extensive or coalescing gross lesions. Pathology scores were combined to determine mean gross pathology severity score per animal.

Bacteriology and Molecular Typing of *M. bovis* from bTB Lesions

Tissue sections collected at post-mortem from lymph node and lung samples were individually homogenized using a rotating-blade macerator system (Tissue ruptor®). One milliliter of homogenate was decontaminated and concentrated by Petroff's Sodium Hydroxide method according to [9]. Culture and enumeration of bacteria (CFU.mL⁻¹ tissue homogenate) was performed by inoculating 100 µL of decontaminated tissue homogenate in Ogawa-Kudoh (OK) agar containing sodium pyruvate (12 mg/mL) and counting colonies after aerobic incubation at 37°C for 8 weeks. After growth in OK+pyruvate, colonies were molecularly typed by PCR. Briefly, purified mycobacterial DNA from colonies extracted as previously described [51] was used as template for PCR amplification of the following multi-copy insertion gene IS1081 (~135 bp), present in the *M. tuberculosis* complex organisms (Fig. 1B) [52] and RvD1Rv2031c (~500 bp) a polymorphic region of 2900 bp in the *M. bovis* genome which was not homologous in the genomes of *M. tuberculosis* and *M. avium* (Fig. 1C) [53]."

Histopathological Analysis

Tissues samples were fixed in 10% neutral buffered formalin and dehydrated in graded ethanol solutions. After dehydration, samples were paraffin-embedded, sectioned (4 µm), and stained by hematoxylin and eosin (H&E), Masson's trichrome or AFB method. Microscopically, the granulomas from **lymph nodes** and major **organs/tissues** (pericardium, pleura, liver, spleen, intestine, mesentery, uterus, ovaries, kidney, bladder, adrenal and muscular tissue) were classified into the following four categories [21] according to the development of the lesion: stage I - initial or early lesions; stage II - solid granulomas; stage III - minimal necrosis; or stage IV - necrosis and mineralization. Additionally, three levels of granuloma encapsulation were identified following classification being proposed in this study: level I - thin encapsulation; level II - dense fibrous capsule; level III - thickly fibrous encapsulation. All **lung granulomas** were subjected to systemic histopathological examination. Specifically for the classification of lung granulomas, the following proposed criteria were used to classify in four different groups of lesions: **group I (score = 1)** granulomas circumscribed by fibrous encapsulation with

caseous necrosis areas and presence of several scattered lymphocytes and dense clusters of neutrophils near the capsule. Epithelioid macrophages and low Langhans giant cell count, which surround the necrotic areas; **group II (score = 2)** – granuloma circumscribe by fibrous encapsulation, with extensive areas of caseous necrosis. Granulomatous cellular response composed primarily of epithelioid macrophages, lymphocytes, moderate Langhans giant cell count and clusters of neutrophils, which surround the necrotic areas and extend until capsule; **group III (score = 3)** – granulomas circumscribed by fibrous encapsulation, with extensive multicentric areas of caseous necrosis and centralized dystrophic mineralization. Granulomatous cellular response composed of epithelioid macrophages and moderate amount of scattered Langhan's giant cells, which surround the necrotic areas with dense clusters of lymphocytes and few or absent clustered neutrophils near the fibrous capsule; **group IV (score = 4)** – granulomas encapsulated, with extensive multicentric areas of caseous necrosis and centralized dystrophic mineralization. Granulomatous cellular response composed of epithelioid macrophages admixed with large amount of Langhans giant cells, which surround the necrotic areas with dense clusters lymphocytes and few or absent neutrophils near the fibrous capsule. For the histopathological analysis, total number of granulomatous cellular response cells was counted in 10 microscope fields (1×100 magnification) per lung granuloma section. Mean and standard deviation were determined for each group. For coalescing or multicentric lesions in the histomorphological analysis, the primary lesion or more chronic/advanced lesion/stage was evaluated. The relative number of acid-fast bacilli (AFB) found in each ZN-stained section was estimated as well.

Statistical Analysis

Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Correlations between bacterial load, level of granuloma-encapsulation, histopathological lung-granulomatous response, gross pathology, and lesion distribution were assessed by nonparametrical analysis applying the Spearman rank correlation. Spearman's correlation coefficients (r_s) and p-values are provided.

Acknowledgments

We are grateful to CIDASC for allowing us to collect the samples used in this work.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AM AB. Performed the experiments: AM RF CR PF. Analyzed the data: AM MM AB. Contributed reagents/materials/analysis tools: AM CP AB. Wrote the paper: AB AM.

References

- World Health Organization (2008) Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing: WHO report 2008. WHO/HTM/TB/2008 393: 1–304.
- Thoen C, LoBue P, de Kantor I (2006) The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet Microbiol* 112: 339–3345.
- Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Ravigione MC, Fujikura T, et al. (1998) Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis* 4: 59–70.
- de Kantor IN, Ambroggi M, Poggi S, Morcillo N, Telles MADS et al. (2008) Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. *Tuberculosis* 88: 358–365.
- Berg S, Firdessa R, Habtamu M, Gadisa E, Mengistu A, et al. (2009) The Burden of Mycobacterial Disease in Ethiopian Cattle: Implications for Public Health. *PLoS One* 4: e5068. doi:10.1371/journal.pone.0005068.
- Hlavsa MC, Moonan PK, Cowan LS, Navin TR, Kammerer JS, et al. (2008) Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the United States, 1995–2005. *Clin Infect Dis* 47: 168–175.
- Evans JT, Smith EG, Banerjee A, Smith RM, Dale J, et al. (2007) Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. *Lancet* 369: 1270–1276.
- Renwick AR, White PCL, Bengis RG (2007) Bovine tuberculosis in southern African wildlife: a multi-species host-pathogen system. *Epidemiol Infect* 135: 529–540.
- The World Organization for Animal Health (OIE) (2011) The manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: Bovine tuberculosis. Paris: WAHID. 590 p.
- Monaghan ML, Doherty ML, Collins JD, Kazda JF, Quinn PJ (1994) The tuberculin test. *Vet Microbiol* 40: 111–124.

11. Claridge J, Diggle P, McCann CM, Mulcahy G, Flynn R (2012) *Fasciola hepatica* is associated with the failure to detect bovine tuberculosis in dairy cattle. *Nat Commun* 3: 853 doi:10.1038/ncomms1840.
12. de la Rúa-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, et al. (2006) Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci* 81: 190–210.
13. Norby B, Bartlett PC, Fitzgerald SD, Granger LM, Brunning-Fann CS, et al. (2004) The sensitivity of gross necropsy, caudal fold and comparative cervical tests for the diagnosis of bovine tuberculosis. *J Vet Diagn Invest* 16: 126–131.
14. Volkman HE, Clay H, Beery D, Chang JCW, Sherman DR, et al. (2004) Tuberculous granuloma formation is enhanced by a *Mycobacterium* virulence determinant. *PLoS Biol* 2: e367. doi:10.1371/journal.pbio.0020367.
15. Cosma CL, Humbert O, Ramakrishnan L (2004) Superinfecting mycobacteria home to established tuberculous granulomas. *Nat Immunol* 5: 828–835.
16. Ulrichs T, Kaufmann SH (2006) New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J Pathol* 208: 261–269.
17. Flynn JL, Chan J (2001) Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 19: 93–129.
18. Ramakrishnan L (2012) Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol* 12: 352–366.
19. Palmer MV, Waters WR, Thacker TC (2007) Infected with *Mycobacterium bovis* lesion development and immunohistochemical changes in granulomas from cattle experimentally. *Vet Pathol* 44: 863 doi:10.1354/vp.44-6-863.
20. Russell DG (2007) Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat Rev Microbiol* 5: 39–47.
21. Wangoo A, Johnson L, Gough J, Akbar R, Inglis S, et al. (2005) Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen, gammadelta (WC1+) T cells and CD 68+ cells. *J Comp Pathol* 133: 223–234.
22. Gil O, Diaz I, Vilaplana C, Tapia G, Diaz J, et al. (2010) Granuloma encapsulation is a key factor for containing tuberculosis infection in minipigs. *PLoS One* 5: e10030. doi:10.1371/journal.pone.0010030.
23. Thacker TC, Palmer MV, Waters WR (2007) Associations between cytokine gene expression and pathology in *Mycobacterium bovis* infected cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 119: 204–213.
24. Welsh MD, Cunningham RT, Corbett DM, Girvin RM, McNair J, et al. (2005) Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology* 114: 101–111.
25. Pollock JM, Neill SD (2002) *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet J* 163: 113–127.
26. Vordermeier HM, Chambers MA, Cockle PJ, Whelan AO, Simons J, et al. (2002) Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis. *Infect Immun* 70: 3026–3032.
27. Finlay EK, Berry DP, Wickham B, Gormley EP, Bradley DG (2012) A genome wide association scan of bovine tuberculosis susceptibility in Holstein-Friesian dairy cattle. *PLoS One* 7: e30545. doi:10.1371/journal.pone.0030545.
28. Driscoll EE, Hoffman JL, Green LE, Medley GF, Amos W (2011) A preliminary study of genetic factors that influence susceptibility to bovine tuberculosis in the British cattle herd. *PLoS One* 6: e18806. doi:10.1371/journal.pone.0018806.
29. Phillips CJ, Foster CR, Morris PA, Teverson R (2002) Genetic and management factors that influence the susceptibility of cattle to *Mycobacterium bovis* infection. *Anim Health Res Rev* 3: 3–13.
30. Brotherstone S, White IMS, Coffey M, Downs SH, Mitchell AP, et al. (2009) Evidence of genetic resistance of cattle to infection with *Mycobacterium bovis*. *J Dairy Sci* 93: 1234–1242.
31. Liebana E, Johnson L, Gough J, Durr P, Jahans K, et al. (2008) Pathology of naturally occurring bovine tuberculosis in England and Wales. *Vet J* 176: 354–360.
32. Ameni G, Aseffa A, Engers H, Young D, Gordon SV, et al. (2007) High prevalence and increased severity of pathology of bovine tuberculosis in Holsteins compared to zebu breeds under field cattle husbandry in central Ethiopia. *Clin Vaccine Immunol* 14: 1356–1361.
33. Bermingham ML, More SJ, Good M, Cromie AR, Higgins IM, et al. (2009) Genetics of tuberculosis in Irish Holstein-Friesian dairy herds. *J Dairy Sci* 92: 3447–3456.
34. Widdison S, Watson M, Coffey TJ (2009) Correlation between lymph node pathology and chemokine expression during bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 89: 17–22.
35. Neill SD, Bryson DB, Pollock JM (2001) Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis* 81: 79–86.
36. Ameni G, Vordermeier M, Firdessa R, Aseffa A, Hewinson G, et al. (2011) *Mycobacterium tuberculosis* infection in grazing cattle in central Ethiopia. *Vet J* 188: 359–361.
37. Corner LA (1994) Post-mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol* 40: 53–63.
38. Ameni G, Aseffa A, Sirak A, Engers H, Young DB, et al. (2007) Effect of skin testing and segregation on the prevalence of bovine tuberculosis, and molecular typing of *Mycobacterium bovis*, in Ethiopia. *Vet Rec* 161: 782–786.
39. Cassidy JP (2006) The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. *Vet Microbiol* 112: 151–161.
40. Dean GS, Rhodes SG, Coad M, Whelan AO, Cockle PJ, et al. (2005) Minimum infective dose of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infect Immun* 73: 6467–6471.
41. Whipple DL, Bolin CA, Miller JM (1996) Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *J Vet Diagn Invest* 8: 351–354.
42. Egen JG, Rothfuchs AG, Feng CG, Horwitz MA, Sher A, et al. (2011) Intravital imaging reveals limited antigen presentation and T cell effector function in mycobacterial granulomas immunity 34: 807–819.
43. Wedlock DN, Aldwell FE, Collins DM, De Lisle GW, Wilson T et al. (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. *Infect Immun* 67: 2172–2177.
44. Bown HJ (1996) The role of T-cell subsets in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Agents Dis* 5: 73–81.
45. Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, et al. (1993) Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med* 178: 2243–2247.
46. Feng CG, Kaviratne M, Rothfuchs AG, Cheever A, Hiery S, et al. (2006) NK cell-derived IFN-gamma differentially regulates innate resistance and neutrophil response in T cell-deficient hosts infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 177: 7086–7093.
47. Seiler P, Aichele P, Bandermann S, Hauser AE, Li B, Gerard NP, et al. (2003) Early granuloma formation after aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection is regulated by neutrophils via CXCR3-signaling chemokines. *Eur J Immunol* 33: 2676–2686.
48. Keller C, Hoffmann R, Lang R, Brandau S, Herrmann C, et al. (2006) Genetically determined susceptibility to tuberculosis in mice causally involves accelerated and enhanced recruitment of granulocytes. *Infect Immun* 74: 4295–4309.
49. Eruslanov EB, Lyadova IV, Kondratieva TK, Majorov KB, Scheglov IV, et al. (2005) Neutrophil responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection in genetically susceptible and resistant mice. *Infect Immun* 73: 1744–1753.
50. MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil (2006) Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e da tuberculose animal (PNCEBT), MAPA/SDA/DSEA, Brasília, 188 pp.
51. Wards BJ, Collins DM, de Lisle GW (1995) Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 43: 227–240.
52. Taylor GM, Worth DR, Palmer S, Jahans K, Hewinson RG (2007) Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Vet Res* 3: 12. doi:10.1186/1746-6148-3-12.
53. Rodriguez JG, Fissanoti JC, Del Portillo P, Patarroyo ME, Romano MI, et al. (1999) Amplification of a 500-basepair fragment from cultured isolates of *Mycobacterium bovis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 37: 2330–2332.