

A diversidade genética do *Mycobacterium tuberculosis* e a sua contribuição para a tuberculose

The genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis and its contribution to tuberculosis

La diversité génétique de Mycobacterium tuberculosis et sa contribution à la tuberculose

Ana I. Fernandes

i3S - Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, Porto, Portugal
Programa Doutoral em Biologia Molecular e Celular, ICBAS - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, Portugal

Tiago Beites

i3S - Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, Porto, Portugal

Margarida Saraiva

i3S - Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, Porto, Portugal
IBMC - Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto, Porto, Portugal

Resumo

Introdução: A tuberculose mantém-se um problema global, com mais de 10.6 milhões de novos casos e mais de 1.3 milhões de fatalidades por ano. Apesar de um declínio constante destes números ao longo das últimas décadas, a pandemia de COVID-19 reverteu esta tendência decrescente. É globalmente aceite que a luta contra a tuberculose passará por melhores meios de prevenção, diagnóstico e terapia. A investigação fundamental nestas áreas, e em particular a compreensão da resposta imunológica contra o *Mycobacterium tuberculosis*, é, pois, essencial. Muitos estudos mostram o papel central da resposta imunológica para o controlo da infeção por *M. tuberculosis*, evidenciando também que falhas nesta resposta conduzem frequentemente à progressão para uma doença ativa. Apesar de classicamente estes estudos serem focados nas características do hospedeiro, dados recentes apontam para um papel importante da diversidade genética do patógeno no moldar da resposta imunológica. Esta variável foi durante muito tempo negligenciada, dada a baixa diversidade genética do *M. tuberculosis*.

Objetivo: Com o advento da sequenciação de genomas completos, percebeu-se que apesar de diminuta, a diversidade genética do patógeno não é negligenciável. Nesta publicação pretendemos descrever como esta diversidade contribui ativamente para o resultado da infeção por *M. tuberculosis*.

Materiais e métodos: Neste artigo apresentamos uma revisão da literatura, baseada em artigos disponibilizados no PubMed e relatórios da Organização Mundial de Saúde pertinentes ao tema.

Resultados: Da análise efetuada apresentamos os principais argumentos que demonstram o impacto da diversidade genética do *M. tuberculosis* em vários aspetos da tuberculose e discutimos como a sua incorporação na investigação pode contribuir para o desenho de novas ferramentas mais eficazes contra esta doença.

Conclusão: As diferenças associadas às várias linhagens de *M. tuberculosis* realçam novos desafios para o estudo da

tuberculose com implicações para a sua prevenção, diagnóstico e tratamento.

Palavras-chave: Tuberculose, complexo do *Mycobacterium tuberculosis*, filogenia, severidade da doença.

Abstract

Introduction: Tuberculosis remains a global problem, with over 10.6 million new cases and more than 1.3 million fatalities each year. Despite a steady decline in these numbers over the past decades, the COVID-19 pandemic has reversed this downward trend. It is globally accepted that the fight against tuberculosis will require better means of prevention, diagnosis, and therapy. Fundamental research in these areas, particularly the understanding of the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*, is essential. Many studies highlight the central role of the immune response in controlling *M. tuberculosis* infection, also showing that failures in this response often lead to progression to active disease. Although these studies traditionally focus on host characteristics, recent data point to an important role of pathogen genetic diversity in shaping the immune response. This variable has long been neglected due to the low genetic diversity of *M. tuberculosis*.

Objective: With the advent of complete genome sequencing, we realized that, despite modest, the genetic diversity of the pathogen is not negligible. In this publication, we aim to describe how this actively contributes to the outcome of *M. tuberculosis* infection.

Materials and methods: In this article, we present a literature review based on articles available on PubMed and relevant World Health Organization reports on the subject.

Results: From the analysis conducted, we present the main arguments demonstrating the impact of *M. tuberculosis* genetic diversity on various aspects of tuberculosis and discuss how its incorporation into research can contribute to

the design of more effective tools against this disease.

Conclusion: The differences associated with various *M. tuberculosis* lineages highlight new challenges for the study of tuberculosis with implications for its prevention, diagnosis, and treatment.

Keywords: *Tuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis* complex, phylogeny, disease severity.

Résumé

Introduction: La tuberculose demeure un problème mondial, avec plus de 10,6 millions de nouveaux cas et plus de 1,3 million de décès par an. Malgré une baisse constante de ces chiffres au cours des dernières décennies, la pandémie de COVID-19 a inversé cette tendance à la baisse. Il est mondialement acquis que la lutte contre la tuberculose nécessitera de meilleurs moyens de prévention, de diagnostic et de thérapie. La recherche fondamentale dans ces domaines, en particulier la compréhension de la réponse immunitaire contre *Mycobacterium tuberculosis*, est par conséquent essentielle. De nombreuses études soulignent le rôle central de la réponse immunitaire dans le contrôle de l'infection par *M. tuberculosis*, montrant également que des défaillances dans cette réponse conduisent souvent à la progression vers une maladie active. Bien que ces études se concentrent traditionnellement sur les caractéristiques de l'hôte, des données récentes indiquent un rôle important de la diversité génétique du pathogène dans la formation de la réponse immunitaire. Cette variable a longtemps été négligée en raison de la faible diversité génétique de *M. tuberculosis*.

Objectif: Avec l'avènement du séquençage complet des génomes, on a réalisé que, bien que minime, la diversité génétique du pathogène n'est pas négligeable. Dans cette publication, nous avons l'intention de décrire comment cela contribue activement au résultat de l'infection par *M. tuberculosis*.

Matériaux et méthodes: Dans cet article, nous présentons une revue de la littérature basée sur des articles disponibles sur PubMed et des rapports pertinents de l'Organisation mondiale de la santé sur le sujet.

Résultats: De l'analyse réalisée, nous présentons les principaux arguments démontrant l'impact de la diversité génétique de *M. tuberculosis* sur divers aspects de la tuberculose et discutons de la manière dont son incorporation dans la recherche peut contribuer à la conception d'outils plus efficaces contre cette maladie.

Conclusion: Les différences associées aux diverses lignées de *M. tuberculosis* soulignent de nouveaux défis pour l'étude de la tuberculose avec des implications pour sa prévention, son diagnostic et son traitement.

Mots-clés: Tuberculose, complexe de *Mycobacterium tuberculosis*, phylogénie, gravité de la maladie.

Tuberculose: uma doença ancestral, um problema contemporâneo

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa provocada pelo patógeno *Mycobacterium tuberculosis* e que se apresenta principalmente como uma doença pulmonar [1]. A TB acompanha a humanidade desde os seus primórdios [2], estimando-se que seja responsável por mais de 1 bilhão de mortes nos últimos 200 anos e tendo sido declarada uma emergência de saúde global pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em 1993 [3]. O número de casos e mortes por TB tem diminuído de forma lenta, mas constante, desde o início do século XX, devido a melhorias nas condições de higiene e ao desenvolvimento socioeconómico. A descoberta de antibioterapia eficaz acelerou esta tendência [4]. No entanto, alguns fatores mais recentes como a epidemia causada pelo Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), o aparecimento de estirpes de *M. tuberculosis* resistentes a antibióticos e a pandemia de COVID-19, ameaçam os esforços globais para a redução dos números de TB [5, 6]. De facto, de acordo com o último relatório da OMS, em 2022, mais de 1.3 milhões de mortes foram causadas por TB. Cerca de 167,000 destas mortes foram de indivíduos positivos para o vírus da imunodeficiência humana (VIH). Estima-se ainda que tenham sido declarados cerca de 10.6 milhões de casos de TB, dos quais cerca de 410,000 são TB multirresistente. Adicionalmente, estima-se que um quarto da população mundial possua uma infeção latente [6]. A TB permanece, até aos dias de hoje, uma doença de expressão significativa.

O espectro da tuberculose: a heterogeneidade da infeção

A TB é uma doença complexa e heterogénea [7, 8]. Um indivíduo com TB diagnosticada por cultura positiva do bacilo é considerado um caso ativo de TB. Estes casos de doença ativa apresentam por norma um quadro clínico, com sintomas característicos de TB (como tosse, hemoptise, fadiga), e podem transmitir o bacilo a outros indivíduos saudáveis. A transmissão do *M. tuberculosis* ocorre normalmente quando um indivíduo saudável inala partículas de aerossóis resultantes por exemplo de episódios de tosse do paciente com TB. No entanto, a inalação destas partículas nem sempre resulta no desenvolvimento de TB. De facto, apenas uma pequena proporção de indivíduos desenvolve TB após contacto direto com o bacilo. Pensa-se que uma

parte destes indivíduos elimine a bactéria através de mecanismos associados à imunidade inata, enquanto outros são capazes de conter a infecção por via da imunidade adquirida. Mais ainda, cerca de 5-10% dos indivíduos que contactam com o *M. tuberculosis* apresentam evidência de uma infecção latente [9]. A infecção latente é definida com base na existência de resposta de memória a antígenos do *M. tuberculosis* mediada por células T e pode ser detetada por testes como o *interferon-gamma release assay* (IGRA). Um indivíduo com um resultado positivo para o IGRA e sem quadro clínico ou cultura positiva para *M. tuberculosis* é considerado latente. Apesar de saudáveis, isto é, da ausência de um quadro clínico de TB, os indivíduos com TB latente podem ser portadores da bactéria e, como tal, têm o potencial para desenvolver doença sintomática ao longo das suas vidas [10, 11]. Entre os indivíduos infetados de forma latente, aproximadamente 10% desenvolve uma TB ativa [4, 9, 12]. Esta progressão de TB latente para doença ativa resulta normalmente de uma fragilidade associada ao sistema imune, por exemplo uma infecção por VIH, ou um tratamento imunossupressor. É importante referir que atualmente a divisão da TB de forma binária, ou seja, latente ou ativa, está relativamente ultrapassada, considerando-se antes um modelo dinâmico [13, 14]. Na verdade, entre estes dois estados há todo um espectro possível, desde eliminação do patógeno com retenção de resposta T de memória, até à regressão de IGRA positivo para IGRA negativo [7, 13]. Mais ainda, o próprio quadro de TB ativa é diverso, podendo variar desde uma ligeira infiltração até uma doença pulmonar cavitária crónica e obstrutiva [1, 15]. Para além dos pulmões, o *M. tuberculosis* pode também colonizar o cérebro (causando meningite tuberculosa), o fígado, o baço e até o tecido ósseo. A variabilidade do impacto clínico observado em TB é muito dependente das características genéticas, do estilo de vida e da presença ou não de comorbilidades no hospedeiro. No entanto, dados recentes demonstram que as características intrínsecas do patógeno, assim com o equilíbrio e as interações estabelecidas com o hospedeiro, desempenham também um papel crucial [14, 15].

O complexo *Mycobacterium tuberculosis*

O *M. tuberculosis* é um bacilo ácido-resistente que pertence ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) [16, 17]. Embora os elementos do MTBC apresentem

uma elevadíssima similaridade genómica (superior a 99%), várias diferenças relevantes estão descritas, nomeadamente ao nível do seu tropismo, virulência e imunogenicidade [18, 19]. As micobactérias do MTBC apresentam um amplo espectro de hospedeiros, como por exemplo o *Mycobacterium bovis* que infeta bovinos, o *Mycobacterium pinnipedii* focas ou o *Mycobacterium microti* roedores [20–22]. O *M. tuberculosis* é o único membro do MTBC adaptado ao humano. Estudos relativamente recentes sugerem que a adaptação/co-evolução do *M. tuberculosis* com o hospedeiro humano contribuiu para a estrutura genética da bactéria que segue uma organização filogeográfica semelhante à das populações humanas [23, 24]. Na verdade, foram até à data identificadas nove linhagens filogenéticas de *M. tuberculosis*, distribuídas pelos 5 continentes. As linhagens 2, 3 e 4 estão distribuídas globalmente e as restantes apresentam distribuições geograficamente restritas [18, 25–28]. De notar que as linhagens 5 e 6 eram anteriormente designadas de *Mycobacterium africanum*, dada a sua restrição geográfica a partes da África ocidental. As diferentes linhagens de *M. tuberculosis* podem também ser classificadas como “antigas” (linhagens 1, 5, 6, 7, 8 e 9) ou “modernas” (linhagens 2, 3 e 4), de acordo com a presença ou ausência do locus *TbD1*, respetivamente [29, 30]. O sequenciamento completo do genoma de vários isolados de *M. tuberculosis* pertencentes às diferentes linhagens permitiu ainda a identificação de sublinhagens [31, 32]. Como discutido na próxima secção, apesar da elevada conservação genética entre as 9 linhagens de *M. tuberculosis*, vários estudos mostram um impacto da bactéria na indução de diferentes respostas imunes no hospedeiro, bem como nas diversas manifestações clínicas de TB [20–22].

O impacto da diversidade genética de *M. tuberculosis* na tuberculose

Os avanços recentes na investigação de TB levaram à observação fascinante de que a baixa diversidade genética existente no *M. tuberculosis* tem um impacto na apresentação da doença, na transmissão e nas respostas imunológicas do hospedeiro [18, 33, 34]. Estes aspetos são discutidos abaixo, sendo apresentada uma revisão sumária focada principalmente em estudos com humanos.

Impacto na apresentação e transmissão da TB

Relativamente ao impacto de *M. tuberculosis* na apresentação da doença, vários estudos sugerem que as es-

tirpes da linhagem 1 apresentam uma maior probabilidade de causar doença extrapulmonar do que estirpes de outras linhagens [35, 36]. A comparação com estirpes de linhagem 2 relativamente a TB extrapulmonar não é, no entanto, clara. Alguns estudos nos Estados Unidos da América sugerem efetivamente taxas mais baixas de doença extrapulmonar após infecção com estirpes da linhagem 2. No entanto, estudos no Reino Unido mostram um aumento na prevalência deste tipo de apresentação em TB resultantes de infecção por estirpes de linhagem 2 [35, 37]. De notar que estirpes da linhagem 2 são geralmente consideradas hipervirulentas, embora seja possível observar variabilidade entre sublinhagens [38, 39]. Em oposição direta à hipervirulência atribuída a estirpes de linhagem 2, as estirpes da linhagem 6 são geralmente consideradas menos virulentas, associando-se com uma progressão lenta desde a infecção até ao estabelecimento de TB ativa [40]. Estudos focados em TB causada por estirpes da linhagem 4, sublinhagem Mediterrâneo-Latino-Americana (LAM), sugerem uma associação entre a infecção por estas estirpes e a presença de consolidações no pulmão [41]. Paralelamente, indivíduos infetados com estirpes da linhagem 2 apresentam significativamente mais cavitação [42].

Um maior potencial de transmissão está associado a estirpes de linhagens mais propensas a causar danos pulmonares ou cavitação, já que a transmissão depende precisamente do desenvolvimento de uma patologia pulmonar que favoreça o expelir da bactéria [43]. Estudos epidemiológicos sugerem que estirpes de *M. tuberculosis* de linhagens “modernas” são mais transmissíveis do que aquelas de linhagens “antigas” [44]. Por exemplo, na Holanda, dados epidemiológicos demonstraram uma menor taxa de transmissão nas estirpes de linhagem 1, 5 e 6, em comparação com as estirpes da linhagem 4 [41]. Também foi relatada uma diminuição da transmissibilidade das estirpes de linhagem 5 e 6 em várias regiões da África Ocidental [45, 46]. Contudo, existem alguns relatos conflituosos. Na Gâmbia, embora a progressão para doença ativa fosse mais lenta após infecção com estirpes de linhagem 6 em comparação com estirpes de linhagens “modernas”, não foi encontrada diferença na sua transmissibilidade [40].

Em resumo, apesar da contribuição da diversidade genética do *M. tuberculosis* para o estabelecimento de TB e transmissão do bacilo ser uma evidência, mais investigação nesta área é necessária para estabelecer

relações causais robustas, bem como elucidar os mecanismos subjacentes.

Impacto na aquisição de resistência a fármacos

A resistência bacteriana a antibióticos foi identificada poucos anos depois da introdução destes fármacos na prática clínica, como no caso da penicilina [47]. A diminuição da suscetibilidade aos antibióticos engloba não só a capacidade das bactérias se multiplicarem na presença do antibiótico (resistência *stricto sensu*), mas também a sua capacidade de sobreviver ao tratamento (tolerância). A resistência bacteriana a antibióticos está associada a mutações no genoma ou à aquisição de material genético exterior (transferência horizontal de genes). Estas variantes genéticas podem afetar a ação dos antibióticos de diferentes formas: 1) alterar a capacidade de se ligar ao(s) seu(s) alvo(s); 2) ativar mecanismos compensatórios, como por exemplo enzimas que inativam o antibiótico ou bombas de efluxo que diminuem a sua concentração intracelular; 3) inativar enzimas necessárias para a ação do antibiótico [48]. A base genética destas alterações permite a fixação destas características na população, mantendo o perfil de resistência após transmissão para um novo hospedeiro.

Estimativas recentes apontam para que estirpes do *M. tuberculosis* resistentes à rifampicina sejam responsáveis por um quarto do total de mortes associadas à resistência bacteriana a antibióticos [49]. De acordo com a OMS, a resistência a antibióticos em TB pode classificar-se da seguinte forma: 1) monorresistência – resistência a um antibiótico de primeira linha; 2) polirresistência – resistência a mais do que um antibiótico de primeira linha que não isoniazida ou rifampicina; 3) multirresistência (MDR, do inglês multiple drug resistance) – resistência a, pelo menos, isoniazida e rifampicina em simultâneo; 4) resistência extensiva (XDR, do inglês extensively drug resistance) – inclui os critérios de multirresistência mais a resistência a qualquer fluoroquinolona e a pelo menos um antibiótico de segunda linha administrado intravenosamente (capreomicina, canamicina e ampicacina); 5) resistência a rifampicina – resistência a este antibiótico de primeira linha, independentemente de outras resistências presentes [50].

A resistência a antibióticos em *M. tuberculosis* tem uma natureza clonal, dando-se exclusivamente por mutações no genoma: polimorfismos ao nível de nucleótidos individuais, inserções ou deleções [51]. Um exemplo

relevante para Portugal em particular é o caso do grupo de estirpes de Lisboa. Este grupo partilha mutações no gene *inhA* que codifica para o alvo terapêutico da isoniazida e da etionamida. As mutações identificadas levam a modificações ao nível da proteína InhA capazes de diminuir a potência destes antibióticos contra o *M. tuberculosis* [52].

A diversidade intrínseca do *M. tuberculosis* tem um papel importante na capacidade de adquirir resistência a antibióticos. Diferentes estudos apontam para que estirpes das linhagens 2 e 4 tenham uma maior associação com resistência a antibióticos do que as restantes linhagens (revisto em [53]). Em específico, estirpes da linhagem 2 adquirem resistência a antibióticos mais rapidamente *in vitro*, o que pode ser devido a uma taxa de mutação mais alta ou interações com mutações pré-existentes nas estirpes desta linhagem [54]. No entanto, não se demonstrou conclusivamente que estirpes da linhagem 2 tenham maior capacidade de adquirir resistência durante a processo de infeção.

Para além da aquisição de novas mutações associadas a resistência, a diversidade genética de *M. tuberculosis* tem também impacto na suscetibilidade a fármacos - resistência intrínseca. Como anteriormente referido, a coevolução de *M. tuberculosis* com a espécie humana determinou que se tenham gerado linhagens e sublinhagens decorrentes do relativo isolamento biogeográfico [55]. Neste tópico sublinhamos três casos exemplificativos de resistência intrínseca: 1) um subgrupo de estirpes da linhagem 2 contém um polimorfismo no gene *gidB* que confere resistência a estreptomomicina (primeiro antibiótico utilizado no tratamento de TB) [56]; 2) estirpes de um subgrupo da linhagem 4 partilham um polimorfismo no gene *tlyA* que leva a resistência a capreomicina [57]; 3) dados recentes apontam para que estirpes da linhagem 1 sejam intrinsecamente mais resistentes a pretomanida [58], um antibiótico que faz parte do novo regime de tratamento para TB resistente BPAL [59].

A aplicação de medicina personalizada em TB é ainda um exercício teórico, dado que, em primeiro lugar, terá de ser priorizado o acesso aos fármacos a todas as populações afetadas por esta doença. No entanto, o conhecimento das linhagens mais prevalentes numa determinada zona geográfica pode permitir uma adaptação do tratamento para melhor servir as populações locais. Num exemplo recente, descobriu-se que um subgrupo de estirpes da linhagem 1 prevalente no Sudeste Asiá-

tico (responsáveis por cerca de 43,000 casos MDR por ano [60]) partilha uma mutação no gene *whib7* que aumenta a suscetibilidade da bactéria a macrólidos [61]. Esta informação sugere que a priorização do uso de macrólidos poderá ser uma estratégia eficiente para curar os casos de TB MDR nesta zona do globo.

Impacto na resposta imunológica

Devido à baixa diversidade genética de *M. tuberculosis*, o papel ativo do patógeno na regulação da resposta imune do hospedeiro foi durante muito tempo subestimado e considerado irrelevante. Recentemente, devido ao desenvolvimento de novas ferramentas de biologia de sistemas (*omics*), as diferenças genéticas entre as estirpes de *M. tuberculosis* e os fenótipos imunológicos e clínicos resultantes têm sido cada vez mais explorados. Progressivamente, o nosso conhecimento sobre a influência da diversidade do *M. tuberculosis* na ativação dos mediadores do sistema imunológico e como esta se articula com o estabelecimento da infeção e a progressão da doença têm avançado significativamente [43, 62].

Um dos primeiros estudos mostrando um impacto da filogenia do *M. tuberculosis* na resposta do macrófago à infeção demonstrou que não só a resposta destas células a estirpes diferentes é variada, mas também que estirpes pertencentes às linhagens ‘modernas’ de *M. tuberculosis* (ou seja, linhagens 2, 3 e 4) induzem no geral respostas inflamatórias mais baixas do que as estirpes ‘antigas’ de *M. tuberculosis* (linhagens 1, 5 e 6) [30]. O impacto da diversidade das estirpes de *M. tuberculosis* no reconhecimento da bactéria por células do sistema imune inato foi também descrito. Por exemplo, num estudo do nosso laboratório mostramos que apesar da importância do *toll-like receptor* (TLR) 2 para o reconhecimento de *M. tuberculosis* e subsequente iniciação de uma resposta inflamatória no macrófago infetado, alguns isolados clínicos ativam adicionalmente o TLR4, potenciando a produção de interferão de tipo I [63], uma molécula com um papel negativo na TB [64]. Adicionalmente, um estudo realizado no Vietname sugere fortemente a interação entre genótipos do hospedeiro e genótipos da bactéria e a sua contribuição para a apresentação da TB: estirpes da linhagem 4 demonstraram baixas taxas de TB meningítica, enquanto estirpes da linhagem 2 associaram preferencialmente a indivíduos portadores de polimorfismos no gene que codifica o TLR2 [65]. Ainda

relacionado com a ativação diferencial do macrófago, um estudo recente do nosso laboratório mostrou que certos isolados clínicos de *M. tuberculosis* da linhagem 4 têm uma maior capacidade de ativação do inflamassoma e consequente indução de produção de interleucina (IL)-1 β do que outros. Mais ainda, relacionamos a capacidade de evadir a ativação do inflamassoma com uma maior severidade de TB no paciente [66]. De notar que é atualmente evidente que as diferenças na indução da resposta imunológica resultantes da diversidade do *M. tuberculosis* não são apenas determinadas pela filogenia da bactéria, já que mesmo em estirpes da mesma linhagem ou sublinhagem, os perfis imunológicos podem variar. O grande desafio é agora encontrar determinantes moleculares dessas variações, que permitam o desenvolvimento de terapias adequadas às várias situações.

Uma nota final relativa à modulação da resposta imunológica por diferentes isolados clínicos de *M. tuberculosis* prende-se com a interação entre o sistema imune e bactérias resistentes a fármacos. Apesar desta área de extrema relevância clínica ser ainda muito recente, é já evidente que a aquisição de mutações de resistência a fármacos altera a interação da ‘nova’ bactéria com o hospedeiro (revisto em [67]). Perceber estas alterações, bem como as suas bases moleculares, são críticas para a descoberta e ajuste de novas terapias imunomoduladoras.

Conclusão

A diversidade do *M. tuberculosis* foi durante muito tempo negligenciada. Contudo, estudos recentes como os discutidos acima, revelaram um impacto desta diversidade em vários aspetos fundamentais da TB. Assim, torna-se imperativo a inclusão desta variável na investigação fundamental, bem como na interpretação de estudos epidemiológicos e no desenvolvimento de novas estratégias de prevenção, diagnóstico e terapia em TB. Para a prevenção de TB, até hoje, existe apenas uma vacina. A vacina BCG é altamente eficaz na prevenção da doença disseminada em crianças, mas a sua eficácia na prevenção de TB pulmonar em adultos é discutível [68]. Para algumas estirpes de *M. tuberculosis*, como as estirpes da linhagem 2, a vacina BCG parece conferir uma menor proteção [32]. Será, portanto, de interesse no desenvolvimento de novas vacinas a inclusão de testes de eficácia contra estirpes de diferentes linhagens. Esta

abordagem está já a ser seguida, por exemplo no desenvolvimento da vacina MTBVAC [69].

Os métodos de diagnóstico de TB têm evoluído para um diagnóstico molecular, que inclui à partida a identificação de resistência a fármacos. Ao mesmo tempo poderão permitir também uma adequação do tratamento à filogenia das estirpes de *M. tuberculosis*. Por outro lado, a deteção de latência é baseada na sensibilização imunológica. No entanto, certas estirpes de *M. tuberculosis*, nomeadamente estirpes de linhagem 6, são caracterizadas por uma resposta atenuada de células T [70], o que poderá comprometer a eficácia destes testes. Perceber em mais detalhe as características da resposta de memória gerada após infeção por *M. tuberculosis* de diferentes linhagens ou mesmo sublinhagens, poderá informar o desenvolvimento de melhores ferramentas para diagnóstico da TB, incluindo da forma latente.

A busca de novas formas de tratamento para a TB inclui novos antibióticos, mas também novas formas de modular a resposta imune de forma a maximizar o controlo bacteriano e a minimizar danos tecidulares. Estas terapias direcionadas ao hospedeiro apresentam inúmeras vantagens, mas a sua descoberta e desenvolvimento têm-se provado muito complexas [71]. Também nesta área, a inclusão da diversidade do *M. tuberculosis* será essencial, uma vez que a resposta imune e em particular a ativação de alguns dos seus componentes, depende das características da bactéria presente.

O crescente conhecimento sobre as diferenças associadas às várias linhagens de *M. tuberculosis* traz, sem dúvida, novos desafios para o estudo da TB, que podem ter implicações em todas as frentes acima mencionadas. É provável que uma solução universalmente aplicável para a TB não seja possível, mas alternativamente que soluções dirigidas às bactérias mais prevalentes numa determinada região geográfica sejam necessárias. Para o progresso desta área de estudo, a diversidade de *M. tuberculosis* tem de ser sistematicamente incorporada em todos os aspetos da investigação sobre a TB, paralelamente à diversidade do hospedeiro e à interação resultante entre os dois.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não existem conflitos de interesse relacionados com o presente artigo.

Bibliografia

- [1] Van Crevel R, Ottenhoff THM, Van der Meer JWM. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. Vol. 15, *Clinical Microbiology Reviews*. 2002. p. 294–309.
- [2] Barberis I, Bragazzi NL, Galluzzo L, Martini M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. Vol. 58, *J PREV MED HYG*. 2017.
- [3] Paulson T. A Mortal Foe. 2013.
- [4] Fogel N. Tuberculosis: A disease without boundaries. Vol. 95, *Tuberculosis*. Churchill Livingstone; 2015. p. 527–31
- [5] Lefebvre N, Falzon D. Risk factors for death among tuberculosis cases: Analysis of European surveillance data. *European Respiratory Journal*. 2008 Jun;31[6]:1256–60.
- [6] World Health Organization. Global tuberculosis report 2023 [Internet]. 2023. Available from: <https://iris.who.int/>
- [7] Pai M, Behr MA, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC, et al. Tuberculosis. Vol. 2, *Nature Reviews Disease Primers*. Nature Publishing Group; 2016.
- [8] Furin J, Cox H, Pai M. Tuberculosis. Vol. 393, *The Lancet*. Lancet Publishing Group; 2019. p. 1642–56.
- [9] Houben RMGJ, Dodd PJ. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. *PLoS Med*. 2016 Oct 1;13[10].
- [10] Drain PK, Bajema KL, Dowdy D, Dheda K, Naidoo K, Schumacher SG, et al. Incipient and Subclinical Tuberculosis: a Clinical Review of Early Stages and Progression of Infection [Internet]. 2018. Available from: <http://cmr.asm.org/>
- [11] Delogu G, Goletti D. The spectrum of tuberculosis infection: New perspectives in the era of biologics. *Journal of Rheumatology*. 2014;41(SUPPL. 91):11–6.
- [12] O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MPR. The immune response in tuberculosis. Vol. 31, *Annual Review of Immunology*. 2013. p. 475–527.
- [13] Sousa J, Saraiva M. Paradigm changing evidence that alter tuberculosis perception and detection: Focus on latency. *Infection, Genetics and Evolution*. 2019 Aug 1;72:78–85.
- [14] Lin PL, Flynn JL. The End of the Binary Era: Revisiting the Spectrum of Tuberculosis. *The Journal of Immunology*. 2018 Nov 1;201[9]:2541–8.
- [15] Cadena AM, Fortune SM, Flynn JL. Heterogeneity in tuberculosis. Vol. 17, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2017. p. 691–702.
- [16] Orgeur M, Brosch R. Evolution of virulence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Vol. 41, *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd; 2018. p. 68–75.
- [17] Keshavjee S, Farmer PE. Tuberculosis, Drug Resistance, and the History of Modern Medicine. *New England Journal of Medicine*. 2012 Sep 6;367[10]:931–6.
- [18] Coscolla M, Gagneux S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. Vol. 26, *Seminars in Immunology*. Academic Press; 2014. p. 431–44.
- [19] Bastos HNE, Machado H, Sousa J, Veiga MI, Ramos A, Carvalho T, et al. Tuberculosis severity and its association with pathogen phylogeny and properties. *European Respiratory Journal* [Internet]. 2017 Sep 1;50(suppl 61):PA3046. Available from: http://erj.ersjournals.com/content/50/suppl_61/PA3046.abstract
- [20] Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex [Internet]. Vol. 99. 2002. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.052548299
- [21] Brites D, Loiseau C, Menardo F, Borrell S, Boniotti MB, Warren R, et al. A new phylogenetic framework for the animal-adapted *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Front Microbiol*. 2018 Nov 27;9(NOV).
- [22] Brites D, Gagneux S. Co-evolution of *Mycobacterium tuberculosis* and *Homo sapiens* [Internet]. 2015. Available from: www.immunologicalreviews.com
- [23] Brites D, Gagneux S. The Nature and Evolution of Genomic Diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. In: Gagneux S, editor. *Strain Variation in the Mycobacterium tuberculosis Complex: Its Role in Biology, Epidemiology and Control* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 1–26. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-319-64371-7_1
- [24] Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Kato-Maeda M, et al. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nat Genet*. 2013 Oct;45[10]:1176–82.
- [25] Hershberg R, Lipatov M, Small PM, Sheffer H, Niemann S, Homolka S, et al. High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography. *PLoS Biol*. 2008 Dec;6[12]:2658–71.
- [26] Firdessa R, Berg S, Hailu E, Schelling E, Gumi B, Erenso G, et al. *Mycobacterium tuberculosis* lineages causing pulmonary and extrapulmonary Tuberculosis, Ethiopia. *Emerg Infect Dis*. 2013 Mar;19[3]:460–3.
- [27] Gonçalves Vasconcellos SE, Huard RC, Niemann S, Kremer K, Santos AR, Suffys PN, et al. Distinct genotypic profiles of the two major clades of *Mycobacterium africanum* [Internet]. 2010. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/10/80>
- [28] Reed MB, Pichler VK, McIntosh F, Mattia A, Fallow A, Masala S, et al. Major *Mycobacterium tuberculosis* lineages associate with patient country of origin. *J Clin Microbiol*. 2009 Apr;47[4]:1119–28.
- [29] Krishnan N, Malaga W, Constant P, Caws M, Thi Hoang Chau T, Salmons J, et al. *Mycobacterium tuberculosis* lineage influences innate immune response and virulence and is associated with distinct cell envelope lipid profiles. *PLoS One*. 2011 Sep 8;6[9].
- [30] Portevin D, Gagneux S, Comas I, Young D. Human macrophage responses to clinical isolates from the *Mycobacterium tuberculosis* complex discriminate between ancient and modern lineages. *PLoS Pathog*. 2011 Mar;7[3].
- [31] Stucki D, Brites D, Jeljeli L, Coscolla M, Liu Q, Trauner A, et al. *Mycobacterium tuberculosis* lineage 4 comprises globally distributed and geographically restricted sublineages. *Nat Genet*. 2016 Dec 1;48[12]:1535–43.
- [32] Merker M, Blin C, Mona S, Duforet-Frebourg N, Lecher S, Willery E, et al. Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage. *Nat Genet*. 2015 Mar 1;47[3]:242–9.
- [33] Bastos HN, Osório NS, Gagneux S, Comas I, Saraiva M. The trioka host-pathogen-extrinsic factors in tuberculosis: Modulating inflammation and clinical outcomes. Vol. 8, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2018.
- [34] Peters JS, Ismail N, Dippenaar A, Ma S, Sherman DR, Warren RM, et al. Genetic Diversity in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates and Resulting Outcomes of Tuberculosis Infection and Disease. *Annu Rev Genet* [Internet]. 2020;7. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-022820>
- [35] Click ES, Moonan PK, Winston CA, Cowan LS, Oeltmann JE. Relationship between *Mycobacterium tuberculosis* phylogenetic lineage and clinical site of tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*. 2012 Jan 15;54[2]:211–9.
- [36] Séraphin MN, Doggett R, Johnston L, Zabala J, Gerace AM, Lauzardo M. Association between *Mycobacterium tuberculosis* lineage and site of disease in Florida, 2009–2015. *Infection, Genetics and Evolution*. 2017 Nov 1;55:366–71.
- [37] Pareek M, Evans J, Innes J, Smith G, Hingley-Wilson S, Lougheed KE, et al. Ethnicity and mycobacterial lineage as determinants of tuberculosis disease phenotype. *Thorax*. 2013;68[3]:221–9.
- [38] De Souza GA, Fortuin S, Aguilar D, Pando RH, McEvoy CRE, Van Helden PD, et al. Using a label-free proteomics method to identify differentially abundant proteins in closely related hypo- and hypervirulent clinical *Mycobacterium tuberculosis* Beijing isolates. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2010 Nov;9[11]:2414–23.
- [39] Hanekom M, Gey Van Pittius NC, McEvoy C, Victor TC, Van Helden PD, Warren RM. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: A template for success. Vol. 91, *Tuberculosis*. 2011. p. 510–23.
- [40] De Jong BC, Hill PC, Aiken A, Awine T, Antonio M, Adetifa IM, et al. Progression to active tuberculosis, but not transmission, varies by *Mycobacterium tuberculosis* lineage in the Gambia. *Journal of Infectious Diseases*. 2008 Oct 1;198[7]:1037–43.
- [41] Nebenzahl-Guimaraes H, Verhagen LM, Borgdorff MW, Van Soolingen D. Transmission and progression to disease of *Mycobacterium tuberculosis* phylogenetic lineages in the Netherlands. *J Clin Microbiol*. 2015 Oct 1;53[10]:3264–71.
- [42] Thwaites G, Caws M, Chau TTH, D'Sa A, Lan NTN, Huyen MNT, et al. Relationship between *Mycobacterium tuberculosis* genotype and the clinical phenotype of pulmonary and meningeal tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2008;46[4]:1363–8.
- [43] Coscolla M. Biological and Epidemiological Consequences of MTBC Diversity. In: Gagneux S, editor. *Strain Variation in the Mycobacterium tuberculosis Complex: Its Role in Biology, Epidemiology and Control* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 95–116. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-319-64371-7_5
- [44] Buu TN, van Soolingen D, Huyen MNT, Lan NTN, Quy HT, Tiemersma EW, et al. Increased transmission of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains associated with resistance to streptomycin: A population-based study. *PLoS One*. 2012 Aug 13;7[8].
- [45] Niobe-Eyangoh SN, Kuaban C, Sorlin P, Cunin P, Thomon J, Sola C, et al. Genetic biodiversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from patients with pulmonary tuberculosis in Cameroon. *J Clin Microbiol*. 2003 Jun 1;41[6]:2547–53.
- [46] Groenheit R, Ghebremichael S, Svensson J, Rabna P, Colombatti R, Riccardi F, et al. The Guinea-Bissau Family of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Revisited. *PLoS One*. 2011;6[4].
- [47] Abraham EP, Chain E. An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. *Nature* [Internet]. 1940;146(3713):837. Available from: <https://doi.org/10.1038/146837a0>
- [48] Davies J. Origins and evolution of antibiotic resistance. Vol. 12, *Microbiologia*

(Madrid, Spain). 1996. p. 9–16.

[49] O'Neill J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendation. The Review on Antimicrobial Resistance. 2016.

[50] World Health Organization. Definitions and reporting framework for tuberculosis-2013 revision.

[51] Boritsch EC, Khanna V, Pawlik A, Honoré N, Navas VH, Ma L, et al. Key experimental evidence of chromosomal DNA transfer among selected tuberculosis-causing mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Aug 30;113(35):9876–81.

[52] Machado D, Perdigão J, Ramos J, Couto I, Portugal I, Ritter C, et al. High-level resistance to isoniazid and ethionamide in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* of the Lisboa family is associated with inhA double mutations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013 Aug;68[8]:1728–32.

[53] Gygli SM, Borrell S, Trauner A, Gagneux S. Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Mechanistic and evolutionary perspectives. Vol. 41, *FEMS Microbiology Reviews*. Oxford University Press; 2017. p. 354–73.

[54] Ford CB, Shah RR, Maeda MK, Gagneux S, Murray MB, Cohen T, et al. *Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis. *Nat Genet*. 2013 Jul;45[7]:784–90.

[55] Gagneux S. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. Vol. 16, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group; 2018. p. 202–13.

[56] Spies FS, Ribeiro AW, Ramos DF, Ribeiro MO, Martin A, Palomino JC, et al. Streptomycin resistance and lineage-specific polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* gidB gene. *J Clin Microbiol*. 2011 Jul;49[7]:2625–30.

[57] Merker M, Kohl TA, Barilar I, Andres S, Fowler PW, Chryssanthou E, et al. Phylogenetically informative mutations in genes implicated in antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Genome Med*. 2020 Mar 6;12(1).

[58] Bateson A, Ortiz Canseco J, McHugh TD, Witney AA, Feuerriegel S, Merker M, et al. Ancient and recent differences in the intrinsic susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* complex to pretomanid. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2022;77[6]:1685–93. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/35260883>

[59] Conradie F, Diacon AH, Ngubane N, Howell P, Everitt D, Crook AM, et al. Treatment of Highly Drug-Resistant Pulmonary Tuberculosis. *New England Journal of Medicine*. 2020 Mar 5;382[10]:893–902.

[60] Netikul T, Palittapongarnpim P, Thawornwattana Y, Plitphongphanphim S. Estimation of the global burden of *Mycobacterium tuberculosis* lineage I. *Infection, Genetics and Evolution* [Internet]. 2021;91:104802. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156713482100099X>

[61] Li S, Poulton NC, Chang JS, Azadian ZA, DeJesus MA, Ruecker N, et al. CRIS-PRi chemical genetics and comparative genomics identify genes mediating drug potency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Microbiol*. 2022 Jun 1;7[6]:766–79.

[62] Tientcheu LD, Koch A, Ndengane M, Andoseh G, Kampmann B, Wilkinson RJ. Immunological consequences of strain variation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Vol. 47, *European Journal of Immunology*. Wiley-VCH Verlag; 2017. p. 432–45.

[63] Carmona J, Cruz A, Moreira-Teixeira L, Sousa C, Sousa J, Osorio NS, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Strains Are Differentially Recognized by TLRs with an Impact on the Immune Response. *PLoS One*. 2013 Jun 26;8[6].

[64] Lúcia Moreira-Teixeira, Mayer-Barber K, Sher A, O'Garra A. Type I interferons in tuberculosis: Foe and occasionally friend. Vol. 215, *Journal of Experimental Medicine*. Rockefeller University Press; 2018. p. 1273–85.

[65] Caws M, Thwaites G, Dunstan S, Hawn TR, Lan NTN, Thuong NTT, et al. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*. 2008;4[3].

[66] Sousa J, Cá B, Maceiras AR, Simões-Costa L, Fonseca KL, Fernandes AI, et al. *Mycobacterium tuberculosis* associated with severe tuberculosis evades cytosolic surveillance systems and modulates IL-1 β production. *Nat Commun*. 2020 Dec 1;11(1).

[67] Bobba S, Khader SA. Rifampicin drug resistance and host immunity in tuberculosis: more than meets the eye. Vol. 44, *Trends in Immunology*. Elsevier Ltd; 2023. p. 712–23.

[68] Delogu G, Proveddi R, Sali M, Manganeli R. *Mycobacterium tuberculosis* virulence: Insights and impact on vaccine development. Vol. 10, *Future Microbiology*. Future Medicine Ltd.; 2015. p. 1177–94.

[69] Pérez I, Uranga S, Sayes F, Frigui W, Samper S, Arbués A, et al. Live attenuated TB vaccines representing the three modern *Mycobacterium tuberculosis* lineages reveal that the Euro–American genetic background confers optimal vaccine potential. *EBioMedicine*. 2020 May 1;55.

[70] De Jong BC, Hill PC, Brookes RH, Gagneux S, Jeffries DJ, Otu JK, et al. *Mycobacterium africanum* Elicits an Attenuated T Cell Response to Early Secreted Antigenic Target, 6 kDa, in Patients with Tuberculosis and Their Household Contacts [Internet]. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article/193/9/1279/1013582>

[71] Zumla A, Maeurer M, Chakaya J, Hoelscher M, Ntoumi F, Rustomjee R, et al. Towards host-directed therapies for tuberculosis. Vol. 14, *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group; 2015. p. 511–2.