

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Bruna Peres Sabagh

**ESTUDO DE ASPECTOS FENOTÍPICOS DA CEPA *Mycobacterium abscessus*
subsp. *bolletii* TOLERANTE AO GLUTARALDEÍDO ENVOLVIDA EM SURTOS
OCORRIDOS EM DIVERSOS ESTADOS BRASILEIROS**

Rio de Janeiro

2017

Bruna Peres Sabagh

**ESTUDO DE ASPECTOS FENOTÍPICOS DA CEPA *Mycobacterium abscessus*
subsp. *bolletii* TOLERANTE AO GLUTARALDEÍDO ENVOLVIDA EM SURTOS
OCORRIDOS EM DIVERSOS ESTADOS BRASILEIROS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária

Orientadoras: Maria Helena S. Villas Bôas
Monique R. O. Trugilho

Rio de Janeiro

2017

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Sabagh, Bruna Peres

Estudo de aspectos fenotípicos da cepa *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* tolerante ao glutaraldeído envolvida em surtos ocorridos em diversos estados brasileiros./ Bruna Peres Sabagh. – Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2017.

150 f.: il.

Study of phenotypic aspects of the strain *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* glutaraldehyde tolerant involved in outbreaks in several Brazilian states

Bruna Peres Sabagh

**ESTUDO DE ASPECTOS FENOTÍPICOS DA CEPA *Mycobacterium abscessus*
subsp. *bolletii* TOLERANTE AO GLUTARALDEÍDO ENVOLVIDA EM SURTOS
OCORRIDOS EM DIVERSOS ESTADOS BRASILEIROS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Verônica Viana Vieira (Doutora)
Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ)

Raphael Hirata Júnior (Doutor)
Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ)

Ana Gisele da Costa Neves Ferreira (Doutora)
Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ)

Maria Helena Simões Villas Bôas (Doutora) - Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ)

Monique Ramos de Oliveira Trugilho (Doutora) – Orientadora
Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ)

Dedico à minha filha, Beatriz,
minhas irmãs e minha mãe, pela infinita paciência,
compreensão e apoio em todos os momentos.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas especiais contribuíram para realização e finalização deste trabalho:

- Às minhas orientadoras Dra. Maria Helena Simões Villas Bôas e Monique Ramos de Oliveira Trugilho, por sempre terem me incentivado, me apoiado e me compreendido nas horas mais difíceis, isto foi muito importante para a finalização deste trabalho. Obrigada pela amizade, dedicação, inúmeros ensinamentos, atenção, paciência, por terem me aturado e confiado em mim. Em especial, um muito obrigado gigante (rs) à grande amiga, mãe e “terapeuta”, Maria Helena S. V. Bôas, pelos ensinamentos diários, não só de bancada, mas de experiência de vida!!
- Às minhas amigas Aline Souto, Bruna Guedes, Cátia Cristina e, meu amigo Rodrigo Rollin pela grande e verdadeira amizade. Obrigada por todo companheirismo, conversas e risadas que foram muito importantes para mim.
- A todos os amigos do Setor de Saneantes, em especial as amigas Karyne, Gabriela, Gabrielle, Daniela, Liliane, Célia Romão e minha ex-aluna PIBITI Jéssica, sempre solícitos e ajudando em pequenas coisas que fizeram toda a diferença. Além disto, pelas risadas e companheirismo que tornaram o trabalho mais prazeroso.
- Aos colegas do departamento de Microbiologia, Carlos, Carolina, Cátia Chaia, Cláudia Souto, Eliana, Esther, João, Marília, Nathália, Rafael Vasconcelos, Rafael Lawson, Renata Trotta, Talita, Valéria, pela amizade e incentivo;
- À Verônica Viana Vieira pelo intenso apoio, colaboração como pesquisadora e revisora deste trabalho.
- Ao Dr. Raphael Hirata por ter me apoiado, incentivado e pela infinita ajuda para realização deste trabalho, sem ela com certeza não teria chegado até o final.
- À Dra. Ana Gisele que desde o início me orientou e auxiliou para realização da análise proteômica e, pela intensa colaboração para realização deste trabalho.

- Ao Dr. Marcos Catanho pela grande ajuda na realização da análise funcional das proteínas e pela paciência comigo.
- Ao Dr. Rafael Silva Duarte da UFRJ e à Dra. Maria Cristina Lourenço do INI pela colaboração para realização deste trabalho.
- Às meninas do Laboratório de Toxinologia do IOC Joelma, Surza, Priscila e Viviane Bastos pela grande ajuda e carinho.
- Aos funcionários da Coordenação de Pós-Graduação sempre prestativos quando precisei.
- Aos funcionários da Central de Esterilização e do Setor de Meios de Cultura, pela disponibilidade e presteza sempre que solicitados, e em especial à grande amiga Cátia Cristina S. do Nascimento, sempre sorridente e disposta a ajudar a qualquer hora e, isso foi fundamental para realização deste trabalho.
- À minha professora Marcelle e minhas companheiras de ginástica, em especial Bruna, Rosane, Valéria, Esther, Eliana e Erika pela amizade, carinho e muitas gargalhadas.
- À minha amada filha Beatriz, que ilumina a minha vida diariamente. Que você tenha muito orgulho da mamãe.
- Ao meu ex-marido Mauricio pelo carinho, amizade, confiança e incentivo em vários os momentos.
- Às minhas queridas irmãs, pelo constante incentivo, amor, paciência e torcida para que este sonho se tornasse realidade.
- À minha mãe, que me ajudou tanto neste momento final tão difícil, pela paciência eterna, pelo incentivo e amor.
- À minha segunda mãe, Márcia, pelo amor, carinho, incentivo e por se orgulhar de mim sempre.
- Ao meu pai (*in memorian*), que tenho certeza que sempre esteve ao meu lado e muito orgulhoso. Muitas saudades de você, papai...
- À minha eterna sogrinha (*in memorian*), que sempre me acolheu e me amou como filha. Obrigada por tudo que fez por mim...nunca a esquecerei...
- À amiga Neide Miyazaki (*in memorian*), que se não fosse por ela talvez não tivesse chegado até aqui. Obrigada por tudo que fez por mim. Saudades eternas...

Atravessaste provas
Que não imaginavas...

Deixaste para trás
Tantas dificuldades...

Venceste desafios
Que quase te arrasaram...

Sustentaste o equilíbrio
Ante a queda iminente...

Lutaste a vida inteira,
Sempre fiel ao bem...

Agradece ao Senhor,
Que te amparou as forças.

Irmão José
Psicografado por Chico Xavier

RESUMO

Em 2008, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) divulgou uma nota técnica, informando, que de 2003 até 2008, haviam sido notificados mais de 2.000 casos de infecções hospitalares por Micobactérias de Crescimento Rápido em hospitais particulares do país, relacionados principalmente a procedimentos videolaparoscópicos. Um fator comum foi a predominância de um determinado clone de *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*, que acometeu principalmente a pele e o tecido celular subcutâneo dos pacientes. Após esses surtos, várias medidas foram tomadas pela Anvisa, entre elas, a suspensão da esterilização química por imersão de instrumental cirúrgico em qualquer agente esterilizante líquido. As investigações concluíram que os surtos se deviam a falhas no reprocessamento de equipamentos médicos críticos, que eram esterilizados principalmente pelo uso de glutaraldeído a 2%. Essas decisões se basearam em observações empíricas, pautadas exclusivamente na observação do que estava ocorrendo na prática hospitalar. Até hoje não foi elucidada a relação de *M. abscessus* subsp. *bolletii* e a sua alta tolerância ao glutaraldeído. O objetivo deste estudo foi avaliar em paralelo as cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii*, CBRVS 00594 (altamente tolerante - AT) e CRM 270 (médio tolerante - MT), a fim de contribuir para a elucidação dos mecanismos que conferem resistência ao glutaraldeído. Para tal, foi utilizada a abordagem proteômica para analisar o perfil de proteínas expressas pelas duas cepas e também foi verificada a formação de biofilme em diferentes concentrações de glutaraldeído. Os resultados da análise comparativa da formação de biofilme por *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 demonstraram que o microrganismo foi capaz de formar biofilme tanto no disco de policarbonato quanto no de aço inox, mesmo em concentrações elevadas de glutaraldeído. Houve redução da formação de biofilme quando o microrganismo foi exposto às concentrações de 1,0% e 1,5% de glutaraldeído, sem que fosse observada sua total destruição. Na análise por microscopia epifluorescente, foi verificada a presença de aglomerados e de bactérias isoladas, tanto na ausência quanto na presença de diferentes concentrações de glutaraldeído. Todas as cepas analisadas pela microscopia de varredura confocal a laser desenvolveram o biofilme após 7 e 14 dias de incubação. Porém, após 14 dias de incubação, o microrganismo demonstrou uma considerável

diminuição da quantidade de células viáveis na presença e ausência de glutaraldeído. Foi observada também a presença de células viáveis no biofilme, mesmo após 14 dias de crescimento, na presença de altas concentrações de glutaraldeído. Após análise quantitativa usando técnicas proteômicas, inferimos 4.126 proteínas na cepa AT e 4.041 na cepa MT. Considerando o perfil de sensibilidade das cepas (diferentes condições biológicas), foram identificadas 189 e 185 proteínas presentes em apenas uma condição biológica, MT ou AT, respectivamente. Além disso, foram inferidas 3.971 proteínas em comum. O número total de proteínas diferencialmente abundantes nas comparações entre as duas cepas foi de 304. A análise funcional das proteínas de interesse mostrou proteínas relacionadas à patogenicidade, à regulação, ao transporte, às enzimas modificadoras de antibióticos, à bomba de efluxo, entre outros. Esperamos que os dados obtidos com a realização deste trabalho possam contribuir de maneira efetiva no controle e prevenção dessas infecções.

Palavras-chave: MCR. *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*. Glutaraldeído. Proteoma. Biofilme. Vigilância Sanitária.

ABSTRACT

In 2008, the National Health Surveillance Agency (Anvisa) issued a technical note, reporting that, from 2003 to 2008, more than 2,000 cases of hospital infections due to Rapid Growth Mycobacteria had been reported in private hospitals in the country, mainly related to videolaparoscopic procedures. A common factor was the predominance of a clone of *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* that mainly affected the skin and the subcutaneous cellular tissue of the patients. After these outbreaks, several measures were taken by Anvisa, among them, the suspension of chemical sterilization by immersion of surgical instruments in any liquid sterilizing agent. The investigations concluded that the outbreaks were due to failures in the reprocessing of critical medical equipment, which was sterilized mainly by the use of 2% glutaraldehyde. These decisions were based on empirical observations, based exclusively on the observation of what was happening in hospital practice. To date, it was not clear the relation of *M. abscessus* subsp. *bolletii* and its high tolerance to glutaraldehyde. The objective of this study is to evaluate in parallel the strains of *M. abscessus* subsp. *bolletii*, INCQS nº 00594 (highly tolerant - AT) and CRM 270 (medium tolerant - MT), in order to contribute to the elucidation of the mechanisms that confer resistance to glutaraldehyde. For that, we have used the proteomic approach to analyze the profile of proteins expressed among the two strains and also verified the formation of biofilm under different concentrations of glutaraldehyde. The results of the comparative analysis of biofilm formation by *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 demonstrated that the microorganism was able to form biofilm on both the polycarbonate disc and the stainless steel disc, even at high concentrations of glutaraldehyde. There was a reduction in biofilm formation when the microorganism was exposed to concentrations of 1.0 and 1.5% glutaraldehyde, without its complete destruction. In the analysis by epifluorescent microscopy, the presence of clusters and isolated bacteria was verified, both in the absence and in the presence of different glutaraldehyde concentrations. All samples analyzed by laser confocal scanning microscopy developed the biofilm after 7 and 14 days of incubation. However, after 14 days of incubation, the microorganism demonstrated a considerable decrease in the amount of viable cells in the presence and absence of glutaraldehyde. It was also observed the presence of viable cells in the biofilm, even

after 14 days of growth, in the presence of high concentrations of glutaraldehyde. After quantitative analysis using proteomic techniques, we inferred 4,126 proteins in the AT strain and 4,041 in the MT strain. Considering the sensitivity profile of the strains (different biological conditions), we identified 189 and 185 proteins present in only one biological condition, MT or AT, respectively. In addition, 3,971 common proteins were inferred. The total number of differentially abundant proteins in the comparisons between the two strains was 304. Functional analysis of the proteins of interest showed proteins related to pathogenicity, regulation, transport, antibiotic modifying enzymes, efflux pump, among others. We hope that the data obtained with this work can contribute effectively to the control and prevention of these infections.

Keywords: *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*. Glutadaldehide. Biofilm. Health Surveillance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da parede celular de micobactérias.	25
Figura 2. Esquema da transferência dos cilindros entre os tubos utilizados no Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida, da Association of Official Analytical Chemists (AOAC), conforme descrito no Procedimento Operacional Padronizado (POP) INCQS nº 653240.009.	64
Figura 3. Observação microscópica de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CBRVS 00594 na ausência de glutaraldeído..	84
Figura 4. Observação microscópica de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CBRVS 00594 na presença de glutaraldeído a 0,5%.....	85
Figura 5. Observação microscópica de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CBRVS 00594 na presença de glutaraldeído a 1,0%.....	85
Figura 6. Observação microscópica de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CBRVS 00594 na presença de glutaraldeído a 1,5%.....	86
Figura 7. Análise estrutural do biofilme de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CBRVS 00594 (sem glutaraldeído - 7 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit Live/Dead BacLight.....	88
Figura 8. Análise estrutural do biofilme de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CBRVS 00594 (0,5% de glutaraldeído - 7 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit Live/Dead BacLight.....	88
Figura 9. Análise estrutural do biofilme de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CBRVS 00594 (1,0% de glutaraldeído - 7 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit Live/Dead BacLight.....	89
Figura 10. Análise estrutural do biofilme de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CBRVS 00594 (1,5% de glutaraldeído - 7 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit Live/Dead BacLight.....	89
Figura 11. Análise estrutural do biofilme em 2D de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CBRVS 00594 (sem glutaraldeído - 7 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit Live/Dead BacLight.....	91
Figura 12. Análise estrutural do biofilme em 3D de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CBRVS 00594 (sem glutaraldeído - 7 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit Live/Dead BacLight.....	91

Figura 13. Análise estrutural do biofilme em 2D de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CBRVS 00594 (0,5% de glutaraldeído - 7 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit Live/Dead BacLight.....	92
Figura 14. Análise estrutural do biofilme em 3D de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CBRVS 00594 (0,5% de glutaraldeído - 7 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit Live/Dead BacLight.....	92
Figura 15. Análise estrutural do biofilme em 2D de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CBRVS 00594 (1,0% de glutaraldeído - 7 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit Live/Dead BacLight.....	93
Figura 16. Análise estrutural do biofilme em 3D de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CBRVS 00594 (1,0% de glutaraldeído - 7 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit Live/Dead BacLight.....	93
Figura 17. Análise estrutural do biofilme em 2D de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CBRVS 00594 (1,5% de glutaraldeído - 7 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit Live/dead BacLight..	94
Figura 18. Análise estrutural do biofilme em 3D de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CBRVS 00594 (1,5% de glutaraldeído - 7 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit Live/Dead BacLight.....	94
Figura 19. Análise estrutural do biofilme em 2D de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CBRVS 00594 (sem glutaraldeído - 14 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit Live/Dead BacLight.....	96
Figura 20. Análise estrutural do biofilme em 3D de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CBRVS 00594 (sem glutaraldeído - 14 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit Live/Dead BacLight.....	96
Figura 21. Análise estrutural do biofilme em 2D de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CBRVS 00594 (0,5% de glutaraldeído - 14 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit Live/Dead BacLight.....	97
Figura 22. Análise estrutural do biofilme em 3D de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CBRVS 00594 (0,5% de glutaraldeído - 14 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit Live/Dead BacLight.....	97
Figura 23. Análise estrutural do biofilme em 2D de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CBRVS 00594 (1,0% de glutaraldeído - 14 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit Live/Dead BacLight.....	98

Figura 24. Análise estrutural do biofilme em 3D de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CBRVS 00594 (1,0% de glutaraldeído - 14 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit Live/Dead BacLight.....	98
Figura 25. Análise estrutural do biofilme em 2D de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CBRVS 00594 (1,5% de glutaraldeído - 14 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit Live/Dead BacLight.....	99
Figura 26. Análise estrutural do biofilme em 3D de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CBRVS 00594 (1,5% de glutaraldeído - 14 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit Live/Dead BacLight.....	99
Figura 27. Perfil de proteínas totais das amostras em SDS-PAGE a 12%.....	103
Figura 28. Diagrama de Venn da área proporcional em elipses mostrando o número de proteínas identificadas nas cepas CRM 270 (MT) e CBRVS 00594 (AT).....	107
Figura 29. <i>Volcano plot</i> – Análise pareada das proteínas inferidas entre as cepas de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CRM 270 (MT) e CBRVS 00594 (AT). Erro! Indicador não definido.	
Figura 30. Classificação funcional das proteínas selecionadas da cepa <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CBRVS 00594 (AT) segundo o <i>Gene Ontology</i>	111
Figura 31. Classificação funcional das proteínas selecionadas da cepa <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CRM 270 (MT) segundo o <i>Gene Ontology</i> ..	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados esperados nos testes bioquímicos para identificação do grupo <i>M. chelonae</i> – <i>M. abscessus</i>	78
Tabela 2. Formação de biofilme nos discos de aço inox (AI) por <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CBRVS 00594 na presença de diferentes concentrações de glutaraldeído...80	
Tabela 3. Formação de biofilme nos discos de policarbonato (PC) por <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CBRVS 00594 na presença de diferentes concentrações de glutaraldeído.....	81
Tabela 4. Dosagens de proteínas totais das amostras de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> INCQS nº 00594 e CRM 270.....	103
Tabela 5. Concentração dos peptídeos e a corrente iônica total das amostras de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> AT e MT.....	105
Tabela 6. Número absoluto dos peptídeos identificados e proteínas inferidas nos grupos biológicos.	106
Tabela 7. Resumo das proteínas descritas neste trabalho.	115
Tabela 8. Resumo dos genes e possíveis mecanismos envolvidos na resistência natural de <i>M. abscessus</i>	43

SIGLAS E ABREVIATURAS

AAA+	ATPases associadas a diversas atividades celulares
ADP	Adenosina difosfato
AI	Aço inox
AI	Auto indutor
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
AGC	<i>Automatic Gain Control</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
APH	Aminoglicosídeos fosfotransferase
ARGOT	<i>Annotation Retrieval of Genel Ontology Terms</i>
AT	Altamente tolerante
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BAAR	Bacilos Álcool Ácido Resistentes
BCA	Ácido bicinechônico
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BR	Brasil
BSA	Albumina bovina sérica
CC	Componente celular
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i>
CID	<i>Collision-Induced Dissociation</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
Cm	Centímetros
CMHCA	Caldo Müeller Hinton II cátion ajustado
CBRVS	Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica

DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMB	Etambutol
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
FASP	<i>Filter aided sample preparation</i>
FDR	<i>False discovery rate</i>
FM	Função molecular
FQ	Fluoroquinolona
G	Gramma
GO	<i>Gene ontology</i>
GPL	Glicopeptídeolipídeos
GTP	Proteína de ligação a guanósina trifosfato
h	Horas
HCD	Dissociação induzida por colisão
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
I	Intermediário
IAA	Iodoacetamida
ICR	Ressonância ciclôtrônica de íons
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IMPPG	Instituto Microbiologia Professor Paulo de Góes
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INH	Isoniazida
INI	Instituto Nacional de Infectologista Evandro Chagas
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IT	Armadilha de íons tridimensional
K	Meio de Kirchner
kDa	Quilodaltons
kV	Quilovolts
LASIK	<i>Laser-Assisted in Situ Keratomileusis</i>
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
LT	Armadilha linear de íons
M	Molar
MAC	Complexo <i>Mycobacterium avium</i>

MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>
MCL	Micobactéria de crescimento lento
MCR	Micobactéria de crescimento rápido
min	Minuto
MFS	<i>Major Family Facilitador</i>
mL	Mililitros
mm	Milímetro
mM	MiliMolar
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MS1	Primeiro nível de espectro de massas
MS2 ou MS/MS	Segundo nível de espectros de massas
MT	Médio tolerante
m/v	Massa/volume
MVCL	Microscopia de varredura confocal a laser
m/z	Relação massa/carga
nº	Número
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nESI	<i>Nano electrospray Ionization</i>
nLC	<i>Nano liquid chromatography</i>
nm	Nanômetro
OBO	<i>Open Biomedical Ontologies</i>
PAGE	<i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
Pb	Pares de base
PB	Caldo Proskauer-Beck modificado
PBS	Tampão fosfato de sódio
PC	Policarbonato
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PE	Fosfatidiletanolamina
PEBP	Proteínas de ligação à fosfatidiletanolamina
pH	Potencial hidrogeniônico
PKnG	Proteína quinase G
POP	Procedimento operacional padronizado
Ppm	Parte por milhão
PSM	<i>Peptide Spectrum Match</i>

PZA	Pirazinamida
Q	Quadrupolo
QS	<i>Quorum sensing</i>
R	Resistente
RNA	Ácido ribonucleico
RND	<i>Resistance-nodulation-division</i>
S	Sensível
SBP	<i>Substrate binding protein</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SEPro	<i>Search Engine Processor</i>
sHsps	Pequenas proteínas de choque térmico
SMR	<i>Small multidrug resistance family</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TB	Tuberculosa
TFA	Ácido trifluoroacético
TNF α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TOF	<i>Time of Flight</i>
Tris-HCl	Tris (hidroximetil) aminometano
UFC	Unidade formadora de colônia
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
V	Volts
v/v	Volume/volume
°C	Grau Celsius
%	Percentual
μ L	Microlitro
μ m	Micrômetro
x g	Força g
2D	Bidimensional
2DGE	<i>2-D gel electrophoresis</i>
3D	Tridimensional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 MICOBACTÉRIAS.....	24
1.2 MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO.....	26
1.3 INFECÇÕES POR MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO	27
1.3.1 Casos e surtos no Brasil.....	29
1.4 FATORES DE VIRULÊNCIA	32
1.4.1 Formação de biofilme	32
1.4.1.1 <i>Glicopeptideolipídeos</i>	34
1.4.2 Resistência aos antimicrobianos	35
1.5 FONTES DE INFECÇÃO	37
1.6 TOLERÂNCIA AO GLUTARALDEÍDO	38
1.7 MECANISMO DE TOLERÂNCIA	42
1.8 A ABORDAGEM PROTEÔMICA.....	45
1.8.1 <i>Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)</i>	46
1.8.2 Estudos proteômicos em micobactérias	51
1.9 JUSTIFICATIVA	53
2 OBJETIVOS	55
2.1 OBJETIVO GERAL	55
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
3 MATERIAS E MÉTODOS	56
3.1 CEPAS BACTERIANAS.....	56
3.1.1 Manutenção de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CBRVS 00594	56
3.1.2 Manutenção de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CRM 270	56
3.1.3 Confirmação da identificação das cepas bacterianas	57
3.1.4 Avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos.....	57
3.2 PRODUTOS	59
3.3 AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA DAS CEPAS FRENTE AO GLUTARALDEÍDO	59
3.3.1 Preparo da cultura teste de <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> INCQS nº 00594 e CRM 270	59
3.3.2 Realização do Método.....	59
3.3.3 Controles	60
3.3.4 Leitura e interpretação dos resultados	63
3.4 OBTENÇÃO DO BIOFILME	64
3.4.1 Preparação dos materiais.....	65
3.4.2 Crescimento do biofilme	65

3.4.3	Quantificação do biofilme por contagem das unidades formadoras de colônias	66
3.4.4	Análise do biofilme por microscopia	66
3.4.5	Análise estatística	67
3.4.6	Microscopia de Varredura Confocal a Laser (MVCL)	67
3.4.7	Quantificação do biofilme por contagem das unidades formadoras de colônias em superfície de vidro	68
3.5	ANÁLISE PROTEÔMICA	69
3.5.1	Padronização do inóculo das cepas utilizadas no estudo visando a extração de proteínas	69
3.5.2	Extração das proteínas	70
3.5.3	Dosagem de proteínas pelo ácido bicinchonínico	70
3.5.4	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e revelação por impregnação por prata	71
3.5.5	Digestão das amostras pelo método <i>Filter Aided Sample Preparation</i> (FASP) e dessalinização	72
3.5.6	Análise dos peptídeos por espectrometria de massas	73
3.5.7	Análise dos dados	75
3.5.8	Análise de enriquecimento de termos ontológicos para as proteínas	76
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
4.1	CONFIRMAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS E AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	78
4.2	AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA DAS CEPAS FRENTE AO GLUTARALDEÍDO	79
4.3	ANÁLISE BIOFILME	80
4.3.1	Análise quantitativa do biofilme em concentrações subinibitórias de glutaraldeído	80
4.3.2	Análise qualitativa do biofilme em concentrações subinibitórias de glutaraldeído	84
4.3.2.1	<i>Microscopia Epifluorescente</i>	84
4.3.2.2	<i>Microscopia Confocal de Varredura a Laser</i>	87
4.4	ANÁLISE PROTEÔMICA	102
4.4.1	Preparo das amostras	103
4.4.3	Classificação funcional das proteínas	109
4.4.3.1	<i>Classificação funcional das proteínas de M. abscessus subsp. bolletii CBRVS 00594 (AT)</i>	110
4.4.3.2	<i>Classificação funcional das proteínas de M. abscessus subsp. bolletii CRM 270 (MT)</i>	112
4.4.4	Descrição de proteínas com classificação funcional diversa	115
4.4.5	Descrição de proteínas relacionadas às enzimas modificadoras de antibióticos	126

4.4.6	Descrição de proteínas relacionadas aos mecanismos de bomba de efluxo	127
4.4.7	Descrição de proteínas com função de porinas	131
4.4.7.1	<i>Relação entre as porinas e o glutaraldeído</i>	132
5	CONCLUSÕES	134
	REFERÊNCIAS	136
	APÊNDICE A (em CD)	149
	APÊNDICE B (em CD)	150

1 INTRODUÇÃO

1.1 MICOBACTÉRIAS

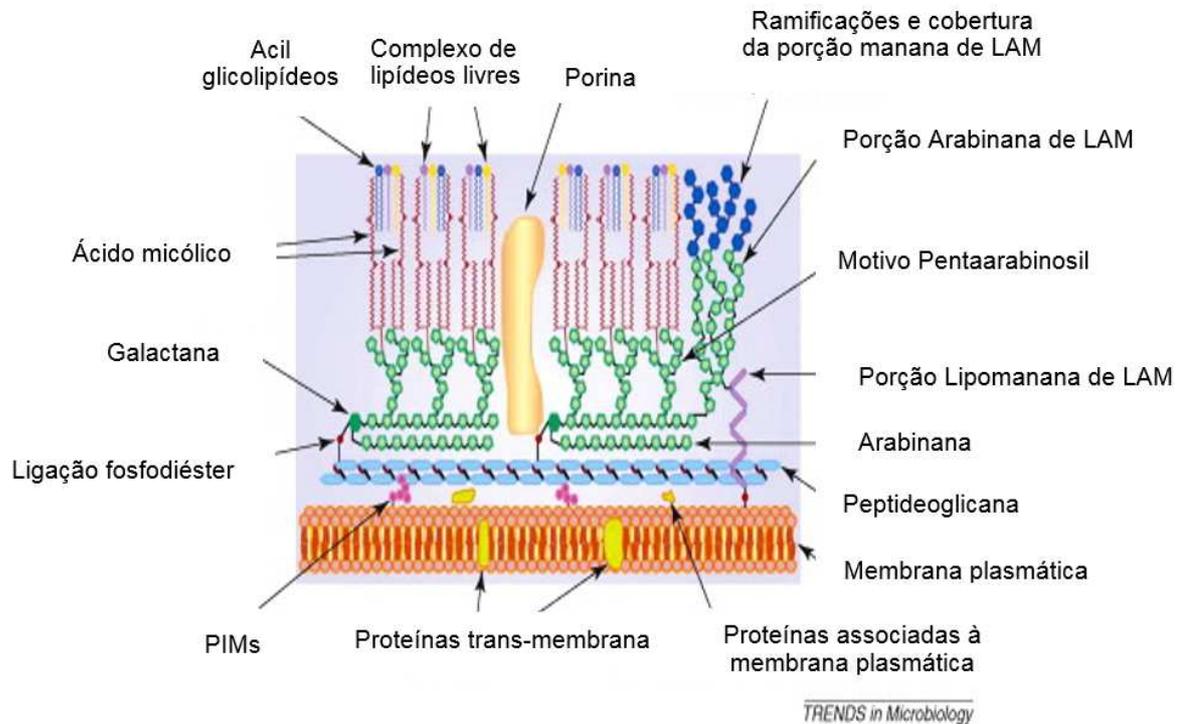
As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, família Micobacteriaceae, filo *Actinobacteria*, existindo atualmente aproximadamente 186 espécies e 13 subespécies descritas na lista de espécies bacterianas com nomes aprovados (LPSN BACTERIO.NET, 2017). São microrganismos caracterizados como bastonetes aeróbios ou microaerófilos, imóveis, não encapsulados e não esporulados. Apresentam características como mecanismos de patogenicidade, coloração álcool-ácido resistente, resistência a antimicrobianos e a estresses ambientais, como o ressecamento (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005, BRITO, 2008).

Nas micobactérias, uma camada espessa de ácido micólico substitui a camada externa de lipopolissacarídeos encontrada na parede celular de outras bactérias, o que contribui com o seu processo de resistência a agentes químicos e físicos e com sua taxa de crescimento lento, já que os nutrientes são absorvidos por essa camada bem lentamente (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005, BRITO, 2008). Os ácidos micólicos são ácidos graxos de cadeia longa que se ligam covalentemente aos polissacarídeos, designados arabinogalactanas. Estes, por sua vez, fazem ligação por pontes fosfodiéster com as peptidoglicanas, resultando numa parede rica em lipídeos e, conseqüentemente, numa barreira impermeável a moléculas hidrofílicas, permitindo a maior resistência das micobactérias a várias substâncias, inclusive desinfetantes e antibióticos, quando comparadas às outras bactérias (**Figura 1**) (FRAUD et al, 2003, HINRICHSEN, 2007).

Em 1954, Timpe e Runyon criaram para as micobactérias, que denominaram atípicas, uma classificação em quatro grupos, que foi refinada por Runyon em 1959. As micobactérias foram classificadas, de acordo com a velocidade de crescimento e a capacidade de produzir pigmentos em determinadas condições (LEVINSON; JAWETZ, 2005), em três grupos de micobactérias de crescimento lento (MCL) e um grupo formado por micobactérias de crescimento rápido (MCR). Dentre as MCL, no grupo I encontram-se as fotocromogênicas, que produzem pigmento laranja ou

Figura 1. Estrutura da parede celular de micobactérias.

LAM, lipoarabinomanana; PIM, manosídeos fosfatidilinositol.



amarelo quando expostas à luz; o grupo II é composto pelas escotocromogênicas, que são semelhantes ao grupo anterior, porém podem produzir os pigmentos mesmo na ausência de luz; e no grupo III estão as acromogênicas, que não produzem pigmentos. As MCR formam o grupo IV, podendo apresentar-se pigmentadas ou não e, apesar de geralmente serem saprófitas, podem estar associadas a casos de patologia humana (PRIMM; LUCERO; FALKINHAM, 2004, FONTANA, 2008).

Existe ainda, uma classificação baseada exclusivamente no tempo de crescimento das micobactérias em meio sólido, sendo então divididas em dois grupos denominados, atualmente, MCL e MCR. As MCL incluem a maioria das micobactérias patogênicas, como o complexo *Mycobacterium tuberculosis* e o complexo *Mycobacterium avium*, produzindo colônias visíveis em meio sólido após sete dias de incubação, com tempo de geração acima de 16 horas. As MCR podem ser observadas antes mesmo de completarem sete dias de incubação, sendo de 3 a

4 horas o seu tempo de geração. Adicionalmente, necessitam de meios de cultura simples, contendo sais minerais, glicerol e aminoácidos. As MCR são referidas algumas vezes como micobactérias atípicas, micobactérias não causadoras de tuberculose ou micobactérias ambientais. Estes dois grupos se diferenciam não só quanto à taxa de crescimento, como também de acordo com a morfologia da colônia, virulência e sensibilidade a antibióticos e biocidas (PRIMM; LUCERO; FALKINHAM, 2004, BRITO, 2008, PITOMBO; LUPI; DUARTE, 2009).

1.2 MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO

Há tempos, as espécies do gênero *Mycobacterium* de maior importância clínica eram apenas *M. tuberculosis*, agente etiológico da tuberculose, e *Mycobacterium leprae*, agente causador da hanseníase (COROS; DE CONNO; DERBYSHIRE, 2008). Com o advento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), o complexo *Mycobacterium avium* (MAC), que inclui diversas espécies de micobactérias, entre elas *M. avium* e *Mycobacterium intracellulare*, tornou-se frequentemente associado às infecções secundárias ocorridas nos pacientes HIV positivos (RAMOS et al, 2000, SOUSA et al, 2015).

Mais recentemente, em todo o mundo, o crescimento de infecções por MCR relacionadas à assistência à saúde em diversas condições clínicas, revelou estes microrganismos como importantes patógenos humanos de importância médica (GROOTE; HUIT, 2006, SOUSA et al, 2015). As MCR são capazes de sobreviver em ambientes com baixos níveis de nutrientes, podendo ser encontradas em uma variedade de reservatórios naturais, como água, solo, aerossóis, protozoários, animais e seres humanos (HOWARD; BYRD, 2000, PRIMM; LUCERO; FALKINHAM, 2004). Aproximadamente 50 diferentes espécies de micobactérias têm sido consideradas agentes etiológicos de doenças em humanos, e várias novas espécies de micobactérias patogênicas não causadoras de tuberculose têm sido descritas (WAGNER; YOUNG, 2004).

Entre as principais espécies de MCR relacionadas a doenças no homem encontram-se *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium massiliense* (SHINNICK; GOOD, 1994, ADÉKAMBI et al,

2004, SOUSA et al, 2015). Porém, essas infecções geralmente estão associadas a pessoas com fatores predisponentes ou imunocomprometidas, já que esses microrganismos geralmente apresentam baixa virulência (WAGNER; YOUNG, 2004, CHO et al, 2010, SOUSA et al, 2015).

M. massiliense chegou a ser aceita em 2006 como uma nova espécie (VIANA-NIERO et al, 2008), entretanto, foi renomeada em 2011 como *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*, assim como *M. abscessus* passou a ser taxonomicamente denominada como *M. abscessus* subsp. *abscessus* (LEÃO et al, 2011).

Porém, atualmente, a posição taxonômica dos membros do complexo *M. abscessus* tem sido objeto de uma investigação intensiva e, em alguns aspectos, com muita confusão, em decorrência de serem utilizadas diferentes abordagens para a interpretação de dados genéticos. Apesar das espécies *M. massiliense* e *M. bolletii* serem agrupadas juntas como *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*, elas diferem em alguns aspectos relevantes, pois *M. abscessus* possui o gene *erm(41)* funcional, enquanto em *M. massiliense* esse gene *erm(41)* não é funcional. Esse gene confere resistência induzível aos macrólídeos, que são os antimicrobianos utilizados na terapêutica primária para *M. abscessus*. (GRIFFITH et al, 2015, TORTOLI et al, 2016).

Logo, com base em dados fenotípicos relacionados com o gene *erm(41)* e em dados genômicos atuais, os autores concluíram que a espécie *M. abscessus* abrange, em complemento à subespécie atualmente reconhecida *M. abscessus* subsp. *abscessus* e *M. abscessus* subsp. *bolletii*, uma terceira subespécie para a qual foi sugerido o nome *M. abscessus* subsp. *massiliense* (TORTOLI et al, 2016).

1.3 INFECÇÕES POR MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO

A primeira associação de MCR como agente etiológico de patologias humanas foi feita em 1904, por Ophüls, que observou a presença de micobactérias em abscesso crônico em humanos. Entretanto o reconhecimento da importância dessas bactérias na patologia humana como causadores de doenças associadas aos quadros nosológicos ocorreu em 1950 (TIMERMAN, 2005).

Após 1950, um dos primeiros relatos de infecção por MCR foi relacionado a um implante de dispositivo anticoncepcional, resultando na formação de abscesso no sítio de aplicação (ALFA; SISLER; HARDING, 1995).

As infecções cutâneas e subcutâneas ocasionadas por essas micobactérias são caracterizadas na forma de abscessos piogênicos, indicando uma reação inflamatória aguda. Pode ainda haver evolução lenta do caso, com inflamação crônica, formando nódulos, fístulas e ulceração (FONTANA, 2008).

Na literatura, nas últimas décadas, foram publicados vários relatos científicos de infecções causadas por MCR após traumas, cirurgias cardíacas, cirurgias plásticas de face, mamoplastia, cirurgias dermatológicas, lipoaspiração, implante de silicone na mama, implante de próteses articulares, acupuntura, mesoterapia, pedicure, injeção de silicone, injeções subcutâneas e intramusculares de antibióticos, esteroides e medicamentos alternativos. Surtos envolvendo úlceras na pele, infecção pulmonar, bacteremia associada a cateter e/ou à diálise, pseudosurtos associados à broncoscopia e à laparoscopia e ceratite após cirurgia a laser têm sido descritos (WALLACE; BROWN; GRIFFITH, 1998, BROWN-ELLIOTT; GRIFFITH; WALLACE, 2002, FREITAS et al, 2003, TIWARI et al, 2003, USLAN et al, 2006, EID et al, 2007, KIM et al, 2007, CARBONNE et al, 2009, LEE et al, 2014, GUIMARÃES et al, 2016). São afetados tecidos e órgãos do corpo, ocasionando osteomielite, artrite, linfadenite, otite média crônica, infecções da córnea, doenças pulmonares, entre outros (FALKINHAM, 1996, HOWARD; BYRD, 2000, PHILLIPS; VON REYN, 2001, SHIN et al, 2007, CARDOSO et al, 2008, LEE et al, 2012, JEONG et al, 2014).

M. abscessus foi descrita primeiramente por Moore e Frerichs em 1953, sendo isolada de uma mulher com osteoartrite crônica. A paciente desenvolveu abscessos glúteos pela presença da micobactéria, motivo pelo qual foi a espécie foi denominada 'abscessus'. Entre as espécies de MCR, *M. abscessus* é reconhecida como importante causador de infecções de pele e tecidos moles, por injúria da pele por inoculação, pequenos traumas e infecções nosocomiais, em abscessos e cirurgias (KWON, 2009, MOUGARI et al, 2016).

M. abscessus subsp. *bolletii* surgiu como um patógeno emergente, descrito pela primeira vez por Adékambi et al (2004), sendo isolado do escarro e fluido broncoalveolar de uma paciente com pneumonia hemoptoica (ADÉKAMBI et al, 2004). Essa micobactéria vem sendo relacionada a relatos de infecções pós-cirúrgicas, como mamoplastia, lipoaspiração, tratamentos estéticos, injeções

intramusculares, ceratite após cirurgia a laser e bacteremia associada à laparoscopia (KIM et al, 2007, TORTOLI et al, 2008, DUARTE et al, 2009, CHO et al, 2010, MONEGO et al, 2011, NUNES et al, 2014).

1.3.1 Casos e surtos no Brasil

Há alguns anos, as investigações e relatos de casos e surtos por MCR eram pouco frequentes no Brasil. Porém, este quadro mudou ao longo do tempo. O primeiro surto relatado ocorreu entre setembro e outubro de 1988 em uma clínica oftalmológica na zona norte da cidade do Rio de Janeiro, onde dois pacientes apresentaram ceratite por *M. abscessus* após cirurgia a laser por LASIK (do inglês: *Laser-Assisted in Situ Keratomileusis*). Casos semelhantes foram observados em surtos ocorridos em 1998 no Rio de Janeiro, e entre 1999 e 2000 em São Paulo, em pacientes submetidos à cirurgia ocular através do LASIK, que também apresentaram ceratite por *M. abscessus* (HÖFLING-LIMA et al, 2005, SAMPAIO et al, 2006). Na mesma época, ocorreram dois casos de infecção por *M. abscessus* no Rio de Janeiro, onde as fontes de identificação foram osteomielites e aspirado brônquico. No ano de 2002, uma clínica de estética da zona sul da cidade de São Paulo foi palco de casos de infecção por *M. abscessus* em pacientes que passaram por múltiplas sessões de mesoterapia, resultando em abscessos subcutâneos (SAMPAIO et al, 2006).

Em Belém, de 1999 a 2003, foram diagnosticados entre quatro a 12 casos de infecções por MCR no Instituto Evandro Chagas por ano, sendo a maioria oriunda de infecções respiratórias. Já entre 2004 e 2005, foi descrito o primeiro surto significativo por *M. massiliense* no país, onde 58 isolados pertencentes ao mesmo clone (BRA 100) foram identificados em pacientes submetidos a cirurgias laparoscópicas. As infecções foram caracterizadas por hiperemia local e formação de abscessos com aspecto inflamatório e secreções purulentas, além de não responderem à terapia antimicrobiana comumente usada (DUARTE et al, 2009).

Após este primeiro surto de infecções pós-cirúrgicas por *M. abscessus* subsp. *bolletii*, vários outros foram descritos, associados também a um único clone, em quinze estados brasileiros (CARDOSO et al, 2008, DUARTE et al, 2009). Podemos

citar como exemplo o surto ocorrido em Goiânia, onde 18 isolados de *M. abscessus* subsp. *bolletii* pertencentes a um mesmo clone foram provenientes de infecções geradas após procedimentos videocirúrgicos, principalmente artroscopia (CARDOSO et al, 2008).

Em 2007, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) publicou um alerta sobre infecções por micobactérias não causadoras de tuberculose após videocirurgia, informando dados sobre a presença, principalmente de *M. abscessus* em estabelecimentos ligados à saúde em várias localidades de Norte a Sul do País (ANVISA, 2007).

Em 2008, a Anvisa divulgou uma nova nota técnica sobre infecções hospitalares por MCR, informando que de 2003 a abril de 2008 haviam sido notificados mais de 2.000 casos em hospitais particulares do país. O maior número de casos de infecções ocorreu no Rio de Janeiro, com 1.051 casos, seguido do Pará, onde foram confirmados 310 casos. No estado do Espírito Santo também foram confirmados 244 casos. Houve ocorrências também nos estados de Pernambuco, Roraima, Bahia, Mato Grosso do Sul, Piauí, Minas Gerais, Mato Grosso, Distrito Federal, São Paulo, Goiás, Paraná e Rio Grande do Sul. Dos casos confirmados, 74% eram representados por pacientes do sexo feminino, onde a maioria havia sido submetida a cirurgias na região abdominal (72%), sendo o vídeo a principal via de acesso para realização do procedimento (82%) (ANVISA, 2008).

No estado do Rio de Janeiro, somente nos anos de 2006 e 2007 foram identificados 1.051 casos suspeitos de infecções relacionadas a procedimentos videolaparoscópicos em 63 hospitais. Essas infecções acometeram principalmente a pele e o tecido celular subcutâneo, sendo causadas por *M. abscessus* subsp. *bolletii*, pertencente ao mesmo clone encontrado nos surtos de Belém e Goiânia. As principais manifestações clínicas eram a formação de abscessos, nódulos e ulcerações nos sítios de incisão (DUARTE et al, 2009, LORENA et al, 2010).

Um estudo realizado por Nunes et al (2014) avaliou a susceptibilidade antimicrobiana e o perfil molecular dos isolados de MCR envolvidos em novos surtos de infecção pós-cirúrgica no Brasil desde 2007. Dos 109 casos notificados no Rio Grande do Sul, entre 2007 e 2011, 43 foram confirmados como sendo *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Como conclusão, esse estudo relatou a persistência de um clone emergente único e altamente resistente de *M. abscessus* subsp. *bolletii* por vários

anos, mesmo após a implementação nacional de medidas de controle de infecção (NUNES et al, 2014).

No período de junho de 2009 a março de 2012 no estado do Rio de Janeiro, foram isoladas 24 amostras de *M. abscessus* subsp. *bolletii* em pacientes de dois a 18 anos com fibrose cística (CÂNDIDO et al, 2014).

Entre o período de julho de 2009 a agosto de 2010, a Comissão de Controle de Infecção do Estado do Amazonas identificou casos de MCR após cirurgia laparoscópica em um hospital particular da cidade de Manaus. Foram identificados 60 de 222 pacientes (27%) com infecção por MCR submetidos à cirurgia laparoscópica por uma única equipe cirúrgica de gastroenterologia. Vinte e cinco casos (42%) foram confirmados em laboratório e 11 cepas obtidas por cultura foram genotipadas e o DNA foi sequenciado. Todas as 11 cepas sequenciadas mostraram resultados idênticos. As sequências do gene parcial *rpoB* apresentaram 100% de identidade com a estirpe INCQS 594 (cepa depositada na Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária do Instituto de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) como representante do clone BRA100 (VILLAR et al, 2015).

Segundo a Anvisa (ANVISA, 2014), de janeiro de 2010 até setembro de 2014 foram informados, por meio dos formulários eletrônicos de Notificação de casos de MCR e Notificação de Agregado de Casos e Surtos, 207 casos (suspeitos, prováveis e confirmados) de infecções por MCR. Também foram contabilizados os casos relatados diretamente pelas vigilâncias de estados e municípios, não constantes nas ferramentas de notificação (ANVISA, 2014).

Na vigilância epidemiológica dessas infecções no ano de 2010, observou-se a ocorrência de um surto envolvendo 22 casos em Goiás e outros 26 no Rio Grande do Sul, sendo 24 no município de Carazinho. Também foram isolados casos no Amapá (um), Amazonas (um), Ceará (um), Distrito Federal (um), Espírito Santo (um), Mato Grosso (um), Pará (três), Pernambuco (dois), Rio de Janeiro (dois), Santa Catarina (dois) e São Paulo (três). No ano seguinte, foram notificados 16 casos em Goiânia, dois em Brasília, um em Belém, um em Cascavel, um em Recife, um em Petrolina, um em São Leopoldo, três em Porto Alegre, dois em Cuiabá e quatro no Rio de Janeiro (ANVISA, 2014).

Em 2012, dos 81 casos registrados no País, 52 foram identificados em apenas um serviço de estética do estado do Mato Grosso. Durante aquele ano,

também foram registrados casos no Pará (dois) e no Rio de Janeiro (seis), além de casos isolados em diferentes municípios dos Estados: Bahia, Goiás, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo. Em 2013, ocorreram seis casos em uma mesma clínica na Bahia, todos envolvendo procedimentos estéticos de mama (ANVISA, 2014).

Entre 2010 e 2014, verificou-se a ocorrência de três surtos confirmados. Em 2010, no Rio Grande do Sul, em 2012, no Mato Grosso e em um estabelecimento de saúde na Bahia, no ano de 2013. Os demais casos registrados ocorreram em diferentes serviços de saúde e apresentaram-se dispersos pelo país (ANVISA, 2014).

Apesar do quadro distinto dos anos anteriores, casos de infecções por MCR continuam ocorrendo em vários serviços de saúde (ANVISA, 2014).

1.4 FATORES DE VIRULÊNCIA

1.4.1 Formação de biofilme

Biofilmes microbianos são definidos como comunidades biológicas complexas, formadas por microrganismos aderidos a superfícies sólidas ou semi-sólidas, envolvidos por uma matriz de substâncias extracelulares criada pelos próprios microrganismos. Dentre os componentes dessa matriz podemos citar polissacarídeos, proteínas, lipídeos e DNA extracelular. A organização dos microrganismos em biofilmes constitui uma forma de proteção ao desenvolvimento das células e permite a sobrevivência em ambientes hostis. Os biofilmes podem se formar em qualquer superfície úmida, sendo ela biótica (plantas, animais e seres humanos) ou abiótica (plástico, vidro, metal e sais minerais) (DAVEY; O'TOOLE, 2000, SHARMA et al, 2014).

Vários fatores estão relacionados ao desenvolvimento de um biofilme, tais como: temperatura, presença de agentes antimicrobianos, forças hidrodinâmicas, características do substrato, variação de pH, quantidade disponível de nutrientes e oxigênio, e concentrações dos metabólitos microbianos (NAVES et al, 2008,

SHARMA; PETCHIAPPAN; CHATTERJI, 2014). Os biofilmes são considerados importantes em infecções de dispositivos médicos, sendo relacionados, em parte, ao aumento da resistência aos antimicrobianos (DONLAN, 2001, FUX et al, 2005, RICHARDS; OJHA, 2014).

As micobactérias, como outras bactérias, competem por nutrientes e desenvolvem formas sofisticadas de se adaptarem a diferentes condições ambientais. Estas adaptações incluem transições do crescimento planctônico para a formação de diferentes tipos de comunidades multicelulares (SOCHOROVÁ et al, 2014). Porém as micobactérias carecem de estruturas superficiais como flagelos, pilis, fimbrias, surfactantes ou cápsulas como modos de translocação de superfície. Essas estruturas são usadas por outros microrganismos para alcançar e anexar à superfície (VAEREWIJCK et al, 2005, SHARMA; PETCHIAPPAN; CHATTERJI, 2014).

Segundo Esteban et al (2008), a relação das micobactérias com biofilmes tem sido observada há décadas em amostras clínicas e ambientais (ESTEBAN et al, 2008a).

Com base em alguns estudos (HALL-STOODLEY; LAPPIN-SCOTT, 1998, SANTOS, 2005, GOMEZ-ALVAREZ; REVETTA, 2016), autores sugerem que biofilmes devem ser considerados possíveis reservatórios de sobrevivência das micobactérias oportunistas em ambientes aquáticos, e que estes microrganismos podem ser recuperados a partir de diferentes fontes de água, inclusive de biofilmes presentes em sistemas de canalização.

Várias MCR, incluindo *Mycobacterium smegmatis* e *M. chelonae* mostraram-se capazes de formar biofilme, implicando em extraordinária sobrevivência e resistência aos antibióticos. Biofilmes podem também desempenhar um papel na patogênese de *M. chelonae*, o agente causador de úlceras cutâneas crônicas que também se desenvolve em ambientes aquáticos (PRIMM; LUCERO; FALKINHAM, 2004, OJHA et al, 2005). *Mycobacterium fortuitum* também foi encontrado fazendo parte de biofilmes em diversos sistemas hídricos (ESTEBAN et al, 2008a).

Williams et al (2009) testaram a formação de biofilme de isolados clínicos de MCR (*M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. fortuitum*) com altas e baixas concentrações de nutrientes e concluíram que todos formaram biofilme em ambas as condições (WILLIAMS et al, 2009).

Os ácidos graxos de cadeia longa (ácidos micólicos) que constituem a parede celular característica das micobactérias são conhecidos por sofrerem variações estruturais em resposta às mudanças das condições ambientais. Contudo, a relação dessas variações com a formação de biofilmes ainda não está elucidada. Entender os eventos moleculares envolvidos na transição do crescimento planctônico para a formação de biofilme, assim como o principal processo de ligação com a superfície para geração de um biofilme maduro, é uma questão central em fisiologia bacteriana e tem o potencial para revelar novas intervenções contra infecções micobacterianas (OJHA et al, 2005).

A análise de genomas micobacterianos sugere que eles não possuem a capacidade de produzir exopolissacarídeos. Apesar disso, as micobactérias formam biofilmes, se ligando a superfícies sólidas hidrofóbicas ou flutuando como películas na superfície de meios de cultura líquidos. Também já foi observada a rápida formação de agregados durante o crescimento celular em cultura submersa em meio líquido (ZAMBRANO; KOLTER, 2005). A morfologia e a estratégia de crescimento dos biofilmes micobacterianos dependem do tipo de superfície de fixação, bem como dos níveis de nutrientes, resultando na formação de microcolônias ou estruturas de cordão (SOCHOROVÁ et al, 2014).

1.4.1.1 *Glicopeptideolipídeos*

Estudos têm demonstrado que a morfologia das colônias nas micobactérias é influenciada pelo glicopeptideolipídeo (GPL) da parede celular.

Os GPL são encontrados na porção mais externa do envelope celular das micobactérias, contendo determinantes antigênicos para algumas espécies de micobactérias. A molécula de GPL consiste tipicamente num núcleo tripeptídico-amino-álcool com uma amina ligada a um ácido graxo de cadeia longa (HOWARD et al, 2006, SCHOREY; SWEET, 2008).

Em *M. smegmatis* e *M. avium*, os GPL estão associados à motilidade tipo *sliding* e à capacidade de formar biofilmes, sendo essas características dependentes da expressão do GPL (RECHT et al, 2000, RECHT; KOLTER, 2001). Ambas as

características desempenham um papel importante na colonização bacteriana (HOWARD et al, 2006).

Foi demonstrado que os GPL de *M. smegmatis* são importantes para a fixação inicial à superfície durante a formação do biofilme (RECHT et al, 2000, RICHARDS; OJHA, 2014). No entanto, componentes que afetam fases posteriores de formação de biofilme, que podem estar envolvidos no desenvolvimento das características arquitetônicas do biofilme, ainda não foram identificados (ZAMBRANO; KOLTER, 2005).

Em *M. abscessus*, os GPL também desempenham um papel importante na formação de biofilmes (RECHT; KOLTER, 2001, HOWARD et al, 2006, WILLIAMS et al, 2009). Os GPL são responsáveis pelo fenótipo liso que ocorre em espécies de MCR onde existem variantes de colônias lisas/rugosas. *M. abscessus* pode espontaneamente mudar entre uma forma lisa, que expressa GPL, e uma forma rugosa, com produção escassa de GPL. A forma lisa tem a capacidade de formar biofilmes e colonizar superfícies, mas é incapaz de se multiplicar em macrófagos e causar infecção persistente. Por outro lado, as variantes rugosas carecem de GPL e são incapazes de formar biofilmes em superfícies inertes, mas são capazes de se multiplicar em macrófagos e causar infecção persistente (HOWARD et al, 2006, RHOADES et. al., 2009).

1.4.2 Resistência aos antimicrobianos

Na década de 1990, o uso da claritromicina foi indicado como antimicrobiano de primeira linha no tratamento de pacientes infectados por MCR (MUSHATT; WITZIG, 1995), e desde então tem sido a melhor escolha contra *M. abscessus* (NESSAR et al, 2012), também sendo considerada apropriada para *M. abscessus* subsp. *bolletii* (CARDOSO; JUNQUEIRA-KIPNIS; KIPNIS, 2011). No entanto, algumas cepas são resistentes a este antimicrobiano, e a terapia antimicrobiana para infecções por *M. abscessus* permanece desafiadora, pois ocorre resistência bacteriana ao tratamento monoterápico com claritromicina em cerca de 2,3% dos pacientes (CARDOSO; JUNQUEIRA-KIPNIS; KIPNIS, 2011, KIM et al, 2016). A resistência adquirida à claritromicina tem sido associada a mutações pontuais em

uma região do gene *rrl* que codifica o domínio peptidiltransferase do rRNA 23S. Um segundo mecanismo de resistência de *M. abscessus* aos macrolídeos foi descrito envolvendo a indução do gene *erm(41)*, um gene de metilase ribossômica. Fluoroquinolonas (FQ) também são ativas contra MCR, mas seu uso crescente levou ao surgimento de isolados resistentes às FQ. As mutações em uma sequência nos genes *gyrA* e *gyrB* são frequentemente envolvidas na resistência às quinolonas (KIM et al, 2016).

Nash, Brown-Elliott e Wallace Jr. (2009) mostraram que embora um isolado possa parecer sensível após três dias de incubação *in vitro*, se a incubação for estendida para 14 dias ou se o isolado for pré-incubado com claritromicina, há indução da síntese de uma metiltransferase, e conseqüentemente resistência à claritromicina. O gene *erm* é frequentemente envolvido na resistência a macrolídeos em patógenos humanos com mutação no gene 23S *rRNA* e atua metilando o nucleotídeo A2058 e/ou nucleotídeos vizinhos (A2057 e A2059) nesse gene. Cerca de 12 genes *erm* já foram identificados no gênero *Mycobacterium* (*erm* [37-42]). Recentemente, oito tipos de genes *erm(41)* foram reportados em *M. abscessus* (VESTER; DOUTHWAITE, 2001, NASH; BROWN-ELLIOTT; WALLACE JR, 2009, BROWN-ELLIOT; NASH; WALLACE JR, 2012).

Desde 2009, estudos avaliaram a eficiência da terapia de drogas combinadas em infecções respiratórias de *M. abscessus* de acordo com as recomendações do *American Thoracic Society* (ATS) 2007 (GRIFFITH et al, 2007). Por causa do risco relativo da seleção de cepas resistentes é recomendada a associação com um antimicrobiano secundário. Apesar disso, no tratamento combinando com claritromicina, amicacina e cefoxitina ou imipenem foram ainda observadas falhas em 20 a 73% dos casos. (MOUGARI, 2017). No caso de *M. abscessus* subsp. *bolletii*, o mesmo possui resistência intermediária à cefoxitina (CARDOSO; JUNQUEIRA-KIPNIS; KIPNIS, 2011) e, atualmente, o tratamento mais indicado para *M. abscessus* subsp. *bolletii* é o uso de claritromicina associado a um aminoglicosídeo, via de regra a amicacina, adicionando-se a terizidona ou seu análogo, cicloserina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Nas infecções graves de tecidos profundos ou com evidência de disseminação, a Anvisa recomenda o uso de imipenem combinado com claritromicina e amicacina por três a oito semanas. Caso não seja possível utilizar a amicacina, pode ser feita a substituição por tigeciclina (ANVISA, 2009).

1.5 FONTES DE INFECÇÃO

Segundo Shin et al (2007) a não evidência de transmissão de MCR de pessoa para pessoa leva à proposição de que os seres humanos sejam infectados por fontes ambientais, isto porque as micobactérias são habitantes naturais de uma ampla variedade de reservatórios ambientais (SHIN et al, 2007).

O mecanismo de transmissão mais aceito seria a formação de aerossóis contendo os microrganismos, no caso de infecções respiratórias, e sua ingestão por via digestiva, em linfadenites. Em pacientes com infecções cutâneas, é provável que aconteça a inoculação direta do patógeno através da água e/ou outros materiais cirúrgicos (LUNA, 2001).

Entretanto, não há explicações claras para elucidar as fontes de infecção associadas a essas micobactérias. Tal questão pode estar relacionada a uma possível contaminação da água e falhas no processo de limpeza do instrumental cirúrgico onde, após o acúmulo de matéria orgânica, haveria a formação de biofilmes, dificultando assim a ação dos desinfetantes (CARDOSO et al, 2008).

Com relação às infecções por MCR, dentre os fatores citados como predisponentes estão a sobrevivência atípica desses microrganismos em diferentes ambientes, incluindo o crescimento em água destilada; sua resistência aos biocidas, como o caso do glutaraldeído; e a sua capacidade de formar biofilmes (ADÉKAMBI et al, 2006, DUARTE et al, 2009, CHO et al, 2010, RICHARDS; OJHA, 2014). Segundo Esteban et al (2008b), infecções relacionadas com biofilme representam mais de dois terços de todas as infecções associadas a estes microrganismos (ESTEBAN et al, 2008b).

A capacidade infecciosa das MCR também está documentada em muitos estudos, tendo sua importância progressivamente aumentada nos últimos anos, com o isolamento de diferentes espécies em ambientes aquáticos, incluindo naturais, residuais, recreativos, industriais, hospitalares e águas de sistema de distribuição municipal (PRIMM; LUCERO; FALKINHAM, 2004, RENDON et al, 2012). Além disso, micobactérias ambientais também são capazes de formar biofilme, por exemplo *M. fortuitum* e *M. chelonae*, podendo persistir mesmo na presença de sistema corrente (PRIMM; LUCERO; FALKINHAM, 2004).

Em estabelecimentos de saúde, as MCR têm sido encontradas em água encanada, máquinas de gelo, equipamentos dentários, broncoscópios, injetores, água de rinsagem para máquinas de hemodiálise (provavelmente devido à hidrofobicidade da parede das células micobacterianas) e em desinfetantes (HOWARD; BYRD, 2000, WILSON et al, 2001, GUIMARÃES et al, 2016).

Um aspecto comum que foi observado em todos os surtos de MCR ocorridos no Brasil foi o relato de que diferentes cirurgiões utilizaram seu próprio equipamento de laparoscopia desinfetado em solução de glutaraldeído 2% entre cirurgias de diferentes hospitais (VIANA-NIERO et al, 2008, MONEGO et al, 2011). Esse procedimento, quando mal executado, pode se tornar um grande problema, já que as MCR sobrevivem em equipamentos desinfetados de forma inadequada, que posteriormente são utilizados em diagnósticos clínicos ou em cirurgias, causando infecções relacionadas à assistência à saúde (SHIN et al, 2007).

1.6 DESINFETANTES USADOS NO ÂMBITO HOSPITALAR

A eficácia do desinfetante contra as micobactérias depende da composição, concentração e potência do princípio ativo, da presença de matéria orgânica, do tempo de contato com o desinfetante, da manipulação correta do produto, do pH e temperatura adequados durante o procedimento de desinfecção. Porém, a presença de cepas resistentes pode ser determinante na ineficácia da atividade antimicrobiana do desinfetante (RUSSEL, 2003, VIJAYARAGHAVAN et al, 2006).

Os desinfetantes hospitalares de alto nível podem conter em suas formulações princípios ativos tais como glutaraldeído, ortoftalaldeído e ácido peracético (BLOCK, 2001).

1.6.1 Ácido Peracético

O ácido peracético está comercialmente disponível em formulações aquosas ou em pó, para uso manual ou automatizado, possui atividade rápida contra

microrganismos, inclusive os esporulados, e é eficaz mesmo na presença de matéria orgânica. A concentração de seu uso e o pH da solução são fórmula-dependentes (PSALTIKIDIS et al, 2014). Sua principal vantagem é a decomposição em compostos não-tóxicos, porém é um produto corrosivo e considerado instável particularmente quando diluído (RODRIGUES et al, 1997). O largo espectro de atividade antimicrobiana do ácido peracético e a relativa ausência de resíduos tóxicos levou à ampla aplicação desse tipo de produto. Dessa forma, é aceito para utilização em indústrias alimentícias e de bebidas, na desinfecção ou esterilização terminal de reservatórios de aço inoxidável, encanamentos, reservatórios de vidro, no tratamento de água, no reprocessamento de hemodialisadores, entre outras (BLOCK, 2001, WOLFF; ZYDNEY, 2005).

O mecanismo de ação atribuído ao ácido peracético é a desnaturação de proteínas e enzimas, aumentando a permeabilidade da parede celular através do rompimento das cadeias sulfidril (-SH) e das pontes dissulfeto (S-S) (RUSSEL; MCDONNELL, 1999). O ácido peracético possui atividade bactericida, esporocida e fungicida. Apesar de seu mecanismo de ação não estar amplamente estudado contra outros microrganismos, seu efeito mediante vários alvos sugere que também possa inativar micobactérias (RUSSEL, 2003).

1.6.2 Ortoftalaldeído

O ortoftalaldeído (OPA) é um aldeído solúvel e estável, sensível à luz ultravioleta e a oxidação pelo ar, que apresenta uma formulação comercial pronta para uso, com concentração igual a 0.55%, pH 7,5, sendo usado para desinfecção de artigos termo-sensíveis. Efetivo a temperatura ambiente, não necessita de ativação ou diluição inicial, com durabilidade máxima de 14 dias. Apresenta características favoráveis, quando comparado ao glutaraldeído, como maior estabilidade, menor irritação para os usuários, além de ser menos insalubre por ter pressão de vapor menor. Apresenta também compatibilidade com diversos tipos de matérias primas, tais como metais, plásticos, elastômeros, adesivos, endoscópios rígidos e flexíveis, como também equipamentos que possam ser submersos em

soluções químicas. Ortoftalaldeído demonstra rápida atividade micobactericida, provavelmente devido a sua natureza lipofílica, que facilita a sua penetração na parede celular micobacteriana (BLOCK, 2001, MCDONNELL, 2007).

Este aldeído pode ser utilizado de forma manual ou automatizada. Apesar de ser menos volátil que o glutaraldeído, também necessita ser manipulado em área devidamente ventilada e com uso de equipamentos de proteção individual (PSALTIKIDIS et al, 2014).

1.6.3 Glutaraldeído

A solução de glutaraldeído 2% é um dos compostos básicos mais amplamente utilizados como um desinfetante químico para equipamentos cirúrgicos em vários países, especialmente para dispositivos não autoclaváveis, e por sua vez, o desenvolvimento de resistência a esse biocida tornou-se uma preocupação na prática hospitalar (MONEGO et al, 2011).

Esta é uma solução que, em pH alcalino, é amplamente utilizada para desinfecção de alto nível e esterilização de objetos sensíveis ao calor, como endoscópios e equipamentos de plásticos, não sendo corrosiva para a maioria dos materiais (FRAUD; MAILLARD; RUSSEL, 2001, ANVISA, 2007b). Sua escolha é pautada devido à ação biocida e por agir mesmo na presença de matéria orgânica. Após a ativação do produto, seu prazo de validade varia entre 14 e 28 dias, conforme o fabricante, devendo haver, na prática, um monitoramento da concentração da solução por meio de fitas indicadoras da sua concentração. Essas fitas não devem ser usadas para ampliar a vida útil do glutaraldeído após seu prazo de validade, ou seja, não devem ser utilizadas após a data de vencimento do produto (RODRIGUES et al, 1997, ANVISA, 2007b).

É recomendado o manuseio de glutaraldeído em ambientes bem ventilados, já que seus vapores são considerados irritantes e tóxicos para a pele, mucosas e trato respiratório (MCDONNELL, 2007). Porém, é classificado como agente não mutagênico, não cancerígeno e sem toxicidade sistêmica pela Agência de Saúde Ocupacional dos Estados Unidos e Agência Internacional para a investigação do Câncer (ANVISA, 2007b).

O principal mecanismo de ação do glutaraldeído ocorre através da reação cruzada com proteínas da superfície celular e da inibição da síntese de DNA, RNA e outras macromoléculas presentes no microrganismo. O glutaraldeído é predominantemente um biocida reativo à superfície. O modo de ação específico é devido a reações de alquilação com grupos amino (aminas primárias) e sulfidrilas, que formam pontes ou ligações cruzadas. Alguns aminoácidos possuem grupos amino livres e expostos, que são os alvos diretos das reações de acoplamento com aldeídos como o glutaraldeído. Acredita-se que a ligação cruzada destes grupos nas proteínas da superfície celular leva à inibição rápida das funções celulares essenciais. O glutaraldeído é mais ativo com a alcalinização, pois os grupos amino na superfície das células são convertidos em aminas livres, que reagem com o glutaraldeído, conduzindo a um efeito bactericida rápido (MCDONNELL, 2007). O glutaraldeído possui também atividade micobactericida, porém nenhum estudo crítico foi desenvolvido para avaliar a natureza dessa ação (MCDONNELL, 2007).

Não existe referência ou padronização em relação ao perfil de susceptibilidade dos microrganismos aos desinfetantes, assim como é observado para os antibióticos através de algumas organizações internacionais (*Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST*), que classificam os microrganismos como resistentes, com resistência intermediária e sensíveis. Porém, em relação aos desinfetantes, as publicações científicas trazem muitas controvérsias, devido à falta de padronização das metodologias usadas para determinação do perfil de susceptibilidade dos microrganismos frente aos desinfetantes. A denominação de resistente ou sensível se torna muito subjetiva, por isso o termo tolerância ao desinfetante é considerado mais adequado.

1.6.3.1 Tolerância ao glutaraldeído

Alguns relatos científicos descrevem a resistência de MCR aos desinfetantes, apontando problemas em relação ao uso do glutaraldeído na desinfecção de equipamentos, como máquinas de lavagem e desinfecção de endoscópios (VAN KLINGEREN; PULLEN, 1993, GRIFFITHS et al, 1997, NOMURA et al, 2004). Van

Klingeren e Pullen (1993) mostraram que a desinfecção constante de equipamentos com glutaraldeído levou à seleção de cepas de *M. chelonae* com reduzida suscetibilidade a esse agente. O mesmo ocorreu em outro estudo, onde cepas da mesma bactéria foram isoladas de dois endoscópios e se comportaram de forma resistente à solução de glutaraldeído 2% (GRIFFITHS et al, 1997). Recentemente, surtos de infecções por *M. abscessus* subsp. *bolletii* também foram associados ao desenvolvimento de resistência (DUARTE et al, 2009, LORENA et al, 2010) e tolerância ao desinfetante (SOUTO, 2011).

1.7 MECANISMO DE TOLERÂNCIA

Um progresso considerável tem sido feito na compreensão dos mecanismos de tolerância aos desinfetantes. A tolerância pode ser uma propriedade natural de um microrganismo (intrínseca) ou adquirida por mutação ou aquisição de plasmídeos ou transposons (McDONNELL; RUSSELL, 1999).

A tolerância intrínseca é demonstrada por esporos bacterianos e bactérias Gram-negativas em desinfetantes à base de clorexidina, quaternários de amônio e fenóis. Esta tolerância das bactérias pode ser explicada através da barreira apresentada pela membrana externa e pelo glicocálix, prevenindo assim a absorção do desinfetante. Já a resistência adquirida, mediada por plasmídeo, é mais amplamente associada a compostos de mercúrio, clorexidina e quaternários de amônio em bactérias Gram-negativas (McDONNELL; RUSSELL, 1999).

O mecanismo de tolerância das micobactérias a desinfetantes não está bem elucidado, porém sabe-se que a baixa permeabilidade da parede externa das micobactérias certamente contribui para a tolerância desses microrganismos a diversos agentes, inclusive antibióticos (STEPHAN et al, 2004).

O abundante conteúdo lipídico e a camada tripla da parede celular conferem às micobactérias mais tolerância aos desinfetantes, às temperaturas elevadas e à luz ultravioleta, quando comparadas a outras bactérias patogênicas (FONTANA, 2008). Além disso, estes fatores auxiliam na formação de biofilme que, além do

suporte ao crescimento micobacteriano, protegem o microrganismo, dificultando a desinfecção (LORENA; DUARTE; PITOMBO, 2009).

A parede celular micobacteriana desempenha um papel crucial na proteção da célula contra compostos extracelulares tóxicos, como já citado anteriormente. A mesma atua de forma sinérgica com outros sistemas internos induzíveis por antibióticos. Estes sistemas, conhecidos de maneira geral como resistência intrínseca, incluem bombas de efluxo, enzimas modificadoras/inativadoras de antibióticos, enzimas modificadoras de alvo e genes que conferem resistência a metais (**Tabela 1**) (NESSAR et al, 2012).

Tabela 1. Resumo dos genes e possíveis mecanismos envolvidos na resistência intrínseca de *M. abscessus*.

Antibióticos	Localização e genes	Proteínas envolvidas	Mecanismos de resistência
antibióticos hidrofílicos			permeabilidade seletiva da parede celular
aminoglicosídeos	MAB_4395	aminoglicosídeo 2-N-acetiltransferase	enzimas modificadoras de antibiótico
	MAB_0327, MAB_0951	aminoglicosídeo fosfotransferases	
	MAB_3637c, MAB_4910c, MAB_4395		
rifampicina	MAB_0951	rifampicina-ADP-ribosiltransferase	
b-lactâmicos	MAB_2875	b-lactamase	enzimas degradadoras de antibiótico
macrolídeos	gene <i>erm(41)</i>	23S RNA metiltransferase	enzimas modificadoras de alvo
	MAB_2297		
vários antibióticos	disperso no genoma	transportadores ABC família MmpL	bombas de efluxo
compostos metálicos	plasmídeo pMMV23	operon regulador de mercúrio MerR, mercúrio redutase, operon ars	bombas de efluxo/desintoxicação
	MAB_p05c, MAB_06c		

Fonte: Adaptado de Nessar et al (2012).

Estudos demonstraram que MCR, como *M. fortuitum* e *M. chelonae*, são capazes não somente de sobreviver, mas também de se multiplicar em água destilada, atingindo níveis de 10^4 a 10^6 células por mililitro, sendo mais resistentes a alguns desinfetantes do que bactérias Gram-negativas, tipicamente encontradas em equipamentos hospitalares (CARSON et al, 1978).

Moléculas proteicas também já foram relacionadas à tolerância de bactérias ao glutaraldeído. Chiu et al (2007) demonstraram que a proteína Imp/OstA, associada à tolerância de *Helicobacter pylori* ao glutaraldeído, é proveniente de

bactérias Gram-negativas e participa da biogênese da parede celular. A perda da estrutura desta molécula resultou na alteração da permeabilidade da membrana, da sensibilidade ao solvente orgânico e da susceptibilidade a antibióticos (CHIU et al, 2009).

Muitas proteínas necessárias à patogenicidade das micobactérias são proteínas de superfície que estão envolvidas no metabolismo lipídico e transporte através do envelope celular. As proteínas de superfície celular, como as porinas, são expostas ao ambiente externo. Logo, estas proteínas são posicionadas idealmente para proteger a bactéria ou para modificar a resposta imune do hospedeiro ao bacilo (HE; BUCK, 2010).

Deficiências de porinas, que também atuam no transporte de moléculas como os antibióticos para o interior da célula, podem representar um importante mecanismo de tolerância de *M. chelonae* e *M. smegmatis* frente ao glutaraldeído e ao ortoformaldeído. Sugere-se haver similaridades no mecanismo de outras micobactérias e bactérias Gram-negativas em relação aos desinfetantes à base de aldeído (SVETLÍKOVÁ et al, 2009). Outro estudo reportou uma cepa de *M. smegmatis* que sofreu mutação, perdendo a principal porina MspA. Foi observado que essa deleção aumentou o nível de resistência da bactéria a alguns antibióticos. Com base nesse estudo, verificou-se a relação entre a via das porinas e o mecanismo de tolerância, já que houve modificações na permeabilidade da membrana externa desta micobactéria (STEPHAN et al, 2004).

Outra evidência que explicaria a tolerância de micobactérias aos biocidas são as mudanças nos monossacarídeos das porções arabinogalactana e arabinomanana, que possivelmente provocam uma redução da permeabilidade da parede celular, impedindo a penetração do desinfetante na bactéria e, conseqüentemente, sua ação (MANZOOR et al, 1999). Hidrofobicidade e impermeabilidade são certamente fatores que também contribuem para a tolerância das micobactérias a processos de desinfecção (BRENNAN; NIKAIDO, 1995), já que agentes hidrofílicos, mesmo em altas concentrações, não possuem ação micobactericida (FRAUD; MAILLARD; RUSSEL, 2001).

Devido aos recentes surtos de infecções por MCR no país e a falta de elucidação dos mecanismos de tolerância dessas micobactérias ao glutaraldeído, se faz necessário o emprego de técnicas *discovery driven*, ou seja, que são baseadas em descobertas antes das hipóteses.

Como o mecanismo de tolerância está associado ao fenótipo das micobactérias, tanto a transcriptômica como a proteômica poderiam ser ferramentas utilizadas para analisar o perfil de expressão gênica/proteica, porém a proteômica determina o que de fato está sendo expresso. Neste cenário então, a proteômica pode contribuir de modo importante na avaliação qualitativa e quantitativa da composição proteica de *M. abscessus* subsp. *bolletii*, a fim de auxiliar na prevenção e no controle dessas infecções.

1.8 A ABORDAGEM PROTEÔMICA

A análise dos proteomas de diversos organismos biológicos representa um dos desafios na era pós-genômica e constitui uma rica fonte de informação biológica (PATTERSON; AEBERSOLD, 2003). O termo proteômica surgiu pela primeira vez em 1995 e foi definido como a caracterização em larga escala do conteúdo proteico de uma célula, tecido ou organismo (WASINGER et al, 1995). Atualmente, a proteômica é definida como um conjunto de técnicas bioquímicas que permite identificar, caracterizar e quantificar as proteínas e peptídeos expressos por um sistema, em um dado momento, sob condições específicas. As ferramentas proteômicas também podem ajudar no estudo das estruturas, funções e interações entre proteínas (MALLICK; KUSTER, 2010).

O proteoma, diferentemente do genoma, é dinâmico e pode variar enormemente a nível de expressão proteica, tanto quantitativamente, quanto em relação às possíveis modificações pós-traducionais que as proteínas podem ter. Estas modificações são dependentes dos diferentes estímulos que a célula ou sistema podem sofrer, como alterações nutricionais, ambientais e de estresse. Em resposta a esses estímulos, as proteínas podem também ser translocadas, degradadas ou diferencialmente sintetizadas. O proteoma de uma célula será o reflexo do momento exato do estudo, sob as condições experimentais determinadas (GRAVES; HAYSTEAD, 2002, GOMES, 2014).

Didaticamente, a proteômica pode ser classificada em três grandes setores: a) a proteômica dos perfis, que tenta estabelecer o padrão de expressão de proteínas entre diferentes amostras; b) a proteômica funcional, utilizada no estudo

das funções de proteínas, suas modificações pós-traducionais e suas interações; c) a proteômica estrutural, que analisa a estrutura terciária de proteínas e de seus complexos (MITULOVIC; MECHTLER, 2006).

1.8.1 *Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS)

Classicamente, a proteômica era baseada na separação de proteínas por eletroforese bidimensional e sua posterior identificação por espectrometria de massas (*gel-based proteomics*) (O'FARREL, 1975, GORG et al, 2000). Atualmente, após várias inovações instrumentais e tecnológicas, a proteômica tem se baseado na análise em larga escala de peptídeos em abordagens livres de gel, também conhecida como *shotgun proteomics* (WASHBURN; WOLTERS; YATES, 2001, MICHALSKI et al, 2012).

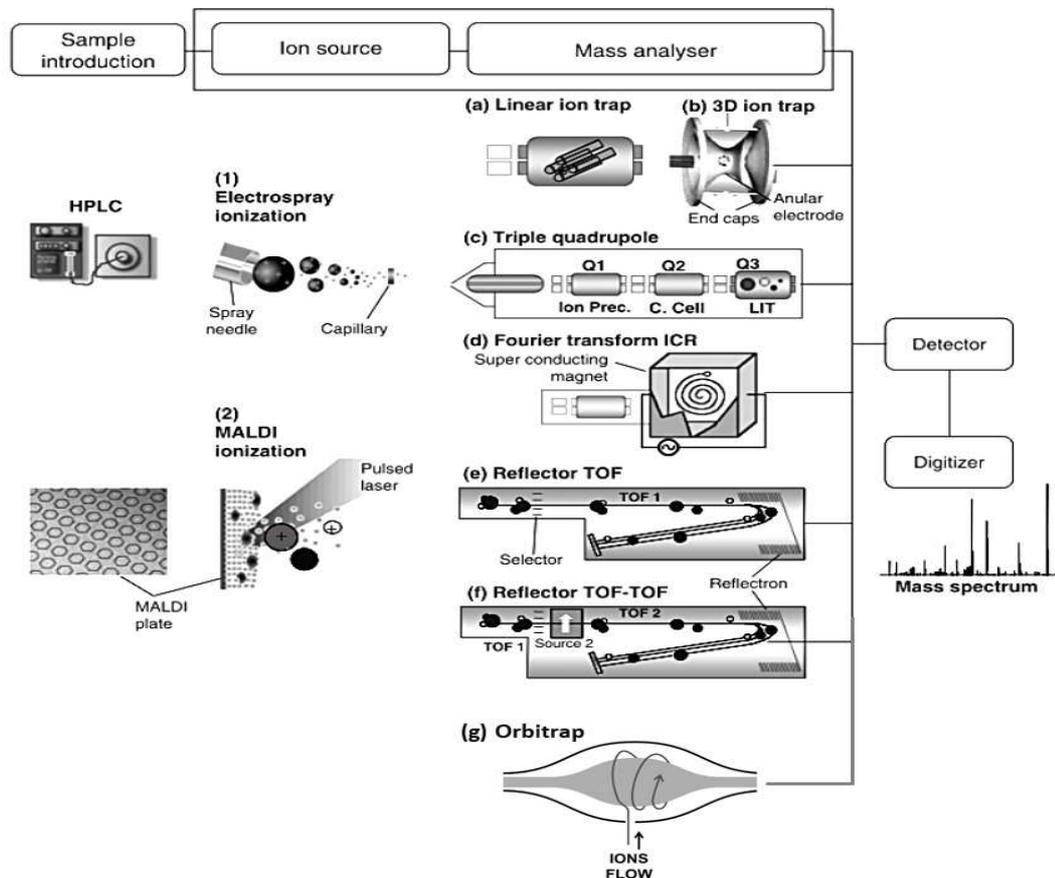
Nos últimos anos, a espectrometria de massas tornou-se uma poderosa ferramenta para o estudo de proteínas em larga escala e, combinada com estratégias experimentais inovadoras e avanços nos métodos computacionais, a proteômica baseada em espectrometria de massas tem permitido o estudo global de proteomas de tecidos, células e microrganismos (KUMAR, 2009). Nesta abordagem *gel free*, as proteínas são inicialmente digeridas em peptídeos através da ação de uma protease específica, resultando em uma mistura complexa de peptídeos. Para reduzir essa complexidade, vários tipos de cromatografias podem ser utilizadas (BARBOSA et al, 2012). A cromatografia líquida tem sido amplamente utilizada como técnica de fracionamento em substituição à eletroforese bidimensional e, atualmente, acoplada diretamente à espectrometria de massas, é considerada uma técnica rápida e sensível para separação dos peptídeos e posterior identificação (FRÖHLICH; ARNOLD, 2006, ZHANG et al, 2010a).

A fim de identificar os componentes proteicos fracionados, utiliza-se a espectrometria de massas para determinar a relação massa/carga (m/z) de peptídeos e proteínas ionizados. Os íons em fase gasosa são introduzidos no analisador de massas, onde campos elétricos ou magnéticos são gerados dentro do instrumento para separá-los, influenciando suas trajetórias, velocidade e/ou direção.

Os efeitos de um campo eletromagnético sobre o movimento de um íon são inversamente proporcionais à massa (m) do íon e diretamente proporcionais a sua carga elétrica (z); o espectro de massas formado corresponderá à abundância do íon versus sua relação m/z (CANAS et al, 2006).

Os componentes principais de um espectrômetro de massas são: a fonte de ionização, que converte as moléculas em íons em fase gasosa; um ou mais analisadores de massas, que medem a relação massa/carga (m/z) dos analitos ionizados; e um detector que registra o número de íons de cada valor de m/z (**Figura 2**).

Figura 2. Principais componentes de um espectrômetro de massas. As fontes de ionização comumente utilizadas na proteômica são o *electrospray* (ESI) (1) e o MALDI (2). Os tipos comuns de analisadores são: as armadilhas de íons (a) linear e (b) em três dimensões; (c) triplo quadrupolo; (d) ressonância ciclotrônica de íons; (e) e (f) tempo de vôo; e (g) armadilha orbital. Figura modificada de (CANAS et al, 2006).



Como observado na **Figura 2**, existem dois métodos principais de ionização que são utilizados na análise de proteínas e peptídeos: ionização por *electrospray* (ESI - *Electrospray Ionization*) e ionização por desorção a laser auxiliada por matriz (MALDI - *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*). No ESI, uma solução aquosa contendo a amostra é forçada a atravessar uma agulha capilar submetida à alta voltagem. A solução é ejetada na forma de aerossol com gotas altamente carregadas que, após a evaporação do solvente, geram formas ionizadas da amostra em fase gasosa. A abordagem *shotgun* frequentemente utiliza como fonte de ionização o ESI devido às vantagens de uma análise mais direta, com menos manipulação de amostra e menor tempo total de análise no espectrômetro (Lin e D., 2003).

Na ionização por MALDI, breves pulsos de laser incidem sobre uma matriz, frequentemente constituída de moléculas orgânicas derivadas do ácido cinâmico, do ácido benzóico, das poli-hidróxiacetofenonas, ou de compostos poli e heteroaromáticos. A matriz é co-cristalizada com a amostra e a energia do laser é adsorvida, levando à desorção das moléculas. Por ser relativamente simples e sensível, esse tipo de ionização é frequentemente associada à analisadores do tipo TOF em sequência. (BIENVENUT et al, 2002 STEEN; MANN, 2004, WISNIEWSKI, 2008, YATES; RUSE; NAKORCHEVSKY, 2009, BARBOSA et al, 2012).

O analisador de massas de um espectrômetro é o componente que separa os íons de acordo com a relação massa e carga (m/z). Os principais tipos de analisadores de massas que são utilizados na proteômica são: armadilha de íons tridimensional (IT) ou linear (LT), quadropolo (Q), ressonância ciclôtrônica de íons (ICR), tempo de voo (TOF – *Time of Flight*) e armadilha orbital (*Orbitrap*) (**Figura 2**). A maioria dos instrumentos é usada de forma híbrida, ou seja, compostos de dois ou mais analisadores, com objetivo de aproveitar as distintas capacidades de cada um deles, como por exemplo, Q-TOF, TOF-TOF, LTq-Orbitrap XL (ÍonTrap-Orbitrap) e Q-Exactive plus (Quadropolo-Orbitrap). O objetivo final é o alto desempenho (alta resolução, acurácia e sensibilidade) para determinar, em larga escala, as massas referentes aos peptídeos (MS1) e seus fragmentos (MS2 ou MS/MS) (YATES, 2004, CANAS et al, 2006, HAN; ASLANIAN; YATES, 2008).

Uma vez analisadas e detectadas as massas dos peptídeos (MS1), o sequenciamento destes peptídeos é obtido com a análise dos fragmentos gerados pela quebra das ligações peptídicas da molécula por técnicas de fragmentação.

Existem diversas metodologias de fragmentação, como a dissociação induzida por colisão (CID – *Collision-Induced Dissociation*); dissociação induzida por colisão de alta energia (HCD - *Higher-Energy Collisional Dissociation*); dissociação por transferência de elétrons (ETD - *Electron Transfer Dissociation*).

No método de CID, os íons precursores dos peptídeos selecionados são transferidos para uma região de vácuo do espectrômetro de massas após ionização por ESI ou MALDI. Os peptídeos são então acelerados para uma câmara dentro do espectrômetro contendo um gás inerte (hélio, argônio ou nitrogênio) fazendo assim com que ocorram colisões entre estes peptídeos ionizados e os átomos deste gás inerte (MANN, MENG, FENN, 1989). A energia translacional transferida de cada colisão é convertida em energia vibracional causando, em consequência, a fragmentação do peptídeo. O modelo da mobilidade do próton (DONGREET al, 1996) descreve como a energia interna adquirida, induz a transferência intramolecular dos prótons em cada peptídeo, culminando na desestabilização das ligações do esqueleto polipeptídico e, por consequência, induzindo a formação de dois íon-fragmentos (MANNET al, 1989), que são classificados como íons que retêm a carga residual (próton) no lado N-terminal (gerando fragmentos -a, -b e -c, dependendo da ligação que é fragmentada); íons que retêm a carga residual (próton) na região C-terminal (gerando os fragmentos -x, -y -z, dependendo da ligação que é fragmentada), segundo a nomenclatura proposta por Roepstorff e Fohlmann (1984), sendo estes pares de íons a/x, b/y, e c/z são íons correspondentes e complementares entre si (fragmentos opostos). Devido às ligações peptídicas serem as menos energéticas, espera-se que a formação de fragmentos -b/-y seja mais frequente em relação aos demais fragmentos, o que permite uma melhor interpretação dos espectros (TABBET al, 2003; O'HAIR, 2000; WY SOCKIET al, 2000).

Tipicamente, no CID são fragmentados os peptídeos em ordem decrescente de intensidade. O “íon precursor” se refere ao íon peptídico selecionado para fragmentação e a relação m/z deste íon é determinada no MS1. Seus fragmentos, pós-colisão são chamados de “íons produto” e seus m/z são determinados no MS2 (STEEN; MANN, 2004, WALTHER; MANN, 2010). Pode haver a formação de dois conjuntos de “íons-produto”: os que retêm a carga residual (próton) no lado N-terminal (fragmentos das séries a, b, c, dependendo da ligação que é fragmentada); e os que retêm a carga residual na região C-terminal (fragmentos das séries x, y, z,

dependendo da ligação que é fragmentada). Ainda que possa ocorrer em vários locais, a fragmentação é preferencial nas ligações peptídicas, gerando fundamentalmente íons das séries y e b (AEBERSOLD; GOODLETT, 2001).

A fragmentação por HCD está disponível para espectrômetros que possuem analisadores do tipo orbitrap (OLSEN et al, 2007). Os íons são fragmentados na câmara de colisão, em seguida são transferidos para o *C-trap* e, posteriormente para análise em alta resolução no orbitrap. Comparado com a adissociação induzida por colisão (CID), a fragmentação em HCD com um detector orbitrap não possui um corte de tamanho para as massas. Além disso, a detecção de íons é em alta resolução e aumenta os íons fragmentos, resultando em uma melhor qualidade de espectros em MS/MS. O HCD também aumenta os níveis de energia de dissociação em relação aos fragmentos de CID, permitindo uma gama mais ampla de vias de fragmentação.

Neste trabalho, utilizamos o espectrometro de massas Q-Exactive Plus (Thermo Scientific, USA), que possibilitou a abordagem proteômica baseada em nLC-ESI-MS/MS. Este instrumento mantém o isolamento do íon precursor com alta seletividade no quadrupolo, seguido pela análise da massa em alta resolução no Orbitrap. Esta configuração permite novos métodos quantitativos baseados em medições de alta resolução/acurácia, incluindo análise direcionada no modo MS (monitoramento de um único íon) e no modo MS/MS (monitoramento de reação paralela). A capacidade do quadrupolo de selecionar uma faixa m/z restrita ou (sequencialmente) um pequeno número de íons precursores oferece novas oportunidades para quantificação em amostras complexas, enriquecendo seletivamente componentes de baixa abundância (GALLIEN et al, 2012).

A identificação dos peptídeos a partir dos espectros de massas pode ser feita mediante o auxílio de ferramentas computacionais, onde os espectros com a relação m/z dos íons precursores, juntamente com o espectro de dissociação destes, formam um conjunto de dados a ser analisado. As três formas comumente usadas de estratégias para identificação são: sequenciamento *de novo*, *sequence tag search*, e o *peptide spectrum match* (PSM). No PSM, os espectros de massas experimentais são comparados com espectros teóricos gerados a partir de um banco de dados de sequências proteicas. Para isso, utilizam-se algoritmos de buscas como, por exemplo, o *Comet* (ENG; JAHAN; HOOPMANN, 2013) e o *Mascot* (PERKINS et al, 1999), que são capazes de comparar os espectros MS/MS obtidos

experimentalmente com os espectros teóricos (YATES; RUSE; NAKORCHEVSKY, 2009, NESVIZHSKII, 2010, JUNQUEIRA; CARVALHO, 2012).

Apesar da intensidade do pico ser proporcional a quantidade de amostra, o MS não é diretamente quantitativo devido à variação na resposta do detector, diferente ionização e outros fatores, para tanto, foram desenvolvidas diversas metodologias que permitem a quantificação de diferentes condições experimentais (ONG et al, 2002).

Várias metodologias vêm sendo utilizadas em experimentos de Proteômica quantitativa, tais como: *Stable Isotope Labelling by Amino Acids in Cell Culture* (SILAC), que permite a comparação de duas ou mais condições experimentais, devido à incorporação de aminoácidos contendo isótopos em suas versões “pesadas” (MANN, 2006, ONG, MANN, 2006, ONG et al, 2002); *Isotope-coded affinity tags* (ICAT), que marca cisteínas livres (GYGI et al, 1999); *Isobaric tags for relative and absolute quantification* (iTRAQ), que marca aminas livres e os níveis de peptídeos são aferidos no MS/MS (ROSS et al, 2004). É possível também realizar quantificação sem marcação (*label-free*), como é usada a contagem de espectros ou intensidade dos peptídeos por extração da intensidade do cromatograma (XIC – *Extracted Ion Chromatogram*), para estimar a abundância dos peptídeos (ONG; MANN, 2005, WANG et al, 2008).

1.8.2 Estudos proteômicos em micobactérias

Infelizmente, raras são as pesquisas proteômicas para as MCR de importância clínica, como *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. fortuitum*.

Mycobacterium smegmatis, devido ao seu status não patogênico e tempo de geração mais rápido, é frequentemente usado como um organismo micobacteriano modelo para o estudo da biologia de *M. tuberculosis*, isto por causa da similaridade dos processos celulares básicos nessas duas espécies (WANG; MARCOTTE, 2008, CHOPRA et al, 2014).

Trabalhos sobre o proteoma de *M. smegmatis* são promissores no estudo dos mecanismos de crescimento micobacteriano, metabolismo lipídico complexo,

interações com o ambiente e desenvolvimento de drogas antimicrobianas. As proteínas da parede celular são particularmente interessantes neste último aspecto. He e De Buck analisaram o proteoma da parede celular de *M. smegmatis* cepa MC2 155 com o objetivo de construir um mapa de proteínas de referência e obter candidatos promissores para o desenvolvimento de vacinas e antimicrobianos contra *Mycobacterium* spp. patogênico, especialmente porque sabe-se que o envelope das células bacterianas, em conjunto com as proteínas da membrana plasmática celular, são os principais alvos de antimicrobianos atualmente conhecidos (HE; BUCK, 2010).

M. smegmatis também tem sido utilizada como modelo para estudar as alterações na expressão proteica em tratamentos com drogas anti-tuberculose (anti-TB). Os perfis proteicos, após a exposição aos antimicrobianos, tornaram possível a classificação dos mecanismos de ação desconhecidos em grupos semelhantes, elucidando assim o sítio de ação do fármaco. Em um trabalho de Wang e Marcotte (2008), utilizou-se quantificação por espectrometria de massa para comparar os padrões proteômicos (*proteomics fingerprints*) de drogas anti-TB e identificar marcadores de ação do antimicrobiano. Com a espectrometria de massas, foi possível inferir sobre a resposta proteica global de *M. smegmatis* para isoniazida (INH), etambutol (EMB) e pirazinamida (PZA), o que permitiu identificar proteínas que mostraram níveis de expressão alterados relacionados aos efeitos sistemáticos dos antimicrobianos sobre as células micobacterianas (WANG; MARCOTTE, 2008).

Em outro trabalho, utilizou-se a proteômica para estudar o metabolismo de *M. smegmatis* alterado devido à utilização de ácidos graxos como fonte de carbono. Graças à notável capacidade de *M. tuberculosis* em persistir dentro do hospedeiro humano, como uma infecção clinicamente inaparente ou cronicamente ativa, os ácidos graxos podem ser uma importante fonte de carbono utilizada por estas bactérias durante a infecção de longo prazo. O catabolismo de ácidos graxos requer a reprogramação de redes metabólicas e as enzimas centrais para esta reprogramação têm sido alvo de descoberta de antimicrobianos (CHOPRA et al, 2014).

Sochorová et al (2014) estudaram os estágios iniciais da formação de películas de biofilme por *M. smegmatis* na superfície de um meio líquido. Em amostras representando diferentes estágios morfológicos de formação de biofilme, os perfis de expressão de proteína foram analisados usando eletroforese em gel

bidimensional de alta resolução (2DGE) aliada à espectrometria de massas para identificação das proteínas. As proteínas variantes identificadas foram divididas em grupos, de acordo com seus perfis de expressão (Grupos I a IV). O mais interessante destes grupos continha proteínas com maior expressão na fase de desenvolvimento do biofilme, quando as microcolônias flutuantes, contendo células longas e mais robustas, se associam em flocos e começam a formar uma película compacta. A maioria dessas proteínas está envolvida na síntese ou modificação da parede celular, principalmente através do envolvimento da biossíntese do ácido micólico, e a máxima expressão dessas proteínas se correlaciona com as mudanças no tamanho celular e na rigidez da parede celular bacteriana observada por microscopia eletrônica de varredura (SOCHOROVÁ et al, 2014).

Apenas Shin et al (2010) utilizaram a análise proteômica para caracterizar e identificar diferentes proteínas extracelulares entre *M. massiliense* e *M. abscessus* para auxiliar no diagnóstico destas micobactérias (SHIN et al, 2010).

1.9 JUSTIFICATIVA

Priorizar a saúde em nosso país foi objetivo destacado a partir da criação da Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, a Lei Orgânica da Saúde, que regulamentava o Sistema Único de Saúde (SUS). Nela, fica definido que a promoção, a proteção e a recuperação da saúde é um dever do Estado, cabendo a ele assegurar condições para garantir o bem-estar da população e controlar situações de risco para a saúde pública. Nessa lei também fica definido o conceito de Vigilância Sanitária como um conjunto de ações capazes de prevenir, diminuir ou eliminar riscos à saúde, abrangendo o “controle da prestação de serviços que se relacionam direta ou indiretamente com a saúde” (COSTA; ROZENFELD, 2001, BRASIL, 1990).

Recentemente, após a ocorrência dos diversos surtos por MCR, várias medidas foram tomadas pela Anvisa. Entre elas, primeiramente, a orientação do uso com cautela do glutaraldeído como desinfetante de alto nível, que culminou na suspensão da esterilização química por imersão de instrumental cirúrgico e produtos para a saúde, pelo uso de qualquer agente esterilizante líquido. As investigações promovidas pela Anvisa e vigilâncias locais concluíram que os surtos se deviam a falhas no reprocessamento de produtos médicos críticos utilizados em cirurgias por vídeo ou convencionais (abdominais, ortopédicas, pélvicas e cirurgias plásticas).

Essas conclusões se basearam em observações empíricas, sem estudos científicos aprofundados, pautadas exclusivamente na observação do que estava ocorrendo na prática hospitalar, sendo que em nenhum momento foi elucidada a relação de *M. abscessus* subsp. *bolletii*, principal espécie envolvida nos surtos, e a sua alta tolerância ao glutaraldeído.

Aplicado ao contexto de Vigilância Sanitária, originário do direito ambiental, há o que chamamos de Princípio da Precaução. De maneira geral, o Princípio da Precaução ultrapassa o da prevenção, impondo às autoridades a obrigação de agir em face de uma ameaça de danos irreversíveis à saúde, mesmo que os conhecimentos científicos disponíveis não confirmem o risco. A precaução atua na incerteza científica e não existe por ela mesma, se constrói a cada contexto, onde se deve preservar o mundo de ameaças reais, ou mesmo do sentimento geral de medo em relação à defesa da saúde pública. O mesmo é aplicado quando uma atividade representa ameaças de danos à saúde humana e onde medidas de precaução devem ser tomadas, devido a um contexto de incertezas científicas e do risco da ocorrência de danos graves (DALLARI, 2012).

Sabe-se que a bicamada lipídica (rica em ácido micólico) é uma barreira de permeabilidade extremamente eficiente que protege a célula de compostos tóxicos, sendo considerado o principal determinante da resistência intrínseca de micobactérias aos antibióticos mais comuns, agentes quimioterápicos e desinfetantes químicos (BRENNAN; NIKAIDO, 1995). Com isso, acredita-se então que a resistência adquirida das micobactérias ao glutaraldeído poderia estar associada não aos lipídeos da parede celular e sim, às suas proteínas.

Assim, os recentes surtos de infecções por MCR no país, associados à falta de elucidação sobre o real fator de tolerância ao glutaraldeído por esses microrganismos, levaram a este estudo, a fim de auxiliar na prevenção e no controle dessas infecções. Portanto, são imprescindíveis estudos que analisem o comportamento de *M. abscessus* subsp. *bolletii* em relação ao perfil de proteínas expressas entre as cepas INCQS nº 00594 e CRM 270, que apresentaram comportamentos diferenciados frente ao glutaraldeído e, da formação de biofilme em diferentes condições de cultivo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi avaliar em paralelo as cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii*, CBRVS 00594 e CRM 270, a fim de elucidar os mecanismos que conferem a tolerância ao glutaraldeído. Para tal, utilizamos a abordagem proteômica para analisar o perfil de proteínas expressas entre as duas cepas. Além disso, verificamos a formação de biofilme em condições que mimetizam aquelas encontradas durante os surtos hospitalares, ou seja, em concentrações subinibitórias de glutaraldeído.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Investigar qualitativa e quantitativamente a formação de biofilme por *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 em condições subinibitórias de glutaraldeído;
- ✓ Analisar a formação de biofilme através de microscopia confocal;
- ✓ Padronizar as técnicas de cultivo e extração de proteínas de culturas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 e CRM 270;
- ✓ Identificar e quantificar, por técnicas proteômicas, as proteínas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 e CRM 270;
- ✓ Apontar as proteínas diferencialmente abundantes entre as duas cepas e inferir sobre as possíveis proteínas que atuam na tolerância ao glutaraldeído.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 CEPAS BACTERIANAS

Foram utilizadas as seguintes cepas: *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 proveniente de surto epidêmico e pertencente ao clone BRA 100, que foi depositada na Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária (CBRVS) do INCQS pela Dra. Sylvia Cardoso Leão da Universidade Federal de São Paulo; e *M. abscessus* subsp. *bolletii* CRM 270, proveniente de escarro de paciente e também pertencente ao clone BRA 100, cedida pelo Dr. Rafael Silva Duarte, do Laboratório de Micobactérias do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IMPPG/UFRJ).

3.1.1 Manutenção de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594

O microrganismo liofilizado em ampola foi reconstituído seguindo as recomendações do POP INCQS nº 653240.009 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016). Primeiramente, o líófilo foi reconstituído com aproximadamente 0,5 mL de meio Middlebrook 7H9 (BD Difco™, USA). Posteriormente, foram transferidas alíquotas de aproximadamente 0,2 mL para três tubos contendo meio Löwestein-Jensen (BD Difco™, USA), que foram incubados por 5 a 7 dias a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Posteriormente, as culturas foram estocadas em geladeira a $2-5^\circ\text{C}$ por um mês. A cultura estoque foi renovada através de repiques mensais em três tubos de meio Löwestein-Jensen e também a cada seis meses, através da abertura de uma nova ampola contendo o microrganismo liofilizado.

3.1.2 Manutenção de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CRM 270

A manutenção mensal foi realizada a partir da inoculação de uma alçada do microrganismo estoque em um tubo contendo 1 mL de solução de cloreto de sódio a 0,85% com 0,1% de polissorbato, onde foram acrescentadas pérolas de vidro. O conteúdo deste tubo foi agitado em agitador de tubos e uma alíquota de 0,2 mL dessa suspensão foi transferida para um tubo contendo meio Löwestein-Jensen, que permaneceu incubado por 7 dias, a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

A manutenção em glicerol foi realizada a partir da transferência de uma alçada do microrganismo estoque para um tubo contendo pérolas de vidro, que foi levado a agitação por 15 segundos em agitador de tubos. Uma alíquota de 4 mL de tampão glicerol (MERCK, USA) 15% pH 7,4 foi adicionada ao tubo, que novamente foi levado à agitação. A suspensão permaneceu em repouso durante 10 minutos, sendo distribuídas posteriormente alíquotas de 1,2 mL para criotubos, que foram estocados a -20°C e -70°C .

3.1.3 Características fenotípicas das cepas bacterianas

Nas duas cepas foram realizadas as seguintes provas bioquímicas: provas da catalase e catalase a 68°C e produção de niacina e nitrato, segundo Kent e Kubica (1985). As provas foram realizadas em colaboração com a Dra. Maria Cristina da Silva Lourenço, do Laboratório de Bacteriologia e Bioensaios do Instituto Nacional de Infectologia (INI) da Fiocruz.

3.1.4 Avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos

As cepas foram submetidas ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos através da verificação da concentração inibitória mínima (CIM), conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2011). Os

testes foram realizados em colaboração com a Dra. Maria Cristina da Silva Lourenço, do Laboratório de Bacteriologia e Bioensaios do INI/Fiocruz.

Os antibióticos utilizados e suas respectivas concentrações antimicrobianas foram: amicacina (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL); cefoxitina (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256 µg/mL); ciprofloxacina (0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 e 16 µg/mL); claritromicina (0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 e 64 µg/mL); trimetropim-sulfametoxazol (0,25/4,75, 0,5/9,5, 1/19, 2/38, 4/76, 8/152, 16/304 e 32/608 µg/mL); doxiciclina, tobramicina e moxifloxacina (0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 e 32 µg/mL).

Para a verificação da CIM das cepas frente aos antibióticos citados acima, foi realizada a técnica de microdiluição. Após o crescimento dos microrganismos a 36°C por 7 dias em meio Löwestein-Jensen, foram realizadas suspensões bacterianas em solução salina estéril a 0,85% compatíveis ao grau 0,5 da escala de McFarland (~1,5 x 10⁸ células). Posteriormente, as suspensões foram diluídas na escala de 1:1.000 em caldo Müller Hinton II (BD Difco™, USA) cátion ajustado (CMHCA), de modo a se obter uma concentração final de células de 1,5 x 10⁵ UFC/mL.

Utilizando uma placa de microtitulação de 96 poços, foram aplicados 200 µL de água destilada estéril nos poços da placa não utilizados para evitar a evaporação. Posteriormente, 100 µL de caldo CMHCA foram colocados nos poços das colunas 2 a 11 (fileiras B a G) e, nos poços que correspondem ao controle interno do meio de cultura (E11 a G11) foram aplicados 200 µL de caldo CMHCA. Depois, 100 µL da maior concentração do antimicrobiano foram colocados nos poços da coluna 2 (fileira B a G) e na coluna 10 (controle interno dos antibióticos). Com auxílio de uma pipeta multicanal ou monocanal foram homogeneizados os 100 µL dos antimicrobianos com os 100 µL de caldo CMHCA e, foram feitas diluições seriadas nas colunas 2 a 9 (B a G). Em seguida, após homogeneização com a pipeta, os 100 µL de cada antimicrobiano na coluna 9 foram desprezados.

Após a inoculação das diferentes concentrações antimicrobianas na placa, foram inoculados 100 µL da suspensão bacteriana diluída em cada poço da microplaca (colunas 2 a 9, fileiras B a G) e nos controles de crescimento bacteriano (B11 a D11).

A placa foi incubada por 72 h a 30 ± 1°C em papel alumínio, podendo ficar incubada até o 5º dia. A leitura foi realizada através de inspeção visual, onde a 1ª concentração que não apresentou crescimento bacteriano (turvação do meio) foi considerada a CIM.

3.2 PRODUTOS

Foram utilizados dois produtos à base de glutaraldeído: uma solução de glutaraldeído (1,5 pentanodial, $C_5H_8O_2$) a 25% (Merck, Germany) para o preparo das concentrações de glutaraldeído a 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0% e, um desinfetante à base de glutaraldeído a 2% comercializado pronto para uso. Este último foi utilizado para analisar a tolerância da cepa de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CRM 270 e CBRVS 00594 ao desinfetante.

3.3 AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA DAS CEPAS FRENTE AO GLUTARALDEÍDO

Foi realizado segundo o Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes, segundo a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e o Procedimento Operacional Padronizado INCQS nº 653240.009 (TOMASINO, 2012, INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016).

3.3.1 Preparo da cultura teste de *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS nº 00594 e CRM 270

A partir da cultura estoque, foram inoculados de 5 a 6 tubos contendo 10 mL de caldo Proskauer-Beck (PB) modificado e esses tubos foram incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 5-7 dias. Após esse período, foram adicionados aos tubos pérolas de vidro estéreis para, então, serem homogeneizados em agitador de tubos.

3.3.2 Realização do Método

Quinze a vinte mL da suspensão do microrganismo teste a 80% de transmitância, no comprimento de onda de 650 nm, anteriormente preparada, foram empregados para contaminar 10-12 cilindros de porcelana durante 15 minutos. Após esse tempo, os cilindros foram transferidos, com auxílio de um gancho flambado, e colocados verticalmente em placas de Petri forradas com duas folhas de papel de filtro e levados a incubação em estufa a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 30 minutos, para secagem. No ensaio propriamente dito, a intervalos de tempos de 1 minuto, cada um dos dez cilindros foi transferido, de forma cronometrada, para cada um dos 10 tubos contendo o desinfetante a ser testado. Após 30 minutos de contato com o desinfetante, os cilindros foram transferidos, obedecendo ao mesmo intervalo de tempo (1 minuto entre cada transferência), para os respectivos tubos contendo 10 mL de soro de cavalo e posteriormente para os tubos contendo 20 mL de caldo PB modificado. A partir do tubo contendo soro de cavalo foram retiradas alíquotas de 4 mL, das quais 2 mL foram transferidos para dois meios de subcultura adicionais: meio Middlebrook 7H9 e meio de Kirchners (K), distribuídos em porções de 20 mL (**Figura 2**). Os tubos contendo os meios de cultura (caldo PB modificado, meio Middlebrook 7H9 e meio de K) foram incubados inicialmente por 60 dias em estufa a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, e no caso de ausência de crescimento ou crescimento tênue, os tubos foram re-incubados por um tempo adicional de 30 dias.

3.3.3 Controles

3.3.3.1 Controles de esterilidade

Todo material utilizado no ensaio foi analisado quanto a sua esterilidade conforme descrito abaixo:

- Esterilidade dos cilindros de porcelana

Um cilindro estéril, do lote utilizado no ensaio, foi adicionado a um tubo contendo caldo PB modificado e incubado a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 60 – 90 dias, conforme descrito no procedimento do ensaio. Não deve ocorrer crescimento microbiano (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016).

- Esterilidade dos meios de cultura PB, K e 7H9

A esterilidade dos meios de cultura foi verificada através da incubação de um tubo de cada meio de cultura, a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 60 – 90 dias, como descrito no procedimento do ensaio e não deve ocorrer crescimento microbiano (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016).

- Esterilidade da água purificada

Uma alíquota de 0,2 mL da água purificada utilizada para diluir o desinfetante e/ou preparar as soluções de fenol foi adicionada a um tubo contendo caldo PB modificado e incubado a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 60 – 90 dias, como descrito no procedimento do ensaio, e não deve ocorrer crescimento microbiano (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016).

- Esterilidade da solução de cloreto de sódio a 0,85% com 0,1% de polissorbato

Uma alíquota de 0,2 mL da solução de cloreto de sódio a 0,85% com 0,1% de polissorbato, utilizada no preparo da suspensão bacteriana da cultura teste, foi adicionada a um tubo contendo caldo PB modificado e incubado a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 60 – 90 dias, como descrito no procedimento do ensaio, e não deve ocorrer crescimento

microbiano (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016).

- Esterilidade dos lotes de pipetas

Com o auxílio de um pipetador automático, uma pipeta de cada lote utilizado no ensaio foi utilizada para aspirar o caldo PB modificado contido no tubo de ensaio, até acima da marcação da graduação e recolocado no tubo. Esse procedimento foi repetido três vezes e os tubos foram incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 60 – 90 dias, como descrito no procedimento do ensaio, e não deve ocorrer crescimento microbiano (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016).

- Esterilidade do soro de cavalo

Uma alíquota de 2 mL de soro de cavalo estéril foi inoculada em um tubo de cada um dos meios de cultura. Os tubos foram incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 60 – 90 dias, como descrito no procedimento do ensaio, e não deve ocorrer crescimento microbiano (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016).

3.3.3.2 Controle da viabilidade dos meios de cultura PB, K, 7H9

Um cilindro contaminado e seco foi adicionado a cada meio de cultura utilizado no ensaio. Os tubos foram incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 60 – 90 dias, como descrito no procedimento do ensaio. Após esse tempo de incubação a evidência de crescimento deve ser observada (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016).

3.3.3.3 Contagem da carga microbiana nos carreadores

A contagem de unidades formadoras de colônias (UFC)/cilindro de porcelana foi realizada a partir de três cilindros contaminados retirados da placa de Petri após o tempo de secagem, sendo esse cilindro submetido à sonicação em 10 mL de caldo PB modificado por 10 minutos e agitação por um minuto. Em seguida foram realizadas diluições sucessivas em 9 mL de caldo PB modificado. Alíquotas de 0,1 mL dessas diluições foram plaqueadas por *spread plate* em ágar Müeller Hinton (MH) em duplicata e incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 5 a 7 dias. A contagem das colônias foi realizada apenas nas placas que obtiveram número de colônias de 0 a 300 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016).

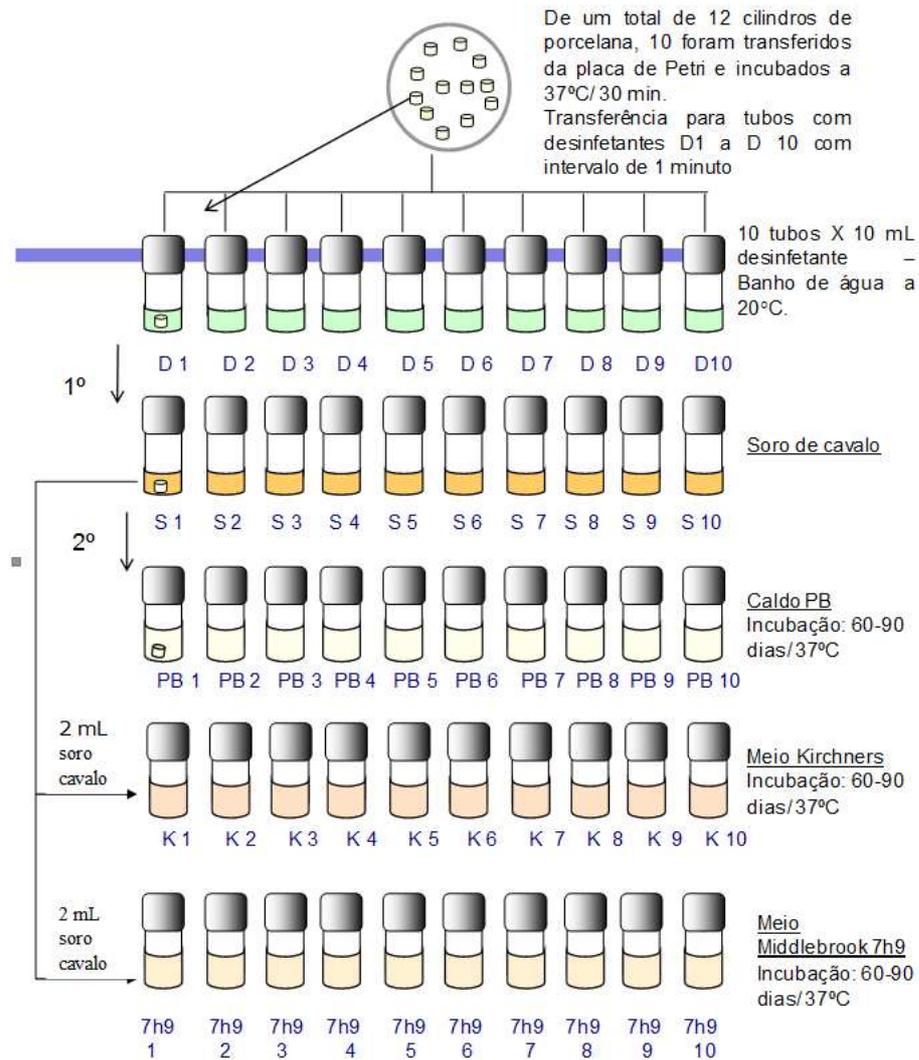
3.3.4 Leitura e interpretação dos resultados

A leitura foi realizada através da verificação da presença ou ausência de crescimento microbiano. No caso de crescimento, este foi confirmado através da presença de bacilos álcool – ácido resistentes (BAAR), corando pelo Método de Ziehl-Neelsen (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016).

Como critério para avaliação da eficácia do desinfetante, esse deve ser capaz de matar o microrganismo teste sobre os dez cilindros carreadores presentes no meio PB e não deve ocorrer crescimento microbiano nas alíquotas de 2 mL do soro de cavalo inoculadas nos meios de cultura de K e Middlebrook 7H9 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2016).

De acordo com o número de tubos que apresentou crescimento nos ensaios de avaliação da atividade micobactericida dos desinfetantes frente às cepas de MCR estudadas foi estabelecido um critério de classificação onde as cepas foram consideradas fracamente tolerantes (1-10 tubos apresentando crescimento), médio tolerantes (11-20 tubos apresentando crescimento) e altamente tolerantes (21-30 tubos apresentando crescimento) (LANGSRUD; SUNDHEIM, 1997, SOUTO, 2011).

Figura 2. Esquema da transferência dos cilindros entre os tubos utilizados no Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida, da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), conforme descrito no Procedimento Operacional Padronizado (POP) INCQS n° 653240.009. D1 a D10, tubos numerados de 1 a 10 contendo desinfetante; S1 a S10, tubos numerados de 1 a 10 contendo o neutralizante (soro de cavalo); PB1 a PB10, tubos numerados de 1 a 10 contendo caldo PB modificado; K1 a K10, tubos numerados de 1 a 10 contendo meio de Kirchner; Middlebrook 7H9 1 a 7H9 10, tubos numerados de 1 a 10 contendo meio Middlebrook 7H9.



3.4 OBTENÇÃO DO BIOFILME

Todos os procedimentos visando à obtenção e à quantificação dos biofilmes foram realizados segundo descrito por Williams et al (2009), com modificações.

3.4.1 Preparação dos materiais

Os discos de policarbonato (PC) e aço inox (AI) grau 316L, cada um medindo 13 mm de diâmetro e 4 mm de espessura (BioSurface Technologies, EUA), foram lavados em sabão neutro diluído, seguido de lavagem em água purificada (5x), e uma vez em etanol a 70%. Depois de secos ao ar, os discos foram autoclavados por 15 minutos a 121°C antes da utilização.

3.4.2 Crescimento do biofilme

Os biofilmes foram desenvolvidos nos discos de PC ou de AI autoclavados e incubados em placa de cultura de tecido de 24 poços (Corning Incorporated, EUA). Cada disco foi coberto com 1,0 mL de caldo PB modificado contendo glutaraldeído nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 1,5% (v/v). As suspensões de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594, coletados a partir da superfície de duas placas de ágar Middlebrook 7H10 (Difco, EUA), foram obtidas conforme descrito na etapa descrita em 3.4.1. A concentração foi determinada pela leitura da absorvância em espectrofotômetro a 620 nm na faixa de 2,150 a 2,200. As células em suspensão foram diluídas em água purificada e 100 µL de cerca de 10^9 UFC foram inoculadas por poço. A concentração de inóculo foi confirmada pela contagem de UFC das diluições de 10^{-7} e 10^{-8} inoculadas em duplicata em placas de ágar Middlebrook 7H10. Na mesma placa de 24 poços foram realizados os controles de esterilidade dos discos, dos meios de cultura utilizados com e sem glutaraldeído e viabilidade do microrganismo. As placas foram incubadas por 7 dias, a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ sem agitação. Ao final do tempo de incubação, os discos foram removidos com pinças estéreis, mergulhados três vezes com movimentos suaves para cima e para baixo num béquer contendo tampão PBS para remover bactérias pouco aderidas. Esses discos

foram processados para análise das UFC e para a microscopia. A quantificação foi realizada em triplicata e os experimentos repetidos três vezes.

3.4.3 Quantificação do biofilme por contagem das unidades formadoras de colônias

Após os discos serem lavados em PBS, os microrganismos foram quantificados pelo cultivo em ágar MH. Primeiramente, os discos foram colocados em tubos de centrifuga de polipropileno de 50 mL contendo 10 mL de PBS com 0,1% de Tween 80. Os microrganismos foram removidos da superfície pela aplicação de três ciclos de sonicação de 1 minuto, seguido de agitação por 1 minuto. A partir da suspensão gerada foram retiradas alíquotas de 0,5 mL de cada tubo, realizadas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-5} com 4,5 mL de tampão monopotássico 0,00425%. Após as diluições, foram retiradas alíquotas de 100 μ L de cada diluição em duplicata e semeadas em placas contendo ágar MH. As placas foram incubadas por 5 a 7 dias a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. A eficiência da remoção foi estimada pela visualização microscópica dos isolados crescidos em triplicata sob cada condição de cultivo.

3.4.4 Análise do biofilme por microscopia

Nessa análise foi usado 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Invitrogen, USA) para visualização de todas as bactérias associadas à superfície do disco de PC, formando biofilme, já que o DNA presente é corado por essa substância. Os discos foram removidos da placa, mergulhados em tampão PBS e, montados em lâminas de vidro. Após isso, foi colocado em cada disco 50 μ L de uma solução de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do corante DAPI em tampão PBS. A coloração foi realizada durante 10 minutos protegido da luz direta. Os discos foram examinados em microscópio epifluorescente Axioplan 2 Zeiss (Zeiss, Germany). As imagens foram obtidas através de objetiva a óleo com aumento de 100x, capturadas em câmera digital e analisadas por *software* de imagens Axio Vision Rel. 4.7.

3.4.5 Análise estatística

O teste de Grubbs foi utilizado para analisar valores aberrantes dentro de um mesmo experimento e o teste não paramétrico de Mann Whitney para comparar os resultados entre os experimentos e, *p* valores menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

3.4.6 Microscopia de Varredura Confocal a Laser (MVCL)

Para avaliar o desenvolvimento do biofilme e sua estrutura tridimensional, *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 crescido em diferentes condições foi analisado usando microscopia de varredura confocal a laser.

Os biofilmes foram desenvolvidos em placas para cultura celular de 4 compartimentos com fundo de vidro (Greiner Bio-One, Brasil). Cada compartimento foi coberto com 125 µL de caldo PB modificado contendo glutaraldeído nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 1,5% (v/v) e, sem glutaraldeído. As suspensões de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594, coletados a partir da superfície de duas placas de ágar Middlebrook 7H10 (Difco, EUA), foram obtidas conforme descrito na etapa 3.4.1. A concentração foi determinada pela leitura da absorvância em espectrofotômetro a 620 nm na faixa de 2,150 a 2,200. As células em suspensão foram diluídas em água purificada e 125 µL de cerca de 10⁹ UFC foram inoculadas por compartimento.

Nos dias 7 e 14, o meio foi removido e, foram feitas 3 lavagens com tampão PBS em cada compartimento. Durante o período de incubação de 14 dias, no oitavo dia, os meios foram trocados por meios novos. As placas foram coradas com 50 µL de corante de viabilidade *Live/Dead BacLight* (Invitrogen, Eugene, OR, USA) de acordo com as instruções do fabricante e mantidas no escuro até sua análise. O reagente SYTO9 permitiu a visualização de fluorescência verde para as formas bacterianas sésseis viáveis e o iodeto de propídio fluorescência vermelha para as bactérias mortas. A análise da arquitetura do biofilme formado por *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 foi realizada no microscópio de varredura confocal a

laser Leica TCS-SPE (Leica, Germany) e as imagens geradas foram analisadas por *software* LAS X.

3.4.7 Quantificação do biofilme por contagem das unidades formadoras de colônias em superfície de vidro

Os biofilmes foram desenvolvidos em lamínulas de vidro autoclavadas e incubadas em placa de cultura de tecido de 24 poços. Cada lamínula foi coberta com 200 µL de caldo PB modificado contendo glutaraldeído nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 1,5% (v/v) e, sem glutaraldeído. As suspensões de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594, coletados a partir da superfície de duas placas de ágar Middlebrook 7H10 (Difco, EUA), foram obtidas conforme descrito na etapa descrita em 3.4.1. A concentração foi determinada pela leitura da absorvância em espectrofotômetro a 620 nm na faixa de 2,150 a 2,200. As células em suspensão foram diluídas em água purificada e 200 µL de cerca de 10^9 UFC foram inoculadas por poço. A concentração de inóculo foi confirmada pela contagem de UFC das diluições de 10^{-7} e 10^{-8} inoculadas em duplicata em placas de ágar Middlebrook 7H10. Na mesma placa de 24 poços foram realizados os controles de esterilidade dos discos, dos meios de cultura utilizados com e sem glutaraldeído e viabilidade do microrganismo. As placas foram incubadas por 7 e 14 dias, a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ sem agitação. Ao final do tempo de incubação, as lamínulas foram removidas com pinças estéreis, mergulhadas três vezes com movimentos suaves para cima e para baixo num béquer contendo tampão PBS para remover bactérias pouco aderidas.

Após as lamínulas serem lavadas em PBS, elas foram colocadas em outra placa de 24 poços com 200 µL de PBS com 0,5% de Tween 80 para posterior fricção mecânica da lamínula com um “rodo”. As lamínulas foram colocadas em tubos de centrifuga de polipropileno de 50 mL contendo 10 mL de PBS com 0,5% de Tween 80. Os microrganismos foram removidos da superfície pela aplicação de um ciclo de sonicação de 10 minutos, seguido de agitação por 1 minuto. A partir da suspensão gerada foram retiradas alíquotas de 0,5 mL de cada tubo, realizadas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-7} com 4,5 mL de tampão monopotássico 0,00425%. Após as diluições, foram retiradas três alíquotas de 10 µL de cada diluição em duplicata e

semeadas em placas contendo ágar MH. As placas foram incubadas por 5 a 7 dias a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. A eficiência da remoção foi estimada pela visualização microscópica dos isolados crescidos em triplicata sob cada condição de cultivo.

3.5 ANÁLISE PROTEÔMICA

A próxima etapa do projeto foi a utilização das técnicas proteômicas para identificação e quantificação das proteínas extraídas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 e CRM 270. Foram utilizadas 5 replicatas biológicas de um ponto do crescimento dos microrganismos.

3.5.1 Padronização do inóculo das cepas utilizadas no estudo visando a extração de proteínas

A partir da cultura estoque em criotubo das cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 e CRM 270, foram inoculadas duas placas de ágar Middlebrook 7H10 (BD Difco™, USA), que foram incubadas por 7 dias a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Após esse período, alçadas foram transferidas para um tubo cônico de 50 mL contendo 10 mL de água purificada e pérolas de vidro. O microrganismo foi homogeneizado por 5 minutos em agitador de tubos e, após um período de 20 minutos para sedimentação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo. Foi realizada uma diluição dessa suspensão na faixa de 2,100 a 2,300 (leitura realizada em uma densidade ótica de 620 nm em espectrofotômetro Shimadzu Modelo FTIR – 8400S). Essa faixa foi anteriormente estabelecida no laboratório, sendo obtida uma contagem de células de cerca de $1,5 - 5,0 \times 10^9$ UFC/mL (EN 14348, 2005). Visando essa confirmação foi realizada uma contagem de UFC/mL presentes nessas suspensões. Alíquotas de 100 μL de cada cepa foram retiradas e inoculadas em 900 μL de água purificada. Foram realizadas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-7} . Após as diluições, foram retiradas alíquotas de 10 μL de cada diluição, em duplicata que foram semeadas em placas contendo ágar MH. As placas foram incubadas por 5 a 7

dias a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. A contagem das colônias foi realizada apenas nas diluições que apresentavam contagem de colônias na faixa de 0 a 30 UFC/10 μL (CHEN; NACE; IRWIN, 2003).

3.5.2 Extração das proteínas

A partir da cultura estoque em criotubo das cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 e CRM 270, foi primeiramente realizado o procedimento descrito no item 3.4.1.

A suspensão gerada foi inoculada em tubos contendo 10 mL de caldo PB modificado. Após o período de 7 dias a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, todos os crescimentos bacterianos foram separados por meio de centrifugação, por 30 minutos, a 7.000 *g*, na temperatura de 4°C . O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foram adicionados 1,2 mL de tampão fosfato salina (PBS) para lavagem. Essa suspensão foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e centrifugada por 20 minutos a 13.000 *g*. Essa etapa de lavagem foi repetida três vezes, sempre descartando o sobrenadante. Os *pellets* referentes a cada condição biológica e replicatas (n=5) foram armazenados a -70°C até a posterior etapa de lise.

Ao *pellet* de células da micobactéria foram adicionados 100 μL de tampão 0,05 M Tris-HCl, pH 7,6 com inibidor de proteases (Complete™, Roche, Suíça). A esse microtubo foram adicionadas pérolas de vidro de 425-600 microns (na quantidade aproximada de metade do volume líquido). A lise celular foi realizada no equipamento *Mini Beadbeater* (Biospec Products) em ciclos de 30 segundos, com intervalos de 1 minuto em banho de gelo. Após, foram adicionados 20 μL do mesmo tampão, acrescido de 10% de sódio dodecil sulfato (SDS), perfazendo uma concentração final de 2% de SDS. As amostras foram fervidas por 3 minutos, esfriadas à temperatura ambiente e centrifugadas por 5 minutos a 14.000 *g*. O sobrenadante foi retirado e transferido para outro microtubo. A dosagem de proteínas presentes foi realizada pelo método do ácido bicinchonínico (BCA).

3.5.3 Dosagem de proteínas pelo ácido bicinchonínico

A concentração proteica das amostras foi determinada pelo método do BCA (SMITH et al, 1985). A curva padrão de albumina bovina sérica (BSA, 1 mg/mL) foi preparada em duplicata no intervalo de 0 a 50 µg de BSA, completando com salina para um volume final de 100 µL. As amostras de proteínas das micobactérias crescidas na presença e ausência de glutaraldeído (0,5%, 1,0% e 1,5%) foram preparadas em duplicata no mesmo volume final (10 µL da amostra completando até 100 µL de salina). Em cada um dos tubos foram adicionados 2 mL da mistura do reagente A (ácido bicinchonínico, carbonato de sódio, tartarato de sódio e bicarbonato de sódio em NaOH a 0,1 N) com o reagente B (4% de sulfato de cobre II pentahidratado), numa proporção de 2 partes do reagente A e 0,04 do reagente B. Após 30 minutos de incubação a 37°C, a absorvância foi medida a 562 nm na leitora de placas *VersaMax Microplate Reader* (Molecular Devices, EUA). A partir desta leitura foi realizado o cálculo da concentração das proteínas nas amostras pela curva padrão de BSA.

3.5.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e revelação por impregnação por prata

A fim de visualizar o perfil eletroforético das proteínas extraídas, foram preparados géis de poliacrilamida de acordo com o método descrito por Laemmli (1970), em sistemas VertILO (Loccus Biotecnologia). O gel de empilhamento foi preparado com acrilamida a 4% T/2,67% C em tampão Tris-HCl 0,5M pH 6,8 com SDS a 0,4% (m/v), enquanto que o gel de corrida foi preparado com acrilamida a 12% T/2,67% C em tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 com SDS a 0,4% (m/v). Nas amostras a serem analisadas, foi adicionado tampão Tris-HCl 0,06 M pH 6,8, SDS 2% (m/v), ditioneitol (DTT) 20mM, glicerol 10% (v/v) e azul de bromofenol a 0,025% (m/v). Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100°C por 5 minutos, resfriadas até a temperatura ambiente e centrifugadas a 14.000 g por 5 minutos para aplicação no gel. Os parâmetros elétricos da corrida foram de 200 V constantes por aproximadamente 40 minutos, em tampão de corrida contendo Tris 25 mM, glicina

192 mM, SDS 0,1% (p/v), pH 8,8. Os padrões de calibração utilizados (GE Healthcare) foram: fosforilase B (97 kDa), BSA (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor triptico de soja (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa). Após a corrida eletroforética, os géis foram fixados por 30 minutos em solução de etanol 40% e ácido acético a 10%, sob agitação. Em seguida, esta solução foi descartada e os géis foram sensibilizados com 50 mL de uma solução de etanol a 30% (v/v), glutaraldeído 0,5% (v/v), tiosulfato de sódio 0,2% (m/v) e acetato de sódio 12% (m/v) por 30 minutos. Esta solução foi descartada e os géis foram lavados por 3 ciclos de 2 minutos com água Milli-Q. Após a lavagem, os géis foram impregnados com 50 mL de uma solução de nitrato de prata 0,25%, formaldeído 0,04% (v/v) e tiosulfato de sódio 0,001% (m/v) por 20 min, sob agitação. Os géis foram lavados novamente com água Milli-Q por três ciclos de 20 segundos para remover o excesso da solução anterior, sendo revelados com 50 mL de uma solução de carbonato de sódio 2,5% (m/v), formaldeído 0,02% (v/v) e tiosulfato de sódio 0,001% (m/v) em água e agitados até que a revelação de todas as bandas ocorresse. Em seguida, esta solução foi descartada e a reação foi encerrada pela adição de 50 mL de uma solução de EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,5% (m/v) mantendo os géis sob agitação por 10 minutos. Os géis revelados foram guardados em ácido acético a 1% (v/v) em água.

3.5.5 Digestão das amostras pelo método *Filter Aided Sample Preparation* (FASP) e dessalinização

A digestão das amostras foi conduzida segundo o protocolo descrito por Wisniewski et al (2009), com algumas modificações. Para 100 μg de proteínas, foi adicionado DTT para uma concentração final de 50 mM. As amostras foram fervidas por 3 minutos e esfriadas à temperatura ambiente. Foram usados filtros de 0,5 mL com membrana de corte a 30 kDa (Merk Millipore) para auxiliar na retirada de reagentes prejudiciais às etapas seguintes de tripsinização e purificação dos peptídeos. Cada unidade de filtração foi previamente lavada com 200 μL de água Mili-Q e centrifugada por 7 minutos a 10.000 g . Adicionou-se às amostras nas unidades de filtração, 8 M de ureia em tampão 0,1 M Tris-HCl pH 8,5, numa relação

de 200 μL de ureia para cada 30 μL de amostra, e o conjunto foi centrifugado por 17 minutos a 10.000 g . Este passo foi repetido com mais 200 μL de ureia. Em seguida, as amostras foram incubadas a 25°C com 100 μL iodoacetamida (IAA) a 0,05 M, homogeneizadas em câmara escura (Thermomixer C - Eppendorf) por 15 minutos. Após centrifugação (10 minutos a 10.000 g), as amostras foram lavadas três vezes com 100 μL de ureia, seguida por outras três etapas de lavagem com tampão de digestão 0,05 M Tris-HCl pH 8,5, sendo que em cada etapa as amostras foram centrifugadas a 10.000 g .

Adicionou-se, então, 40 μL de tampão de digestão e 5 μL de solução estoque de tripsina (20 μg em 100 μL de ácido acético 50 mM) (Promega, EUA), seguido de homogeneização em Thermomixer por 1 minuto a 37°C. Após esse tempo, as unidades de filtração foram vedadas com *Parafilm* e incubadas em câmara úmida a 37°C, por aproximadamente 20 horas, sem agitação.

Os filtros foram então transferidos para novos microtubos e centrifugados por 5 minutos a 10.000 g . Foram adicionados a cada microtubo, 100 μL de tampão de digestão e os microtubos foram centrifugados por mais 10 minutos a 10.000 g . O conteúdo foi seco em centrífuga a vácuo por aproximadamente 1 hora.

As amostras foram ressuspensas em 20 μL de ácido trifluoroacético 1% (TFA), homogeneizadas em agitador de tubos, sonicadas por 5 minutos e aplicadas em micro-colunas de aproximadamente 10 μL de resina C8-18 Poros R2 (*Life Technology*). Foram então equilibradas com TFA (1% v/v), seguindo-se de três lavagens com 0,1% (v/v) de TFA, para posterior eluição com 0,1% (v/v) de TFA em 70% (v/v) de acetonitrila. Os peptídeos foram secos no *speed vac* e imediatamente ressuspensos em 80 μL de ácido fórmico a 1% (v/v), seguido de 10 minutos de ultrassom e agitação vigorosa. Dois microlitos destas amostras foram usados para estimar a concentração dos peptídeos por leitura da absorvância 280 nm no *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific).

3.5.6 Análise dos peptídeos por espectrometria de massas

Os peptídeos foram ressuspensos em 1% (v/v) de ácido fórmico em água e, posteriormente, analisados por *Nanoflow Liquid Chromatography-nanoelectrospray*

ionization-tandem Mass Spectrometry (nLC-nESI MS/MS) em sistema cromatográfico Ultimate 3000 (Dionex) acoplado ao espectômetro de massas Q-Exactive Plus (Thermo). Para tal, a amostra foi inicialmente aplicada a uma coluna de guarda com 2 cm (100 μm de diâmetro interno) empacotada com partículas de sílica de diâmetro de 5 μm , poro de 200 Å - Magic C18 AQ (Michrom Bioresources, EUA). Em seguida, a amostra foi separada em coluna de 40 cm, *PicoFrit Self-Pack* (75 μm de diâmetro interno) e ponta de 10 μm (New Objective), empacotada com sílica de 1,9 μm - *ReproSil-Pur* 120 C18-AQ (MAISCH, Alemanha). As amostras foram carregadas em 0,1% (v/v) de ácido fórmico e 2% de acetonitrila (eluente A), na pré-coluna, com fluxo de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$, enquanto que a separação cromatográfica ocorreu a 200 nL/min. Os peptídeos foram eluídos com um gradiente de 2 a 45% de 0,1% (v/v) de ácido fórmico em acetonitrila (eluente B) durante 172 minutos, seguido de gradiente 40-80% B em 4 minutos e lavagem a 80% B por 2 minutos. Na entrada do espectrômetro, a voltagem do *spray* foi ajustada para 1,9 kV, sem fluxo de gás auxiliar e com a temperatura do capilar a 250°C. A voltagem das lentes foi ajustada para 60 V.

Os espectros dos precursores (MS) foram adquiridos no analisador *Orbitrap* com resolução de 70.000 (*Full Width Half maximum*, FWHM para m/z 200), valor de *Automatic Gain Control* (AGC) definido para 1×10^6 e tempo máximo de injeção de 250 ms. Até 12 íons precursores mais abundantes de cada varredura (de intervalo de m/z 300 a 1.500) foram sequencialmente submetidos à fragmentação por HCD e os íons-fragmento foram analisados novamente no *Orbitrap* com resolução de 17.500, no modo MS/MS, usando os seguintes parâmetros: valor de AGC definido para 5×10^4 , tempo de preenchimento máximo de 50 ms e limite de sinal mínimo de 10^5 contagens. A fragmentação do íon precursor foi realizada utilizando a energia de colisão normalizada de 35%, janela de isolamento de 2 m/z , tempo de ativação de 50 ms e tempo de permanência de um íon na lista de exclusão (exclusão dinâmica) de 60s. Íons de carga única e íons sem estado de carga definido não foram submetidos a MS/MS. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas técnicas, e os dados foram adquiridos utilizando o *software* Xcalibur (versão 3.0.63 - Thermo Fisher). O espectrômetro de massas foi calibrado externamente, utilizando uma mistura composta por cafeína, peptídeo MRFA e Ultramark 1621, tal como recomendado pelo fabricante do instrumento.

3.5.7 Análise dos dados

As buscas contra os bancos de dados foram realizadas com a ferramenta Comet (versão 2013.02), dentro do ambiente computacional PatternLab (versão 4.0) (CARVALHO et al, 2016). A estratégia de identificação baseou-se na correlação dos espectros experimentais de MS/MS com espectros de fragmentação teóricos, derivados de sequências obtidas em um banco de dados (PSM). Foram compilados quatro bancos de dados proteômicos de referência de *Mycobacterium abscessus* depositados no Uniprot: *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* 57 (ID UP000185223) com 6.751 sequências; *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* 1513 (ID UP000023351) com 5.985 sequências; *Mycobacterium abscessus* (strain ATCC 19977 / DSM 44196 / CIP 104536 / JCM 13569 / NCTC 13031 / TMC 1543) (ID UP000007137) com 4.940 sequências; e *Mycobacterium abscessus* (ID UP000038470) com 7.750 sequências; totalizando 25.426 sequências. Foram incluídos 127 contaminantes comuns (e.g., tripsina, queratina, BSA), além de sequências peptídicas invertidas, formando um banco reverso. Para eliminar a redundância do banco, sequências contidas dentro de outra sequência (com 100% de identidade) foram removidas e suas respectivas descrições foram incluídas na descrição da proteína com sequência mais extensa (BARBOZA et al, 2011, CARVALHO et al, 2012b). Os parâmetros da busca foram: peptídeos trípticos e semi-trípticos, com massas entre 500 e 5.000 Da, até 2 sítios de clivagem perdidos, modificação fixa: carbamidometilação (Cys), modificação variável: oxidação (Met), tolerância inicial de 40 ppm para íons precursores. A filtragem dos PSM foi feita usando o *Search Engine Processor* (SEPro) (CARVALHO et al, 2012a). Para cada resultado, os escores de cada métrica (XCorr, DeltaCN e ZScore) foram usados para gerar um discriminador Bayesiano, aceitando 1% de falsas descobertas (*False Discovery Rate*, FDR), estimadas pelo número de identificações de sequências do banco reverso. As proteínas mapeadas foram agrupadas de acordo com a máxima parcimônia (ZHANG; CHAMBERS; TABB, 2007). O FDR global da análise foi de 1% (BARBOZA et al, 2011).

As diferentes condições biológicas foram organizadas no módulo *Project Organization* e, em seguida, foi feita a quantificação relativa através de contagem espectral, habilitando o fator de distribuição normalizada da abundância espectral

(*distributed normalized spectral abundance factor*, dNSAF) (ZHANG et al, 2010b). Foi gerado um arquivo *.plp* para análise qualitativa dos dados através de um diagrama de Venn (*Approximately área-proportional Venn Diagram*). As proteínas assinaladas em cada condição biológica foram, então, exportadas para planilhas Excel (Microsoft).

O módulo *TFold test* do programa *PatternLab for proteomics 4.0* foi utilizado para maximizar as identificações que satisfizessem tanto um *cut-off* de *fold change* quanto de *p-valor*. Neste módulo, o *cut-off* do *fold change* de uma proteína é dado em função do seu *p-valor* e um critério de estringência que objetiva detectar (e separar) proteínas de baixa abundância usando um estimador *BH FDR* (CARVALHO et al, 2016). Foram utilizados os seguintes parâmetros: mínimo de 2 replicatas técnicas, *BH q-value* de 0,05 e *L-stringency* otimizado. Este parâmetro é o expoente da lei de potência que o programa usa para maximizar o número de proteínas diferencialmente abundantes para o *q-valor* específico. Cada proteína mapeada é representada por um ponto em um *Volcano plot*, de acordo com seu *p-valor* (eixo x) e *fold-change* (eixo y) (CARVALHO et al, 2012, CARVALHO et al, 2016). Os pontos vermelhos correspondem às proteínas que não satisfazem nenhum dos critérios (*fold-change* e *q-valor*); os pontos verdes, àquelas que satisfazem somente critério de *fold-change*; os laranjas correspondem às proteínas que satisfazem tanto o critério de *fold change* quanto o de *q-valor*, entretanto, são proteínas de baixa abundância, que precisariam de mais experimentos para confirmar sua diferença de abundância; por fim, os pontos azuis representam as proteínas que satisfazem todos os filtros estatísticos e, portanto, foram as utilizadas para as análises das proteínas diferencialmente abundantes.

3.5.8 Análise de enriquecimento de termos ontológicos para as proteínas

O termo ontologia em uma definição mais abrangente significa uma forma de organizar, definindo classes e hierarquias aos aspectos fundamentais de uma determinada entidade em estudo (SMITH et al, 2007).

Uma ontologia consiste em uma representação ou classificação utilizada como um meio para categorizar ou agrupar as informações em classes (SMITH et al,

2007). O *Gene Ontology* (GO) é parte de um esforço internacional de classificação de ontologias chamado *Open Biomedical Ontologies* (OBO) (<http://obofoundry.org>), cujo objetivo é controlar e regulamentar as definições e utilização de vocabulário das informações biomédicas. Trata-se de uma importante iniciativa para unificar a representação de genes e suas expressões, tais como RNA e proteínas, para todas as espécies

As análises de enriquecimento de termos de GO foram realizadas através do sistema *Annotation Retrieval of Gene Ontology Terms 2.5* (ARGOT 2.5) (<http://www.medcomp.medicina.unipd.it/Argot2-5/>). As proteínas identificadas foram classificadas por ontologia de termos definidos segundo três domínios do GO: Processo biológico, Função Molecular e Componente celular e, para cada categoria, utilizou-se uma estrutura de subcategorias mais específicas (LAVEZZO et al, 2016).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DAS CEPAS E AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Foram realizados testes bioquímicos convencionais com as duas cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii*, CBRVS 00594 e CRM 270, como etapa de caracterização fenotípica destas cepas. Na **Tabela 1**, são apresentados os resultados esperados para as provas bioquímicas convencionais relevantes para identificação do grupo *M. chelonae* – *M. abscessus*.

Tabela 2. Resultados esperados nos testes bioquímicos para identificação do grupo *M. chelonae* – *M. abscessus* (Kent; Kubica, 1985).

Microrganismos	Catalase	Catalase a 68°C	Niacina	Nitrato
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CBRVS 00594	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> CRM 270	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<i>M. avium</i> (controle)	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<i>M. tuberculosis</i> (controle)	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo

Para melhor caracterização dessas cepas, foi realizada também a avaliação da susceptibilidade de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 e CRM 270 a várias classes de antimicrobianos. As cepas foram classificadas em resistentes (R), intermediárias (I) e sensíveis (S), de acordo com o perfil de susceptibilidade a esses antimicrobianos (CLSI, 2011).

A avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos revelou que as duas cepas apresentaram resistência à ciprofloxacina, à doxiciclina, ao trimetropim/sulfametoxazol, à tobramicina e à moxifloxacina. Já para a cefoxitina, apresentaram perfil intermediário. *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 foi sensível à claritromicina, ao contrário da cepa CRM 270 que apresentou resistência a esse antimicrobiano.

M. abscessus é uma das espécies de MCR mais resistentes aos antibióticos, e apenas um pequeno número de antibióticos úteis está disponível para o seu tratamento (MOUGARI et al, 2016), e isso se deve principalmente ao uso extensivo e irracional desses antimicrobianos no ambiente hospitalar.

Estudos com isolados de *M. abscessus* subsp. *bolletii* em Taiwan, Bélgica e São Paulo, relataram altos percentuais de resistência à ciprofloxacina, à doxiciclina, ao trimetropim/sulfametoxazol, à tobramicina e à moxifloxacina, assim como observado em nosso estudo (LEE et al, 2014, RAMIS et al, 2015). Ramis et al (2015) também observaram um isolado de *M. abscessus* subsp. *bolletii* resistente à claritromicina, assim como a cepa CRM 270 deste estudo. Isso pode estar relacionado, ao já relatado por vários estudos, que a resistência adquirida para este antibiótico tem ocorrido rapidamente devido a mutações pontuais no gene *rrl* que codifica o domínio peptidiltransferase do rRNA 23S (MOUGARI et al, 2016, KIM et al, 2016, MOUGARI et al, 2017).

4.2 AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA DAS CEPAS FRENTE AO GLUTARALDEÍDO

Quanto à verificação da suscetibilidade das cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 e CRM 270 frente ao produto à base de glutaraldeído, a cepa CBRVS 00594 foi classificada como altamente tolerante, já que foi observado crescimento micobacteriano nos trinta tubos de meios de cultura empregados no experimento, em um tempo de incubação inferior (15-20 dias) ao preconizado pela técnica para a primeira leitura. Já a cepa CRM 270 se mostrou médio tolerante, visto que foi observado crescimento em média de 14 tubos contendo os meios de cultura, em um período de 30 dias após a incubação do ensaio. Após esta análise, as cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 e CRM 270 foram identificadas como altamente tolerante (AT) e médio tolerante (MT), respectivamente.

Os ensaios de esterilidade, viabilidade e contagem das células nos cilindros carreadores foram realizados em todos os ensaios com o desinfetante à base de glutaraldeído e os resultados obtidos foram satisfatórios, de acordo com o preconizado pela metodologia.

Tais resultados se apresentam em concordância com vários estudos citados anteriormente, sugerindo que cepas AT ao glutaraldeído estão disseminadas em ambientes hospitalares e estão presentes, principalmente, nos surtos de infecções por *M. abscessus* subsp. *bolletii* após procedimentos invasivos (VAN KLINGEREN; PULLEN, 1993, GRIFFITHS et al, 1997, DUARTE et al, 2009, LORENA et al, 2010, SOUTO, 2011).

4.3 ANÁLISE DO BIOFILME

4.3.1 Análise quantitativa do biofilme em concentrações subinibitórias de glutaraldeído

A quantificação do biofilme formado por *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 nos discos de Al e PC na ausência e presença de glutaraldeído nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 1,5% foi realizada em triplicata e os ensaios repetidos três vezes. Foi realizado o teste *Grubbs* em todos os ensaios para retirada de valores aberrantes e, o resultado da média está representado nas **Tabelas 2 e 3**.

Tabela 3. Formação de biofilme nos discos de aço inox (Al) por *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS n° 00594 na presença de diferentes concentrações de glutaraldeído. Os experimentos foram realizados com incubação por 7 dias a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

AÇO INOX	Média (UFC)	
	Sem Glutaraldeído	$7,7 \times 10^7$
0,5% Glutaraldeído	$1,0 \times 10^8$	
1,0% Glutaraldeído	$2,2 \times 10^6$	
1,5% Glutaraldeído	$6,4 \times 10^4$	

Os valores estão expressos em média, referente à triplicata, em três experimentos independentes. Foi aplicado o teste de Grubbs para verificação de valores aberrantes.

UFC = unidades formadoras de colônias.

Tabela 4. Formação de biofilme nos discos de policarbonato (PC) por *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 na presença de diferentes concentrações de glutaraldeído. Os experimentos foram realizados com incubação por 7 dias a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

POLICARBONATO	Média (UFC)	
	Sem Glutaraldeído	$7,1 \times 10^8$
0,5% Glutaraldeído	$1,2 \times 10^8$	
1,0% Glutaraldeído	$7,7 \times 10^6$	
1,5% Glutaraldeído	$2,3 \times 10^5$	

Os valores estão expressos em média, referente à triplicata, em três experimentos independentes. Foi aplicado o teste de Grubbs para verificação de valores aberrantes.

UFC = unidades formadoras de colônias.

A análise comparativa do nível de aderência das células presentes nos discos de AI nas diferentes concentrações de glutaraldeído foi realizada, considerando-se o crescimento sem glutaraldeído como controle. Foi observado que não houve diferença significativa entre os números de UFC recuperados no controle e na concentração subinibitória de 0,5% de glutaraldeído (p -valor 0,157704). Porém houve diferença significativa entre os números de UFC recuperados no controle e nas concentrações subinibitórias de 1,0% e 1,5% de glutaraldeído, respectivamente p -valor 0,000532 e 0,001463.

Em relação à análise comparativa do nível de aderência das células presentes nos discos de PC nas diferentes concentrações de glutaraldeído, foi também observado que não houve diferença significativa entre os números de UFC recuperados no controle e na concentração subinibitória de 0,5% de glutaraldeído (p -valor 0,060602). Porém houve diferença significativa entre os números de UFC recuperados no controle e nas concentrações subinibitórias de 1,0% e 1,5% de glutaraldeído, respectivamente p -valor 0,000349 e 0,000349.

Os resultados da análise comparativa da habilidade de formação de biofilme em superfícies de diferentes substratos abióticos (PC e AI) por *M. abscessus* subsp. *bolletii* demonstraram que o microrganismo foi capaz de formar biofilme tanto no disco de PC quanto no de AI, mesmo em concentrações mais elevadas de glutaraldeído. Esses resultados são corroborados, em parte, por aqueles apresentados em vários estudos, quando foi observado o desenvolvimento de

biofilme em cepas de *M. abscessus* em várias superfícies abióticas (MARTÍN-DE-HIJAS et al, 2009, WILLIAMS et al, 2009, DE et al, 2017).

Foi possível observar também que ocorreu uma maior recuperação de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 no disco de PC na presença e ausência de glutaraldeído. Assim como em nosso estudo, Williams et al (2009) também observaram que as superfícies de PC produziram contagens de UFC presentes no biofilme significativamente maiores (p -valor $<0,01$) do que em superfícies de Al para vários isolados testados (*M. abscessus* ATCC 23007, *M. chelonae* cepas 56 e 99 e *M. smegmatis* ATCC 19420) em meio de cultivo R2A (WILLIAMS et al, 2009).

Houve redução significativa da formação de biofilme de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 nas concentrações de 1,0% e 1,5% de glutaraldeído, conforme indicado nas **Tabelas 2 e 3**. Na literatura foi encontrado um estudo que verificou a formação de biofilme na presença de vários antimicrobianos. Foi observado que a formação de biofilme por *M. abscessus* e *M. abscessus* subsp. *bolletii* foi reduzida quando exposta à amicacina, à ciprofloxacina, à claritromicina, à doxiciclina e ao sulfametoxazol. O teste de destruição do biofilme revelou que os antimicrobianos utilizados empiricamente na terapia de micobacterioses são uma estratégia duvidosa para erradicar os biofilmes de MCR. Os biofilmes de *M. abscessus* também mostraram resistência quando expostos a agentes antimicrobianos. Assim, como no teste de inibição da formação de biofilmes, os biofilmes de *M. abscessus* subsp. *bolletii* mostraram-se mais sensíveis à ação dos antimicrobianos testados e somente o uso de sulfametoxazol não foi efetivo. Embora o biofilme tenha diminuído em algumas situações, nenhum dos antimicrobianos pôde erradicar completamente os biofilmes bacterianos. Isso deve ocorrer possivelmente porque a matriz do biofilme impede o acesso físico de agentes antimicrobianos, restringindo sua difusão. Além disso, os biofilmes micobacterianos contêm a matriz extracelular rica em ácidos micólicos livres que proporcionam uma maior resistência do biofilme a antimicrobianos, apesar da exposição a níveis elevados de antibióticos (FLORES et al, 2016).

Já, um estudo realizado por Bardouniotis, Ceri, Olson (2003) examinou o crescimento do biofilme de *M. fortuitum* e *M. marinum*, utilizando o sistema de ensaio *Minimal Biofilm Eradication Concentration* (MBEC) e compararam a susceptibilidade das células planctônicas e do biofilme aos antimicrobianos comercialmente disponíveis (fenol a 1,56%, monopersulfato de potássio a 21,4%, glutaraldeído a

70%, hipoclorito de sódio a 5,25%, peróxido de hidrogênio a 30%, acetato de clorohexidina a 2% e nitrato de prata). Os biofilmes e as bactérias planctônicas foram expostos aos antimicrobianos durante 30 e 120 minutos. Foi necessária uma maior concentração dos antimicrobianos para eliminar biofilmes de *M. fortuitum* em comparação com as bactérias planctônicas. Isso foi evidenciado pelos valores MBEC mais elevados em comparação com os valores de *Minimal Bactericidal Concentration* (MBC), com exceção do fenol e do peróxido de hidrogênio a 30 minutos. A mesma tendência foi observada aos 120 minutos, com exceção do peróxido de hidrogênio, fenol e monopersulfato de potássio. Logo, as bactérias do biofilme apresentaram maior resistência aos antimicrobianos em comparação com suas formas planctônicas (BARDOUNIOTIS; CERI; OLSON, 2003).

O biofilme de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594, como citado anteriormente, foi reduzido quando exposto às concentrações de 1,0% e 1,5% de glutaraldeído, comparado ao controle, mas não foi totalmente destruído, nos levando a crer na possibilidade da presença de *persisters*.

As bactérias persistentes são caracterizadas por um estado dormente com atividade metabólica reduzida, ou seja, sob um estado inativo, sem crescimento ou extremamente lento, não replicante. Elas são fenotipicamente distintas, mas são geneticamente idênticas ao resto da população bacteriana (BARRAUD et al, 2013, ORMAN; BRYNILDSEN, 2013, DUAN et al, 2016)

A natureza transitória deste interruptor fisiológico permite que as células que sobrevivem ao tratamento com antibióticos retomem o crescimento após o tratamento parar e produzam uma população bacteriana idêntica à da população original que consiste em células suscetíveis e tolerantes (LEWIS, 2007, DAWSON; INTAPA; JABRA-RIZK, 2011). Os biofilmes bacterianos geralmente possuem uma alta proporção de células que não respondem aos antimicrobianos, e isso provavelmente corresponde a presença de *persisters* que podem surgir como resultado da variação fenotípica de uma subpopulação de microrganismos heterogêneos e são vistos em uma variedade de espécies microbianas (DHAR; MCKINNEY, 2007, LEWIS, 2007, OJHA et al, 2008).

4.3.2 Análise qualitativa do biofilme em concentrações subinibitórias de glutaraldeído

4.3.2.1 *Microscopia Epifluorescente*

Nesta análise foi realizada a observação do biofilme por microscopia epifluorescente da cepa de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 corada com DAPI apenas no disco de PC. O disco de AI não proporciona a passagem de luz necessária para visualização do biofilme neste microscópio.

Imagens representativas do crescimento em diferentes concentrações de glutaraldeído e sem glutaraldeído são mostradas nas **Figuras 3 a 6**.

Figura 3. Observação microscópica de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 na ausência de glutaraldeído. Aumento: 100x.



Figura 4. Observação microscópica de *M. abscessus subsp. bolletii* CBRVS 00594 na presença de glutaraldeído a 0,5%. Aumento: 100x.

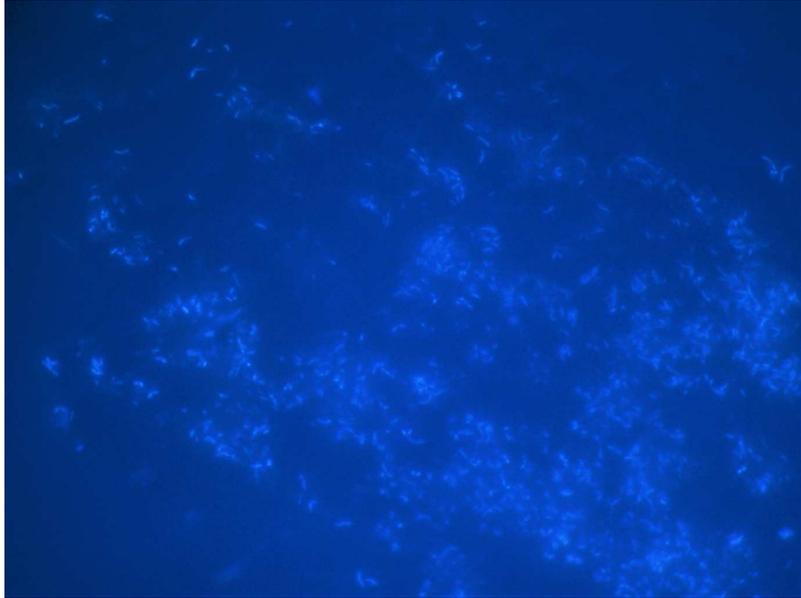


Figura 5. Observação microscópica de *M. abscessus subsp. bolletii* CBRVS 00594 na presença de glutaraldeído a 1,0%. Aumento: 100x.

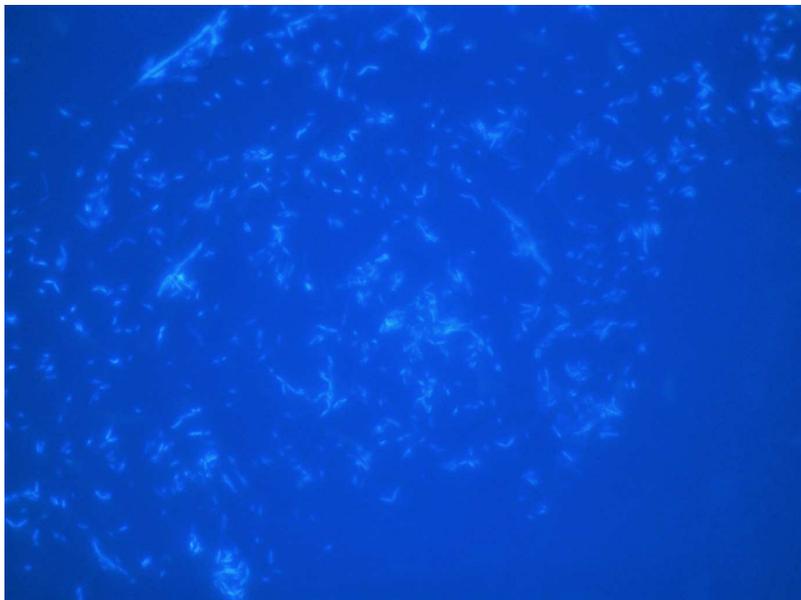
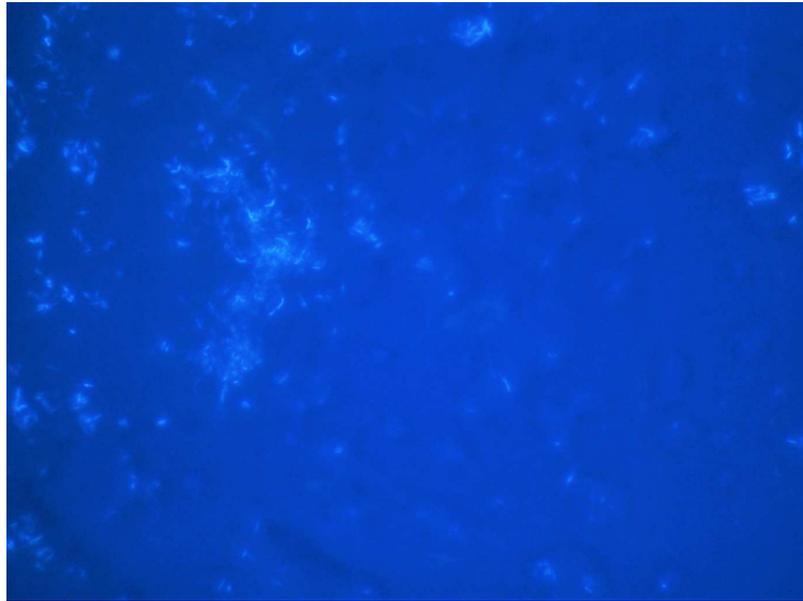


Figura 6. Observação microscópica de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 na presença de glutaraldeído a 1,5%. Aumento: 100x.



Como pode ser observado nas **Figuras 3, 4, 5 e 6**, a cepa de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 cresceu e pôde ser visualizada na ausência e presença de diferentes concentrações de glutaraldeído após os 7 dias de incubação. A visualização geral da microscopia revelou uma grande quantidade de aglomerados e de bactérias isoladas.

Na imagem do biofilme de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 formada na ausência de glutaraldeído foram observadas muitas células sésseis dispersas. Assim como em nosso estudo, Williams et al (2009) também observaram a formação de microcolônias difusas na cepa de *M. abscessus* ATCC 23007 crescida em meio R2A (WILLIAMS et al, 2009).

Na concentração de 0,5% de glutaraldeído, foi observado um crescimento considerável, com muitas células sésseis, o que também foi observado no experimento de quantificação do biofilme realizado em paralelo. Ao mesmo tempo, já podemos perceber também a presença de espaços intersticiais e aglomerados. A adesão dessa micobactéria na superfície do disco de PC na presença de glutaraldeído a 1,0% apresentou um número significativo de células sésseis isoladas, autoagregadas em microcolônias e vários espaços intersticiais. No biofilme formado por *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594 na concentração de 1,5% de glutaraldeído, foram observadas poucas bactérias aderidas à superfície do disco de

PC, com espaços intersticiais maiores comparado com os outros biofilmes e várias células autoagregadas em microcolônias. Porém, a presença de biofilme mesmo em altas concentrações de glutaraldeído é extremamente crítica e confirma o que foi descrito por Shin et al (2007), que as MCR podem sobreviver em equipamentos desinfetados de forma inadequada e, do risco que isso representa, já que esses equipamentos posteriormente são utilizados em diagnósticos clínicos ou em cirurgias, causando infecções relacionadas à assistência à saúde (SHIN et al, 2007).

4.3.2.2 *Microscopia Confocal de Varredura a Laser*

A capacidade de formação de biofilme foi observada por microscopia confocal de varredura a laser (MVCL) da cepa de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 na ausência e presença de diferentes concentrações de glutaraldeído, nos tempos de incubação de 7 e 14 dias. Os biofilmes formados foram analisados no tempo de incubação de 7 dias nas objetivas de 20x e 63x, porém não foi possível a visualização na objetiva de 63x nas amostras de 14 dias, devido a espessura elevada dos biofilmes formados.

Todas as amostras analisadas pelo MVCL desenvolveram o biofilme. As estruturas fotografadas apresentaram padrões de crescimento parecidos aos observados com corante DAPI (**Figuras 7, 8, 9 e 10**). O corante *LiveDead* nos permitiu avaliar a presença de bactérias vivas e mortas no biofilme, com maiores porcentagens de bactérias vivas em estado inicial de desenvolvimento do biofilme (dia 7) do que no biofilme maduro (dia 14).

Foi realizada também a quantificação da aderência do biofilme de *M. abscessus* subsp. *bolletii* em lamínulas de vidro na ausência e presença de glutaraldeído a 0,5%, 1,0% e 1,5%. Na ausência e na concentração de 0,5% de glutaraldeído foi possível recuperar cerca de 10^{10} UFC/mL nas superfícies das lamínulas de vidro. Já nas concentrações de 1,0% e 1,5%, respectivamente, foram recuperadas 10^8 e 10^6 UFC/mL células.

Figura 7. Análise estrutural do biofilme de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 (sem glutaraldeído - 7 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit *Live/Dead BacLight*. O reagente SYTO 9 permitiu a visualização de fluorescência verde para as formas bacterianas sésseis viáveis e o iodeto de propídio fluorescência vermelha para as não viáveis distribuídas nos biofilmes. Aumento de 63x z3x.

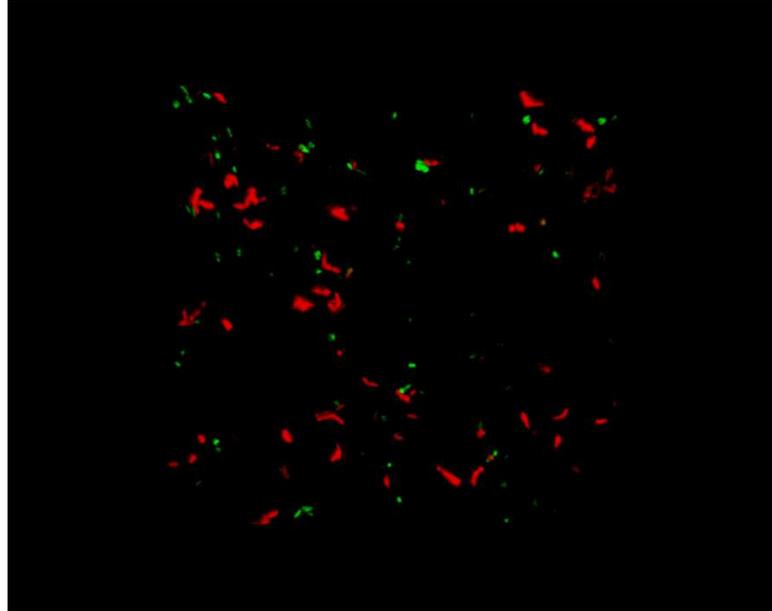


Figura 8. Análise estrutural do biofilme de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 (0,5% de glutaraldeído - 7 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit *Live/Dead BacLight*. O reagente SYTO 9 permitiu a visualização de fluorescência verde para as formas bacterianas sésseis viáveis e o iodeto de propídio fluorescência vermelha para as não viáveis distribuídas nos biofilmes. Aumento de 63x z3x.

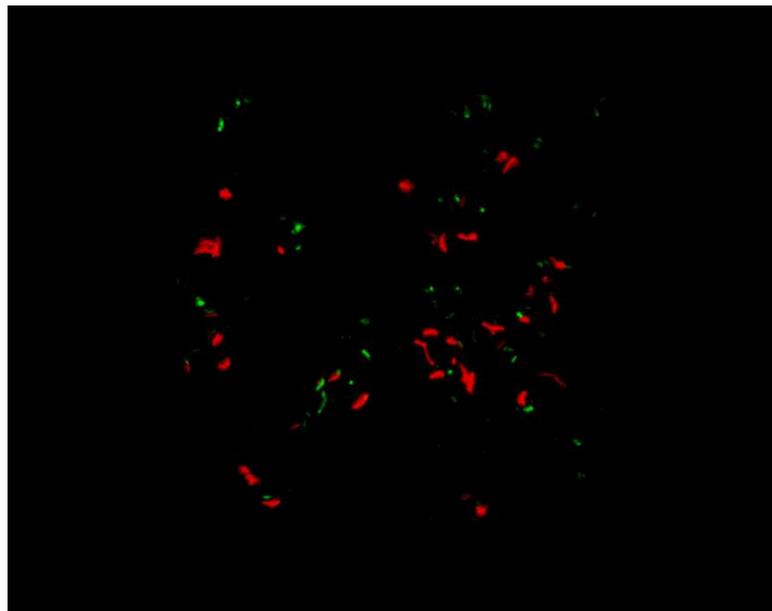


Figura 9. Análise estrutural do biofilme de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 (1,0% de glutaraldeído - 7 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit *Live/Dead BacLight*. O reagente SYTO 9 permitiu a visualização de fluorescência verde para as formas bacterianas sésseis viáveis e o iodeto de propídio fluorescência vermelha para as não viáveis distribuídas nos biofilmes. Aumento de 63x z3x.

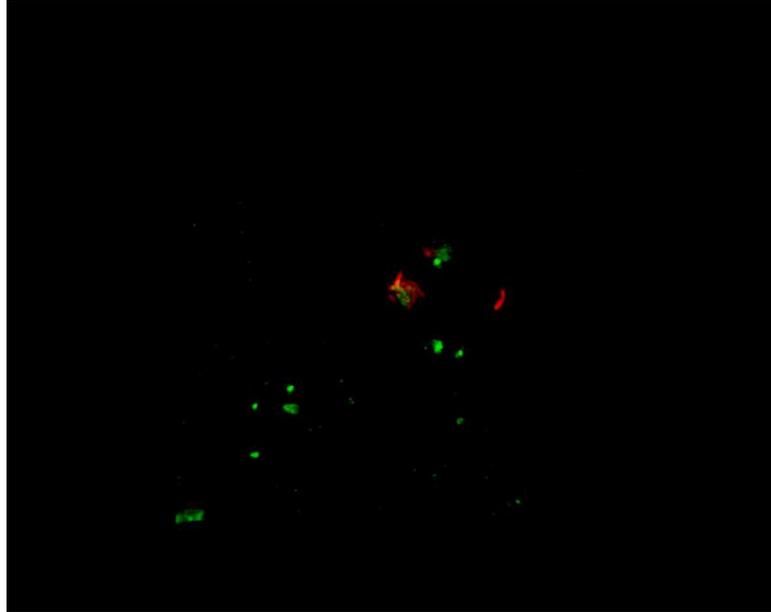
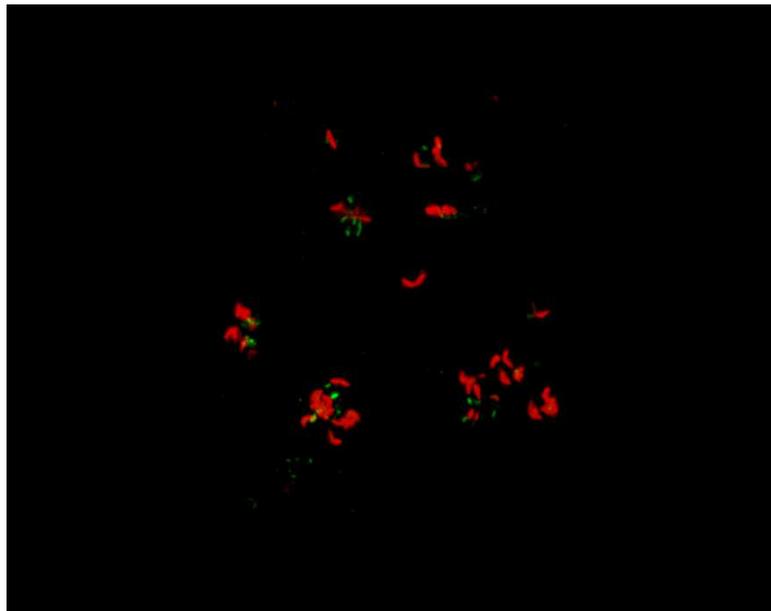


Figura 10. Análise estrutural do biofilme de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 (1,5% de glutaraldeído - 7 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit *Live/Dead BacLight*. O reagente SYTO 9 permitiu a visualização de fluorescência verde para as formas bacterianas sésseis viáveis e o iodeto de propídio fluorescência vermelha para as não viáveis distribuídas nos biofilmes. Aumento de 63x z3x.



As micrografias de ensaios de MVCL ilustrando a formação de biofilme na superfície hidrofílica de vidro em 7 dias de incubação pela amostra controle de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 na ausência de glutaraldeído estão apresentadas nas **Figuras 11 e 12 (A e B)**, onde podemos observar a presença de muitas células isoladas dispersas viáveis e não viáveis. Nas **Figuras 13 e 14 (A e B)** estão representadas as micrografias de ensaios de MVCL com *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 na presença de glutaraldeído a 0,5% demonstrando a formação de biofilme na superfície de vidro no tempo de incubação de 7 dias. Neste biofilme, além da presença de células isoladas dispersas viáveis e não viáveis, já observamos a formação de células agregadas.

As micrografias de ensaios de MCVL demonstrando a formação de biofilme na superfície hidrofílica do vidro por *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 na presença de glutaraldeído a 1,0% no tempo de 7 dias de incubação, estão apresentadas nas **Figuras 15 e 16 (A e B)**, onde podemos observar a presença de muitas células isoladas dispersas e viáveis, quando comparado com o biofilme do controle e do 0,5% de glutaraldeído, o que não era esperado. Foi observada também a presença de células agregadas. Nas **figuras 17 e 18 (A e B)** estão representadas as micrografias de ensaios de MVCL com *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 na presença de glutaraldeído a 1,5% demonstrando a formação de biofilme na superfície de vidro (7 dias de incubação). Neste biofilme, além da presença de células isoladas dispersas não viáveis, foram observadas também células agregadas e células viáveis, demonstrando a persistência desta micobactéria em altas concentrações de glutaraldeído.

Figura 11. Análise estrutural do biofilme em 2D de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 (sem glutaraldeído - 7 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit *Live/Dead BacLight*. O reagente SYTO 9 permitiu a visualização de fluorescência verde para as formas bacterianas sésseis viáveis e o iodeto de propídio fluorescência vermelha para as não viáveis distribuídas nos biofilmes. Aumento de 20x.

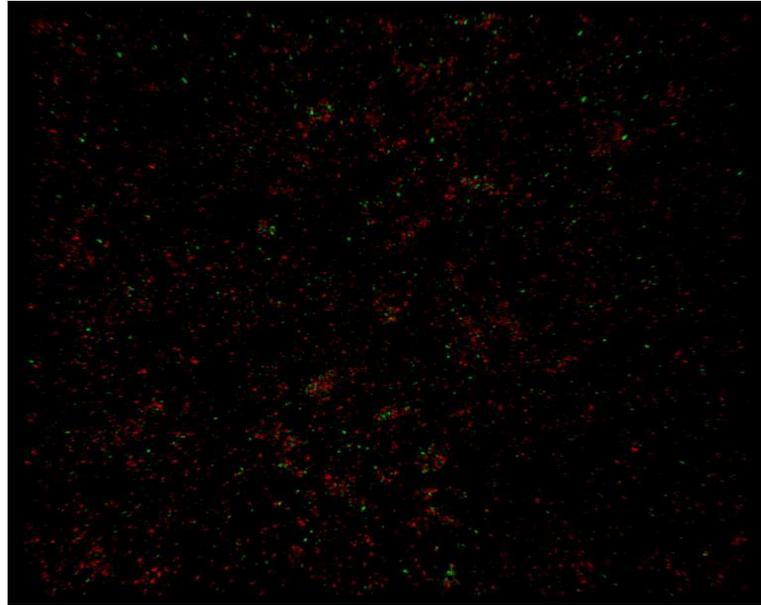


Figura 12. Análise estrutural do biofilme em 3D de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 (sem glutaraldeído - 7 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit *Live/Dead BacLight*. Aumento de 20x. A - células viáveis e não viáveis; B - células viáveis.

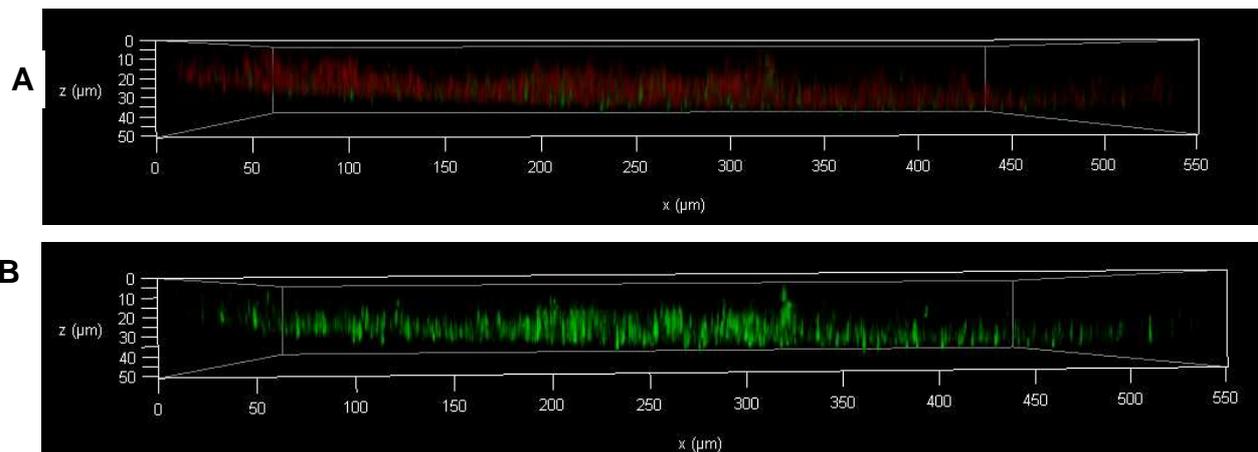


Figura 13. Análise estrutural do biofilme em 2D de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 (0,5% de glutaraldeído - 7 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit *Live/Dead BacLight*. O reagente SYTO 9 permitiu a visualização de fluorescência verde para as formas bacterianas sésseis viáveis e o iodeto de propídio fluorescência vermelha para as não viáveis distribuídas nos biofilmes. Aumento de 20x.

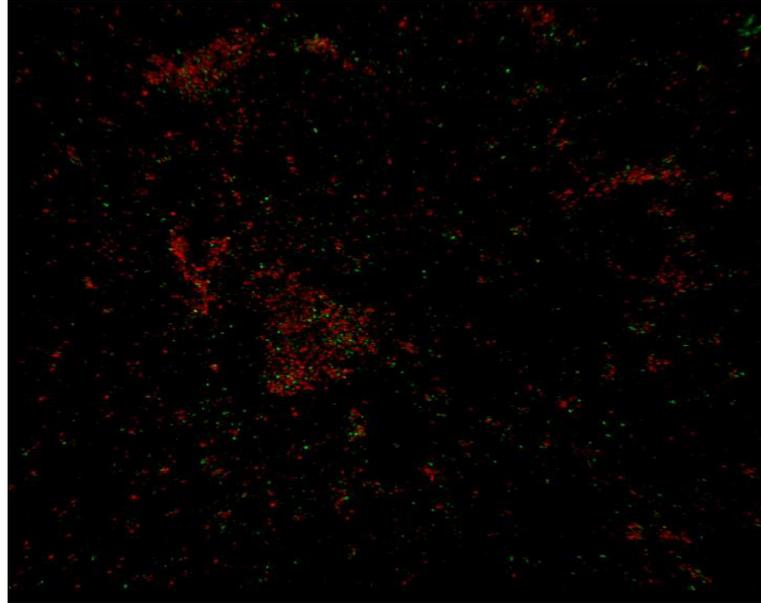


Figura 14. Análise estrutural do biofilme em 3D de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 (0,5% de glutaraldeído - 7 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit *Live/Dead BacLight*. Aumento de 20x. A - células viáveis e não viáveis; B - células viáveis.

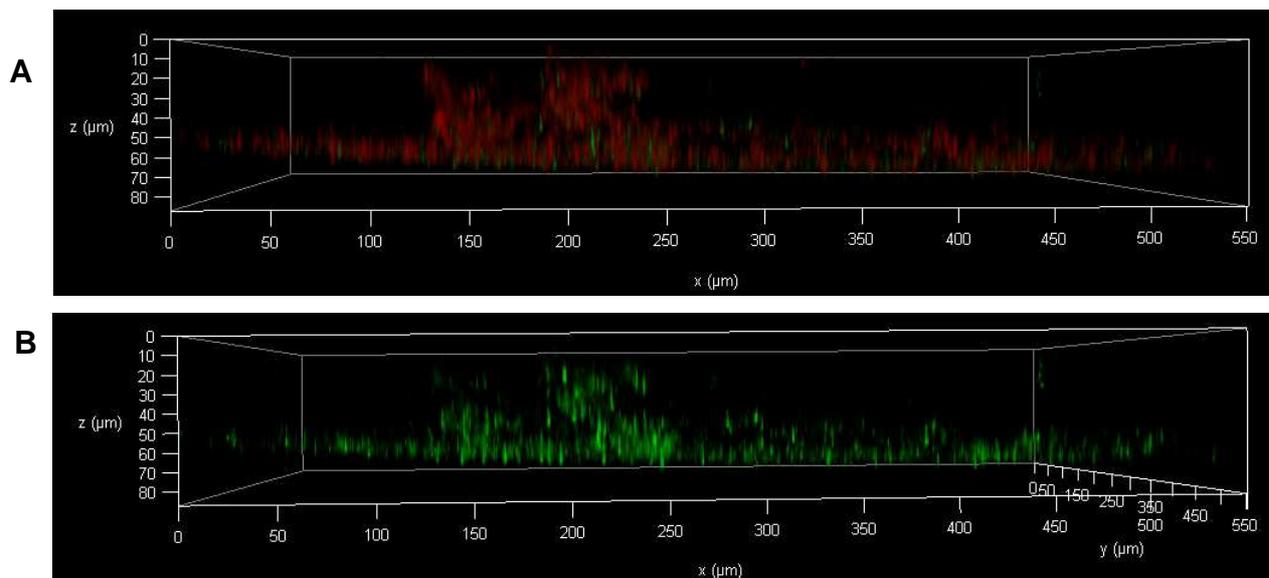


Figura 15. Análise estrutural do biofilme em 2D de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 (1,0% de glutaraldeído - 7 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit *Live/Dead BacLight*. O reagente SYTO 9 permitiu a visualização de fluorescência verde para as formas bacterianas sésseis viáveis e o iodeto de propídio fluorescência vermelha para as não viáveis distribuídas nos biofilmes. Aumento de 20x.

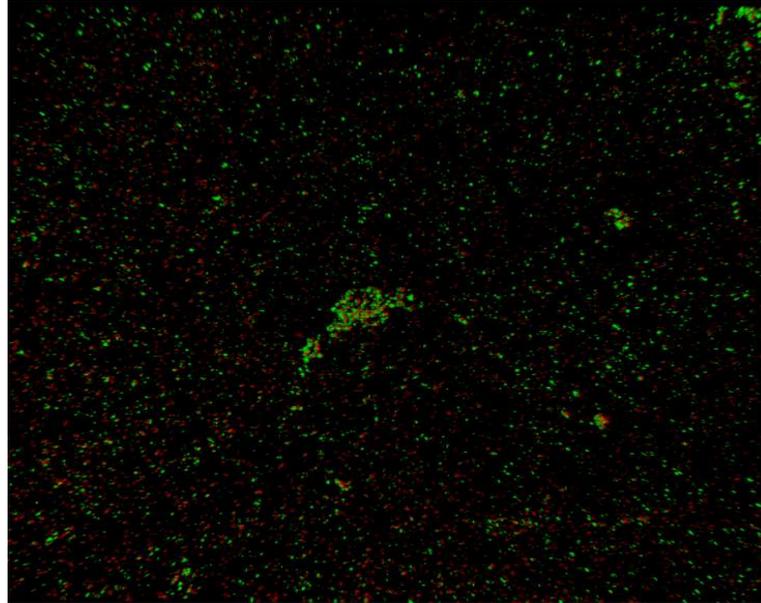


Figura 16. Análise estrutural do biofilme em 3D de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 (1,0% de glutaraldeído - 7 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit *Live/Dead BacLight*. Aumento de 20x. A - células viáveis e não viáveis; B - células viáveis.

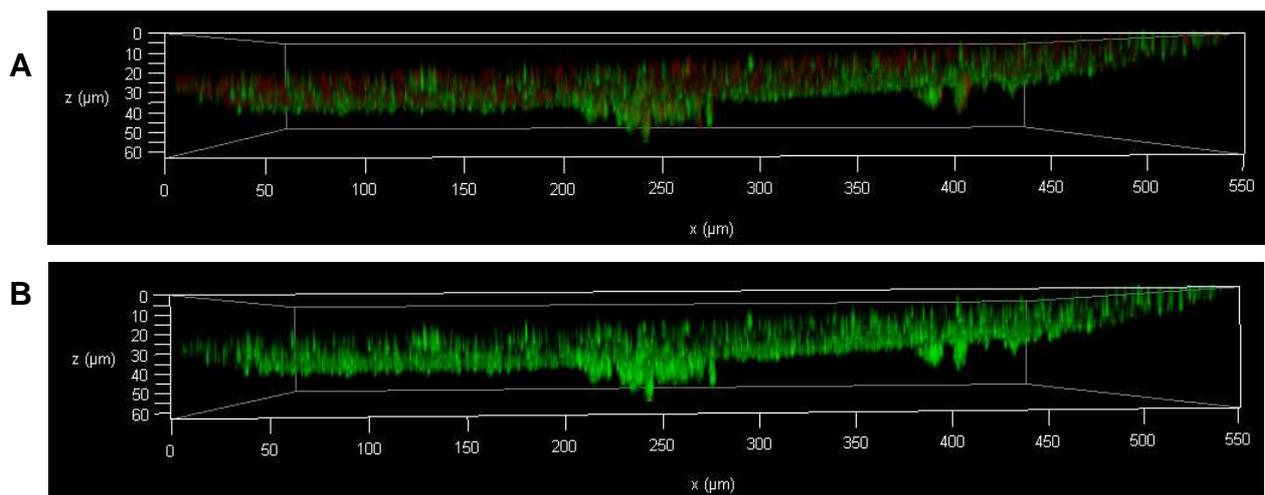


Figura 17. Análise estrutural do biofilme em 2D de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 (1,5% de glutaraldeído - 7 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit *Live/dead BacLight*. O reagente SYTO 9 permitiu a visualização de fluorescência verde para as formas bacterianas sésseis viáveis e o iodeto de propídio fluorescência vermelha para as não viáveis distribuídas nos biofilmes. Aumento de 20x.

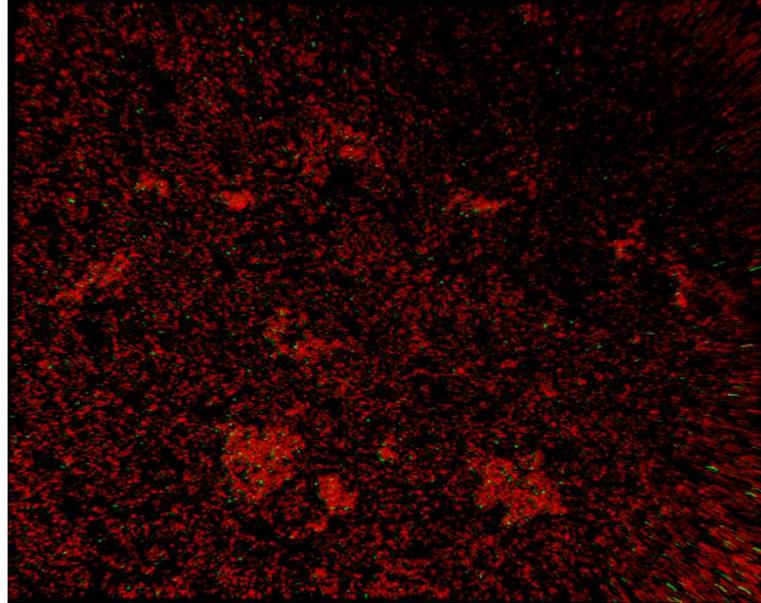
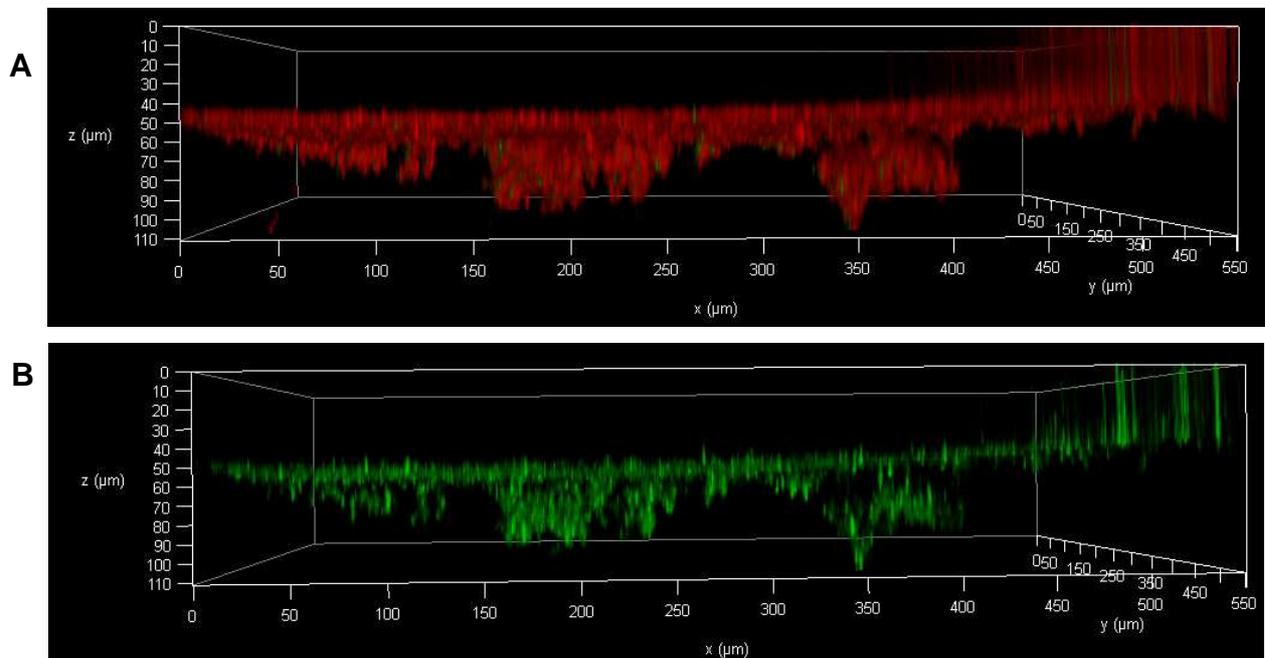


Figura 18. Análise estrutural do biofilme em 3D de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 (1,5% de glutaraldeído - 7 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit *Live/Dead BacLight*. Aumento de 20x. A - células viáveis e não viáveis; B - células viáveis.



Todas as micrografias de ensaios de MVCL ilustrando a formação de biofilme na superfície hidrofílica de vidro em 14 dias de incubação de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 na presença e ausência de glutaraldeído demonstraram uma considerável diminuição da quantidade de células viáveis.

A formação de biofilme pela cepa de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 na ausência de glutaraldeído está apresentada nas **Figuras 19 e 20 (A e B)**, onde podemos observar a presença de aglomerados bacterianos. Nas **Figuras 21 e 22 (A e B)** estão representadas as micrografias de ensaios de MVCL com *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594 na presença de glutaraldeído a 0,5% demonstrando a formação de biofilme na superfície de vidro. Neste biofilme, além da presença de células isoladas dispersas não viáveis, observamos a formação de células viáveis agregadas.

As micrografias de ensaios de MVCL demonstrando a formação de biofilme na superfície hidrofílica do vidro por *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 na presença de glutaraldeído a 1,0%, estão apresentadas nas **Figuras 23 e 24 (A e B)**, onde podemos observar a presença de um número significativo de células mortas, e também de células viáveis aglomeradas. Nas **figuras 25 e 26 (A e B)** estão representadas as micrografias de ensaios de MVCL com *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 na presença de glutaraldeído a 1,5% demonstrando a formação de biofilme na superfície de vidro. Neste biofilme, além da presença de células isoladas dispersas não viáveis, foram observadas também células agregadas e células viáveis, demonstrando a persistência desta micobactéria mesmo em altas concentrações de glutaraldeído após 14 dias de incubação.

Figura 19. Análise estrutural do biofilme em 2D de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 (sem glutaraldeído - 14 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit *Live/Dead BacLight*. O reagente SYTO 9 permitiu a visualização de fluorescência verde para as formas bacterianas sésseis viáveis e o iodeto de propídio fluorescência vermelha para as não viáveis distribuídas nos biofilmes. Aumento de 20x.

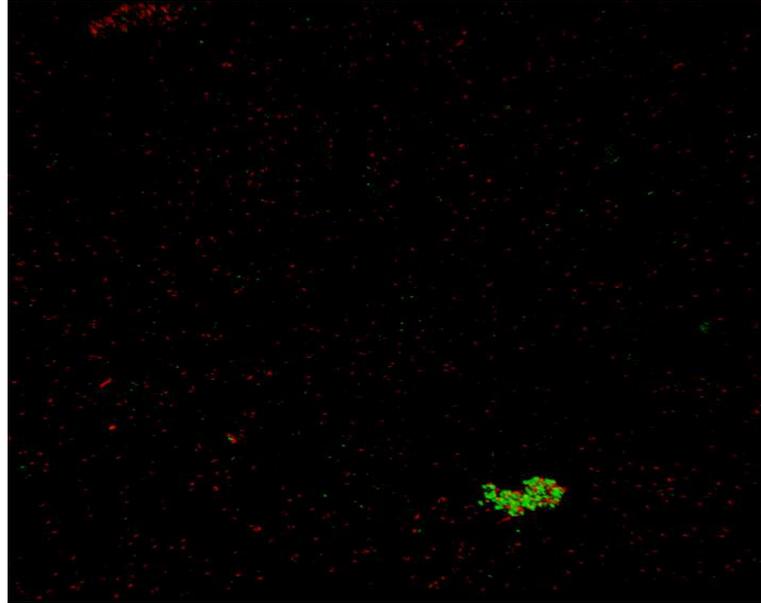


Figura 20. Análise estrutural do biofilme em 3D de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 (sem glutaraldeído - 14 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit *Live/Dead BacLight*. Aumento de 20x. A - células viáveis e não viáveis; B - células viáveis.

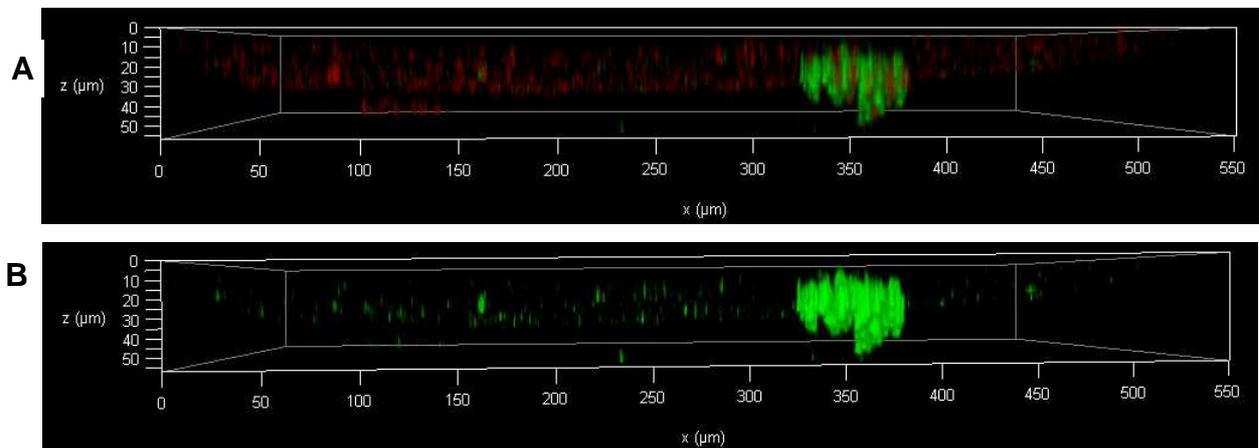


Figura 21. Análise estrutural do biofilme em 2D de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 (0,5% de glutaraldeído - 14 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit *Live/Dead BacLight*. O reagente SYTO 9 permitiu a visualização de fluorescência verde para as formas bacterianas sésseis viáveis e o iodeto de propídio fluorescência vermelha para as não viáveis distribuídas nos biofilmes. Aumento de 20x.

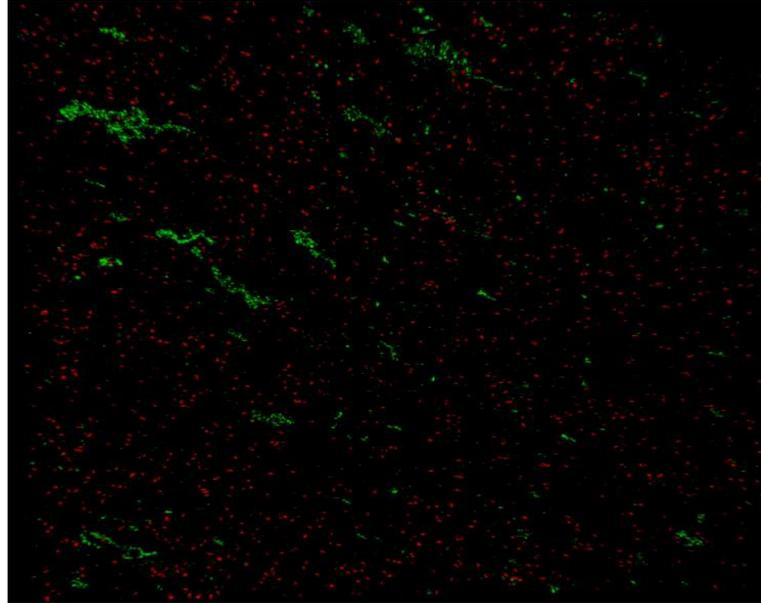


Figura 22. Análise estrutural do biofilme em 3D de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 (0,5% de glutaraldeído - 14 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit *Live/Dead BacLight*. Aumento de 20x. A - células viáveis e não viáveis; B - células viáveis.

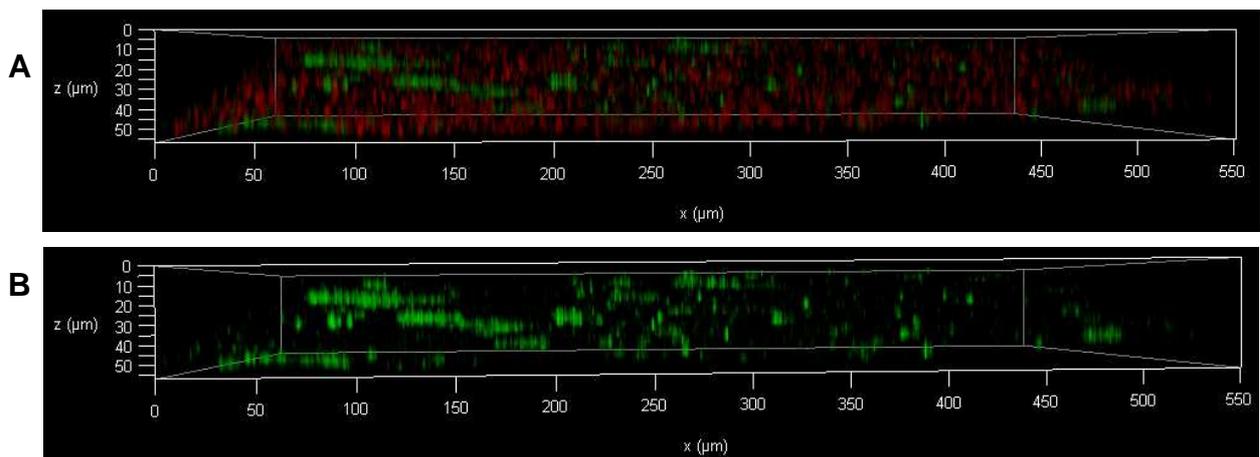


Figura 23. Análise estrutural do biofilme em 2D de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 (1,0% de glutaraldeído - 14 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit *Live/Dead BacLight*. O reagente SYTO 9 permitiu a visualização de fluorescência verde para as formas bacterianas sésseis viáveis e o iodeto de propídio fluorescência vermelha para as não viáveis distribuídas nos biofilmes. Aumento de 20x.

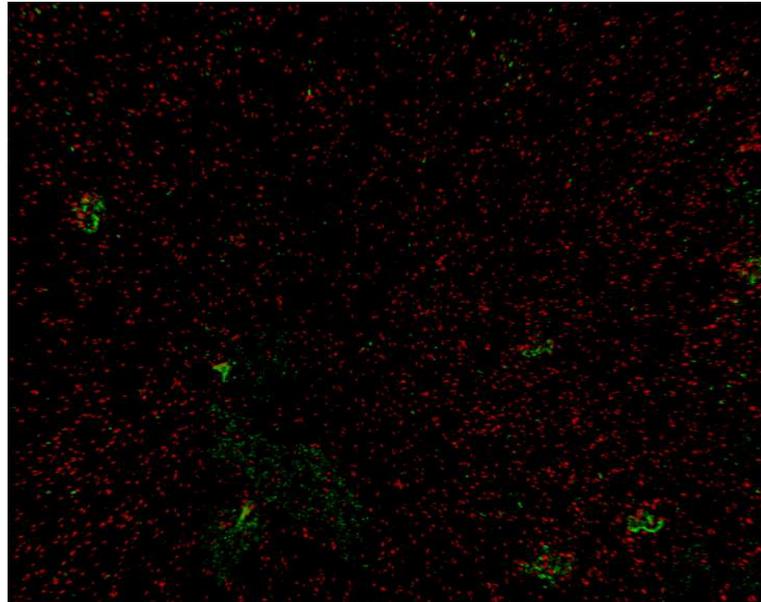


Figura 24. Análise estrutural do biofilme em 3D de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 (1,0% de glutaraldeído - 14 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit *Live/Dead BacLight*. Aumento de 20x. A - células viáveis e não viáveis; B - células viáveis.

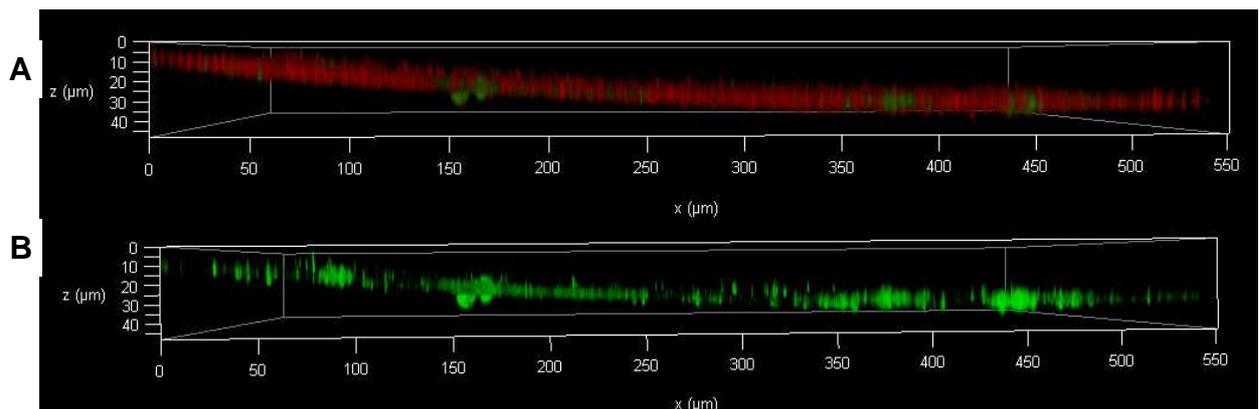


Figura 25. Análise estrutural do biofilme em 2D de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 (1,5% de glutaraldeído - 14 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit *Live/Dead BacLight*. O reagente SYTO 9 permitiu a visualização de fluorescência verde para as formas bacterianas sésseis viáveis e o iodeto de propídio fluorescência vermelha para as não viáveis distribuídas nos biofilmes. Aumento de 20x.

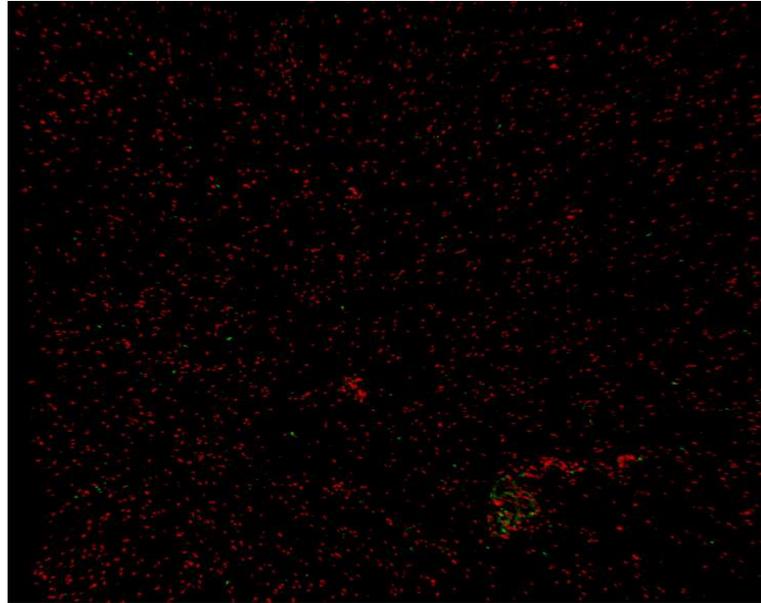
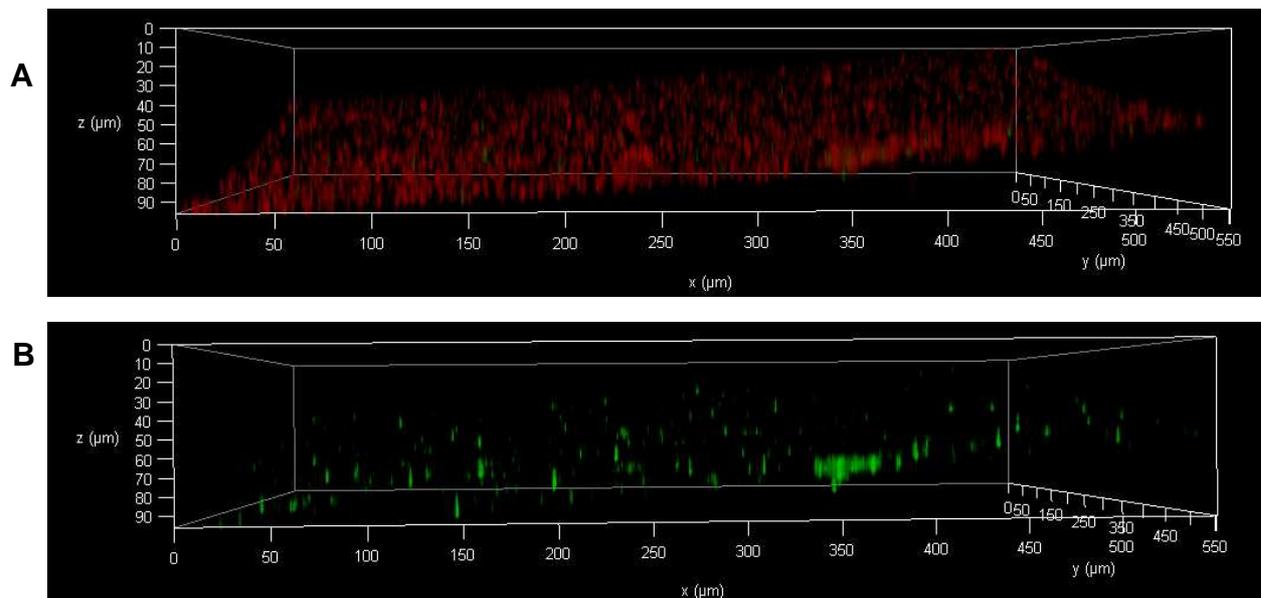


Figura 26. Análise estrutural do biofilme em 3D de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 (1,5% de glutaraldeído - 14 dias de incubação) por Microscopia de Varredura Confocal a Laser empregando o kit *Live/Dead BacLight*. Aumento de 20x. A - células viáveis e não viáveis; B - células viáveis.



Em nosso estudo, observamos a presença de células viáveis no biofilme de *M. abscessus* subsp. *bolletii* mesmo após 14 dias na presença de glutaraldeído. Muñoz-Egea et al (2015) também observaram a presença de células viáveis em biofilmes quando avaliaram o comportamento de *M. chelonae* e *M. smegmatis* na presença do antimicrobiano ciprofloxacina. Nesse estudo foi observada uma redução significativa da viabilidade das micobactérias, quando comparado aos controles, após 72 h de exposição ao antimicrobiano. Com 24 h de incubação, foi observada uma porcentagem média de bactérias mortas um pouco menor que os controles. Neste caso, a diferenciação de células bacterianas, que podem levar à resistência, pode ter acontecido nos primeiros estágios do desenvolvimento do biofilme. No entanto, foram encontradas bactérias vivas mesmo em um biofilme de 24 horas, exposto ao antibiótico por 72 h (MUÑOZ-EGEA et al, 2015).

Aung et al (2016) investigaram a resistência dos biofilmes de *M. chelonae* e *M. fortuitum* a compostos antimicrobianos e, verificaram que os biofilmes micobacterianos eram resistentes à gatifloxacina. *M. chelonae* e *M. fortuitum* formaram biofilmes espessos com formas irregulares que foram relativamente resistentes aos antibióticos convencionais mesmo em CIM altas (AUNG et al, 2016).

A presença de células viáveis no biofilme de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 em altas concentrações de glutaraldeído após 14 dias de incubação, nos leva a supor que possa existir uma possível tolerância desta cepa a este desinfetante. Esses resultados são muito importantes, pois os ensaios demonstraram e mimetizaram o que ocorre na prática hospitalar, confirmando o que foi descrito por vários autores de que surtos de infecções por *M. abscessus* subsp. *bolletii* foram associados ao desenvolvimento de resistência ao glutaraldeído (DUARTE et al, 2009, LORENA et al, 2010, SOUTO, 2011).

Muitas doenças humanas são causadas ou exacerbadas por biofilmes, e é esperado que, como em outras doenças infecciosas, os biofilmes forneçam um reservatório importante para as células que podem repovoar os locais colonizados após a remoção do tratamento medicamentoso. No entanto, o mecanismo envolvido na montagem e persistência do biofilme está longe de ser totalmente elucidado (SOUSA et al, 2015).

Ao mesmo tempo, a persistência destas células em altas concentrações de glutaraldeído, como já relatado anteriormente, reforça a possibilidade da presença de *persisters*. Após 14 dias de incubação, a disponibilidade de nutrientes diminui e

ao mesmo tempo ocorre um estresse bacteriano devido à presença do glutaraldeído, levando a uma provável geração dessas células.

Biofilmes podem ser muito resistentes a altas concentrações de antimicrobianos e são capazes de modular o sistema imune do hospedeiro. Esta alta resistência deve-se principalmente ao aumento da virulência causada pelos biofilmes. As bactérias no biofilme são mais propensas a trocar genes horizontalmente devido à proximidade máxima entre elas. Esta transmissão de genes é uma das principais causas de sobrevivência de bactérias e pode representar uma alta frequência de mutações responsáveis pela resistência antimicrobiana. As bactérias também podem alternar seus estágios fenotípicos causando uma taxa de crescimento mais lenta. Esta estratégia irá diminuir, ou mesmo inibir, a eficiência antimicrobiana de agentes ativos em microrganismos replicantes. O esgotamento de nutrientes e respostas ao estresse gerado no biofilme também pode afetar o crescimento de bactérias, gerando *persisters* (KEREN et al, 2011, SOUSA et al, 2015)

Logo, um gatilho importante para a mudança para um estado persistente parece ser a disponibilidade de nutrientes e potencial de atividade metabólica. Em primeiro lugar, em condições laboratoriais, a geração de persistentes ocorre frequentemente em estágios de crescimento específicos que se correlacionam com a limitação de nutrientes. Em segundo lugar, os estudos transcriptômicos de populações bacterianas enriquecidas com *persisters* revelaram que as alterações de expressão associadas à fisiologia persistente mostraram semelhanças com as induzidas em resposta à estase e à fome. Em terceiro lugar, a diminuição global da atividade metabólica através da falta de nutrientes, bem como a inibição da respiração, demonstrou aumentar a tolerância bacteriana das defesas imunes e a tratamentos com antibióticos. Além da disponibilidade de nutrientes, a formação de *persisters* também foi associada ao envelhecimento bacteriano e à senescência. A tolerância ao antibiótico em células dormentes e persistentes parece ser mediada por mecanismos passivos associados à atividade metabólica reduzida, como a ausência de antibióticos alvos ligados ao DNA, síntese de proteína ou parede celular, ou redução da absorção molecular por meio de transportadores, bem como mecanismos ativos, incluindo a produção de defesas ao estresse oxidativo (BARRAUD et al, 2013).

Apesar de mais de 70 anos após o primeiro relato de *persisters*, os mecanismos moleculares subjacentes à persistência bacteriana permanecem em grande parte evasivos (BIGGER, 1944). As células persistentes bacterianas desempenham um papel crucial, contribuindo para a recalcitrância de infecções crônicas e falhas no tratamento. Entender o mecanismo molecular da formação e manutenção de células persistentes, obviamente, inspirará a descoberta de novos antimicrobianos (DUAN et al, 2016). Alguns autores relataram a presença de células *persisters* em *M. tuberculosis*, como Duan et al (2016), que demonstraram que o gene *lat MSMEG_1764*, o homólogo de *M. tuberculosis lat Rv3290c* está envolvido na formação de *persisters* (especificamente tolerância à norfloxacin) através da mediação do conteúdo de aminoácidos intracelulares e alterando a expressão de ppGpp sintase em *M. smegmatis*. Eles concluíram que a LAT está envolvida na formação de *persisters* em micobactérias. Sob a falta de nutrientes, (p)ppGpp é produzido pela Rel_{Msm} e se acumula dentro de bactérias, então aumenta a transcrição do gene *LrpA*, que por sua vez aumenta o nível de proteína LAT em resposta para o metabolismo de aminoácidos. O nível de aminoácidos intracelular regula o acúmulo de (p)ppGpp e, (p)ppGpp controla a formação de *persisters* dormente. Já Keren et al (2011) identificaram 15 genes especificamente induzidos em *persisters*. Alguns desses genes demonstraram desempenhar um papel na infecção persistente em camundongos (KEREN et al, 2011).

4.4 ANÁLISE PROTEÔMICA

O primeiro desenho experimental baseava-se em analisar, por técnicas proteômicas, a cepa CBRVS 00594 do *M. abscessus* subsp. *bolletii* em presença ou ausência de várias concentrações de glutaraldeído (0,5%, 1,0% e 1,5%). A partir disso, foram realizados ensaios de curva de crescimento, extração de proteínas, SDS-PAGE e a análise por MS. Contudo, o glutaraldeído é um dialdeído saturado (C₅H₈O₂), usado como reativo para aminas homobifuncional reticulador, ou seja, ele promove reações de *cross-link* entre as proteínas, interferindo com as análises proteômicas. Portanto, com o intuito de ainda usar as técnicas proteômicas e tentar inferir sobre que proteínas estariam envolvidas com a tolerância de *M. abscessus*

subsp. *bolletii* ao glutaraldeído, decidimos comparar a cepa CBRVS 00594, AT ao glutaraldeído, com a cepa MT CRM 270.

4.4.1 Preparo das amostras

Ambas as cepas (CBRVS 00594 e CRM 270) foram submetidas a crescimento celular sob as mesmas condições durante sete dias, em quintuplicatas biológicas. Após a contagem das células, lise e extração das proteínas totais, realizamos dosagens de proteínas totais por BCA. Os resultados estão expressos na **Tabela 4**. Visando observar o perfil eletroforético dessas amostras, 5 µg de proteínas de cada replicata biológica foram submetidas a SDS-PAGE 12% (**Figura 27**).

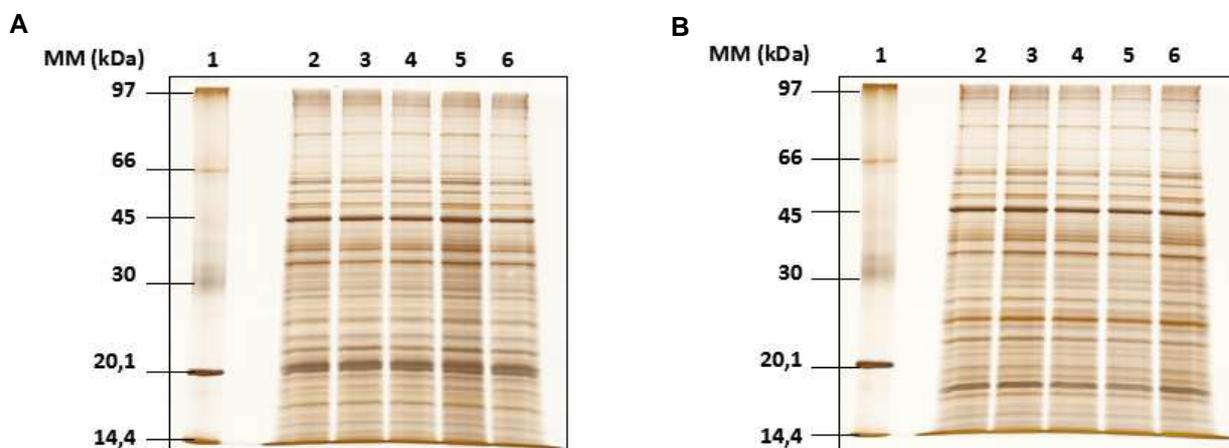
Tabela 5. Dosagens de proteínas totais das amostras de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 e CRM 270.

	Abs (7º dia)	CBRVS 00594 (AT) µg/µL	Abs (7º dia)	CRM 270 (MT) µg/µL
Replicata 1	2,260	2,474	2,107	2,684
Replicata 2	2,251	3,160	2,181	2,099
Replicata 3	2,290	2,520	2,241	2,540
Replicata 4	2,300	2,645	2,301	1,923
Replicata 5	2,157	2,478	2,142	2,518

Abs – absorvância a 620 nm; AT – altamente tolerante; MT – médio tolerante.

Figura 27. Perfil de proteínas totais das amostras em SDS-PAGE a 12%. Foram aplicadas 5 µg de proteínas de cada amostra e os géis foram revelados por AgNO₃. (A) *M. abscessus* subsp. *bolletii*

CRM 270 - MT; e (B) CBRVS 00594 - AT. 1 = Padrão de Massa Molecular; 2 a 6 = replicatas biológicas das amostras.



Observou-se que as etapas de lise celular e extração proteica foram eficientes e reproduzíveis entre as quintuplicatas nas duas cepas. Além disso, são visíveis diferenças no perfil das bandas de mais baixa massa molecular, indicando assim, diferenças na expressão das proteínas.

Seguindo-se estes resultados, aproximadamente 100 μ g de proteínas foram submetidas à digestão com tripsina em protocolo auxiliado por FASP. Após a digestão, as amostras foram dessalinizadas em micro-colunas C18 preparadas no laboratório e ressuspensas em 40 μ L FA 1%. A concentração dos peptídeos foi estimada por leitura da absorvância a 280 nm e está representada na **Tabela 5** (1^o leitura na A280).

4.4.2 Análises por espectrometria de massas e quantificação diferencial

Neste trabalho, empregamos uma abordagem proteômica *shotgun*, livre de marcação isotópica (*label-free*), utilizando uma plataforma composta por nanocromatografia líquida de fase reversa acoplada diretamente ao espectrômetro de massas, seguida de ionização por *eletrospray* e análise em um *orbitrap*. Antes das análises por MS, cada amostra foi diluída 5x, suas concentrações normalizadas com FA 1% e novamente estimadas as leituras a 280 nm (2^o leitura na A280 na

Tabela 5). Foram, então, aplicados 2 µL de cada amostra (aproximadamente 0,5 µg) e analisados em triplicatas técnicas. Os valores de corrente iônica total (TIC) dos íons mais intensos estão também representados na **Tabela 5**.

Tabela 6. Concentração dos peptídeos e a corrente iônica total das amostras de *M. abscessus* subsp. *bolletii* AT e MT.

	CBRVS 00594 (AT)			CRM 270 (MT)		
	1ª A280	2ª A280	TIC	1ª A280	2ª A280	TIC
Replicata 1	0,994	0,194	0,989x10 ¹⁰	1,215	0,229	1,180x10 ¹⁰
			0,965x10 ¹⁰			0,985x10 ¹⁰
			0,965x10 ¹⁰			1,080x10 ¹⁰
Replicata 2	1,156	0,223	0,972x10 ¹⁰	1,294	0,250	0,987x10 ¹⁰
			0,984x10 ¹⁰			1,230x10 ¹⁰
			0,957x10 ¹⁰			0,914x10 ¹⁰
Replicata 3	0,996	0,192	0,969x10 ¹⁰	1,404	0,259	0,942x10 ¹⁰
			1,100x10 ¹⁰			0,844x10 ¹⁰
			0,895x10 ¹⁰			1,050x10 ¹⁰
Replicata 4	1,223	0,249	1,010x10 ¹⁰	1,281	0,222	0,925x10 ¹⁰
			0,944x10 ¹⁰			0,852x10 ¹⁰
			0,894x10 ¹⁰			1,060x10 ¹⁰
Replicata 5	1,067	0,236	0,996x10 ¹⁰	1,014	0,185	0,955x10 ¹⁰
			0,952x10 ¹⁰			0,890x10 ¹⁰
			1,030x10 ¹⁰			1,190x10 ¹⁰

AT – altamente tolerante; MT – médio tolerante; A280 - Absorvância a 280 nm; TIC - Corrente total iônica.

Através dessas abordagens e após análises computacionais, conseguimos identificar com alto grau de confiança (FDR<1%), um total de 40.238 e 39.261 peptídeos nas cepas AT e MT, respectivamente. Assumindo-se o princípio da máxima parcimônia, inferimos 4.126 e 4.041 proteínas nestas mesmas amostras (**Tabela 6**). O diagrama de Venn (**Figura 28**) representa todas as proteínas inferidas nas duas cepas (CBRVS 00594 e CRM 270), considerando-se somente aquelas identificadas em pelo menos 2 replicatas técnicas de cada replicata biológica. As diferentes condições biológicas apresentaram 3.971 proteínas em comum, sendo 189 e 185 proteínas identificadas somente em uma condição biológica, MT ou AT,

respectivamente. A descrição de todas as proteínas identificadas em cada condição biológica está no **Apêndice A**.

Tabela 7. Número absoluto dos peptídeos identificados e proteínas inferidas nos grupos biológicos.

	SEPro Fusion (FDR Combinado)	
	CBRVS 00594 (AT)	CRM 270 (MT)
<i>Peptide Spectrum Match</i> (PSM)	459.893 (0,06%)	461.918 (0,06%)
Número total de peptídeos	40.238 (0,12%)	39.261 (0,14%)
Número de peptídeos únicos	11.115	10.612
Número total de proteínas	7.426 (0,15%)	7.450 (0,19%)
Número de proteínas (máxima parcimônia)	4.126	4.041
Número de proteínas com pelo menos 1 peptídeo único (proteotípico)	3.503	3.350

Filtragem estatística e compilação pelo módulo *SEPro PatternLab for Proteomics*
AT – altamente tolerante; MT – médio tolerante.

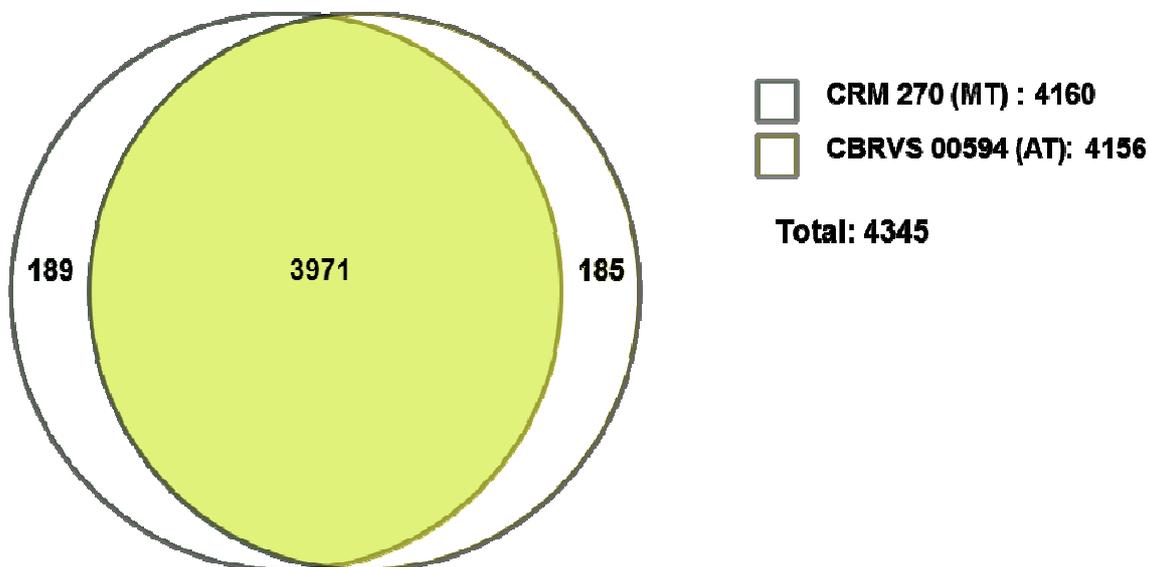
Aproximadamente 83% (6.182) e 82% (6.130) das proteínas foram inferidas com mais de 4 peptídeos identificados e, cerca de 47% (3.503) e 45% (3.350) das proteínas foram identificadas com pelo menos um peptídeo único ou proteotípico nas amostras de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 e CRM 270, AT e MT, respectivamente (**APÊNDICE A**).

Este é o primeiro trabalho de *M. abscessus* que utilizou uma abordagem proteômica capaz de identificar mais de 3.000 proteínas.

Apesar do número de genomas bacterianos descrito estar aumentando significativamente (CHOO et al, 2012, LEÃO et al, 2013, DAVIDSON et al, 2013, CAVERLY; SPILKER; LIPUMA, 2016), a capacidade de validar os produtos gênicos não aumenta na mesma proporção, deixando assim uma lacuna em termos de anotação do proteoma bacteriano. Portanto, os resultados gerados nesse trabalho

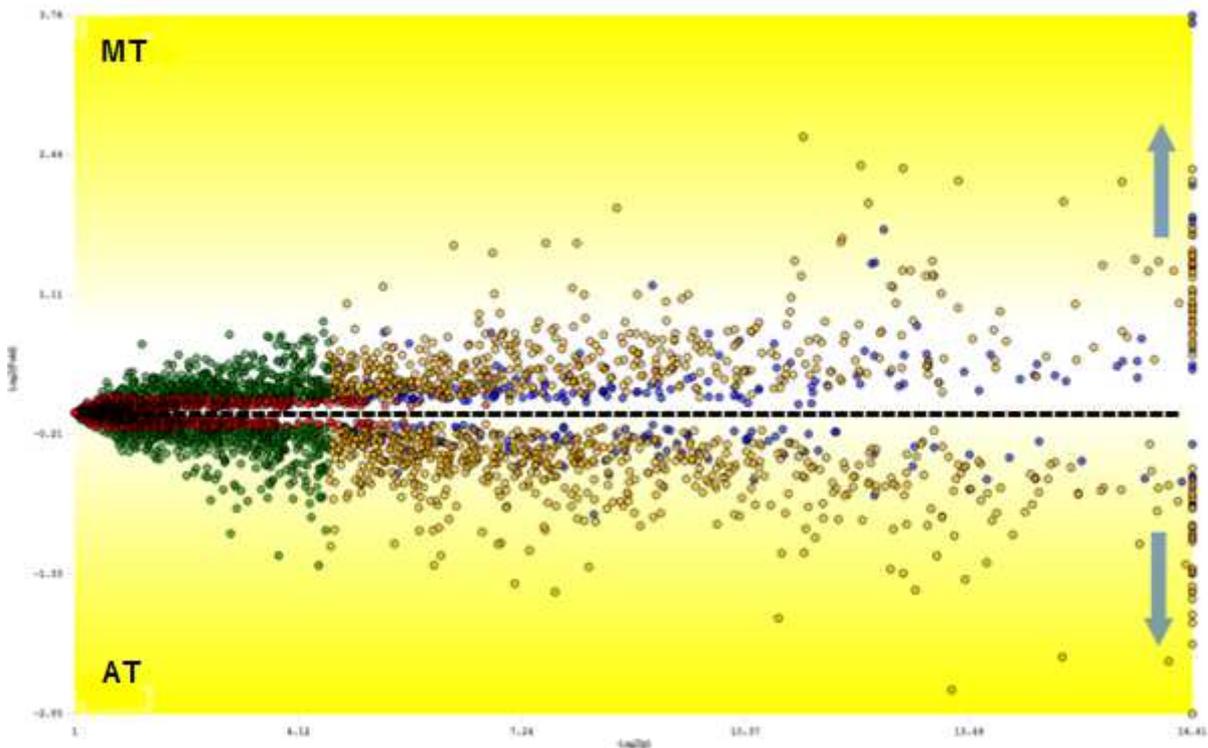
poderão contribuir para o melhoramento da anotação proteogenômica desta micobactéria, uma abordagem que une a análise proteômica com a anotação genômica (NESVIZHSKII, 2014).

Figura 28. Diagrama de Venn da área proporcional em elipses mostrando o número de proteínas identificadas nas cepas CRM 270 (MT) e CBRVS 00594 (AT). Este diagrama foi construído com os números equivalentes às proteínas mapeadas no programa PatternLab. Na amostra MT foram identificadas 4.160 proteínas (verde), das quais 189 foram identificadas somente nesta amostra. Na amostra AT foram identificadas 4.156 proteínas (amarelo), das quais 185 foram identificadas somente nesta amostra. Os números das sobreposições estão indicados na região central do diagrama. O número total de proteínas do conjunto das duas cepas está indicado no canto superior direito (4.345 proteínas).



A quantificação relativa das proteínas foi obtida utilizando-se metodologia baseada na contagem de espectros de MS2 (*Spectral Counting*). A análise estatística das diferenças entre os grupos biológicos (AT e MT) foi realizada pelo módulo *Tfold* do *PatternLab* e gerou um gráfico do tipo *Volcano plot* (**Figura 29**).

Figura 29. Volcano plot – Análise pareada das proteínas inferidas entre as cepas de *M. abscessus subsp. bolletii* CRM 270 (MT) e CBRVS 00594 (AT). Cada ponto representa uma proteína mapeada de acordo com seu p-valor do teste T no eixo x e a variação da abundância (fold change) no eixo y. Os pontos vermelhos indicam proteínas que não satisfazem os pontos de corte estabelecidos para a variação da abundância e o q-valor ou FDR (0,05). As proteínas assinaladas em verde satisfazem o ponto de corte da variação de abundância, mas não o do q-valor. As proteínas identificadas em vermelho satisfazem os pontos de corte variação e do q-valor, mas apresentam abundâncias baixas. Os pontos azuis representam as proteínas que satisfazem todos os critérios das filtrações estatísticas.



No gráfico é ilustrada a distribuição das proteínas entre as cepas MT e AT, na forma da diferença de abundância das proteínas em relação a significância estatística desta diferença (*fold change* no eixo y e *p-valor* no eixo x). Como descrito na metodologia, 304 proteínas diferencialmente abundantes foram estatisticamente validadas e estão representadas em azul no gráfico. Acima da linha pontilhada estão representadas em azul 167 proteínas que tiveram a abundância aumentada (*up*

regulated) na cepa MT em relação a cepa AT. De maneira complementar, abaixo da linha pontilhada estão representadas em azul 137 proteínas que tiveram abundância diminuída (*down regulated*) na cepa MT em relação a cepa AT.

Nossa análise de abundância diferencial considerou também as proteínas identificadas exclusivamente em uma condição biológica e que estão representadas no diagrama de Venn (**Figura 28** - 185 proteínas na condição AT ou 189 proteínas na condição MT). Neste caso, embora não haja p-valores atribuídos para estas proteínas, entendemos que a detecção das mesmas em apenas uma condição biológica reflete uma significativa diferença de abundância.

Assim sendo, essas proteínas foram somadas às proteínas diferencialmente abundantes com significância estatística (azuis do *Volcano plot*) para compor a listagem final de proteínas que usamos para as análises posteriores de classificação funcional (**APÊNDICE B**). Desta forma, geramos 2 listas:

- Proteínas com abundância aumentada na cepa MT: 167 (*up regulated* no *Volcano*) + 189 (identificadas somente na condição MT no diagrama de Venn) = 356;
- Proteínas com abundância aumentada na cepa AT: 137 (*up regulated* no *Volcano*) + 185 (identificadas somente na condição AT no diagrama de Venn) = 322.

4.4.3 Classificação funcional das proteínas

Inicialmente, foram realizadas as análises funcionais usando as ferramentas *Gene Ontology* (GO) e *String*. Entretanto, observamos que a minoria das proteínas identificadas no nosso estudo possui anotação ontológica ou de interações com outras proteínas atribuídas nestes bancos. Isso provavelmente se deve ao fato de que este microrganismo teve seu genoma sequenciado em poucas cepas (CHOO et al, 2012, LEÃO et al, 2013, DAVIDSON et al, 2013, CAVERLY; SPILKER; LIPUMA, 2016), e a anotação destas cepas ainda está na forma de um rascunho, onde a maioria das proteínas têm suas funções atribuídas por homologia, comparação de sequências ou hipoteticamente. Isto reflete a significativa falta de conhecimento sobre o microrganismo estudado.

Na tentativa de inferir as funções das proteínas diferencialmente abundantes selecionadas utilizamos a ferramenta ARGOT 2.5. Resumidamente, as proteínas

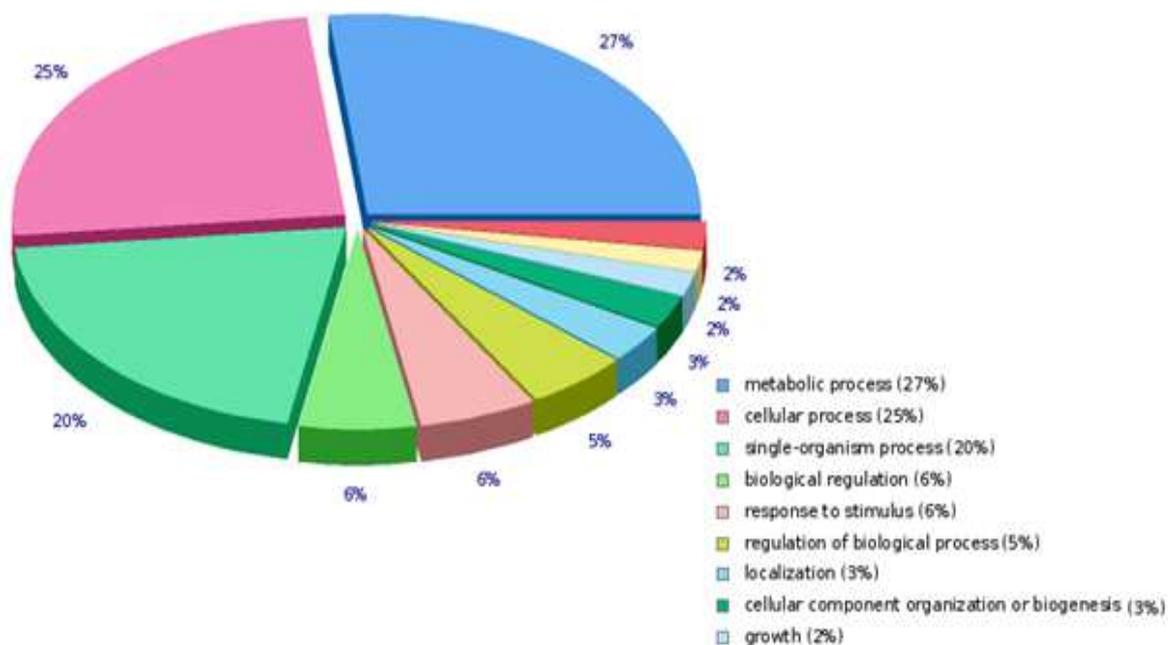
selecionadas foram comparadas par a par com as proteínas depositadas no banco de dados *SwissProt*, usando o programa *BLAST*, e também foram comparadas com as famílias de proteínas depositadas no banco de dados *Pfam*, com uso do programa *HMMER*. Os resultados obtidos nestas comparações foram então utilizados como entrada para o programa ARGOT 2.5. Com base: (i) no sistema de classificação proposto pelo consórcio Gene Ontology (GO), (ii) nas anotações de termos GO atribuídas às proteínas depositadas no *SwissProt*, (iii) no significado estatístico dos alinhamentos obtidos em ambas as comparações, respectivamente, e (iv) na similaridade semântica dos termos GO associados aos *hits* estatisticamente significativos, o programa ARGOT 2.5 realiza uma predição funcional das proteínas analisados. Dessa forma, as proteínas diferencialmente abundantes foram classificadas com base em um vocabulário controlado de ontologia gênica e de acordo com critérios de transferência funcional definidos pelo consórcio GO, distribuindo-se em três categorias fundamentais: função molecular, componente celular e processo biológico.

4.4.3.1. Classificação funcional das proteínas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 (AT)

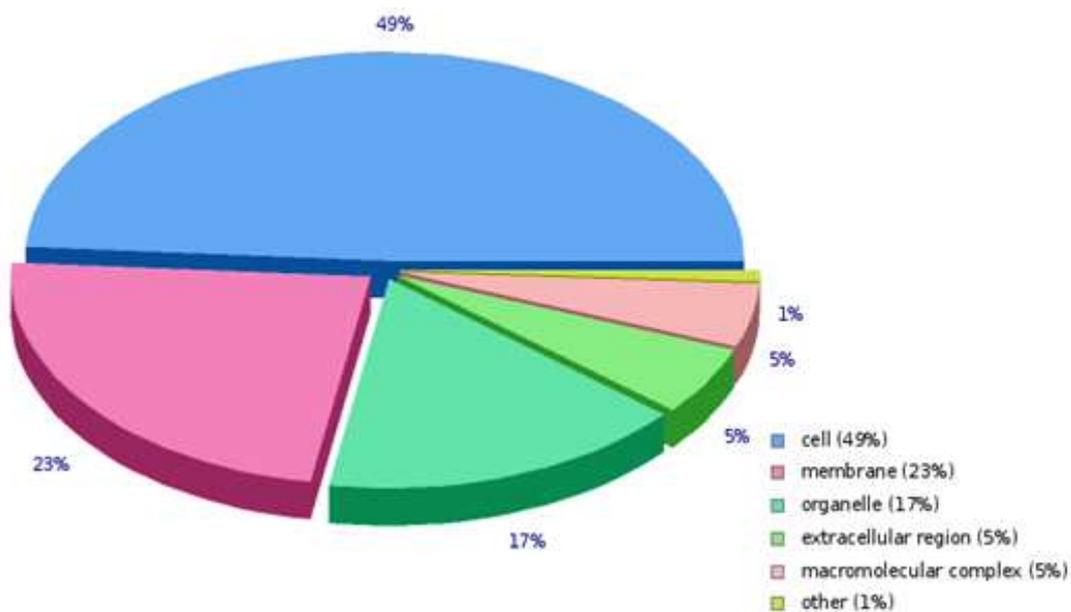
Como descrito, o Gene Ontology é subdividido em 3 classes: Processos Biológicos (PB), Funções moleculares (FM) e Componentes Celulares (CC). Das 322 proteínas selecionadas com abundância aumentada na cepa AT, conseguimos atribuir classificação ontológica a 321. Dessa maneira, quanto ao processo biológico, as proteínas mais abundantes foram aquelas envolvidas em processos metabólicos (27%), processos celulares (25%) e processos envolvendo um único organismo (20%), dentre outras (**Figura 30A**). Já as proteínas agrupadas como componentes celulares estão relacionadas, em grande parte, com a estrutura da célula (49%), da membrana (23%) e de organelas (17%), dentre outras (**Figura 30B**). A maioria das proteínas relacionadas a funções moleculares estão ligadas a atividade catalítica (52%), de ligação (39%) e atividade de transporte (3%), dentre outros (**Figura 30C**).

Figura 30. Classificação funcional das proteínas selecionadas da cepa *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 (AT) segundo o Gene Ontology. (A) Processo Biológico, (B) Componente Celular e (C) Função Molecular.

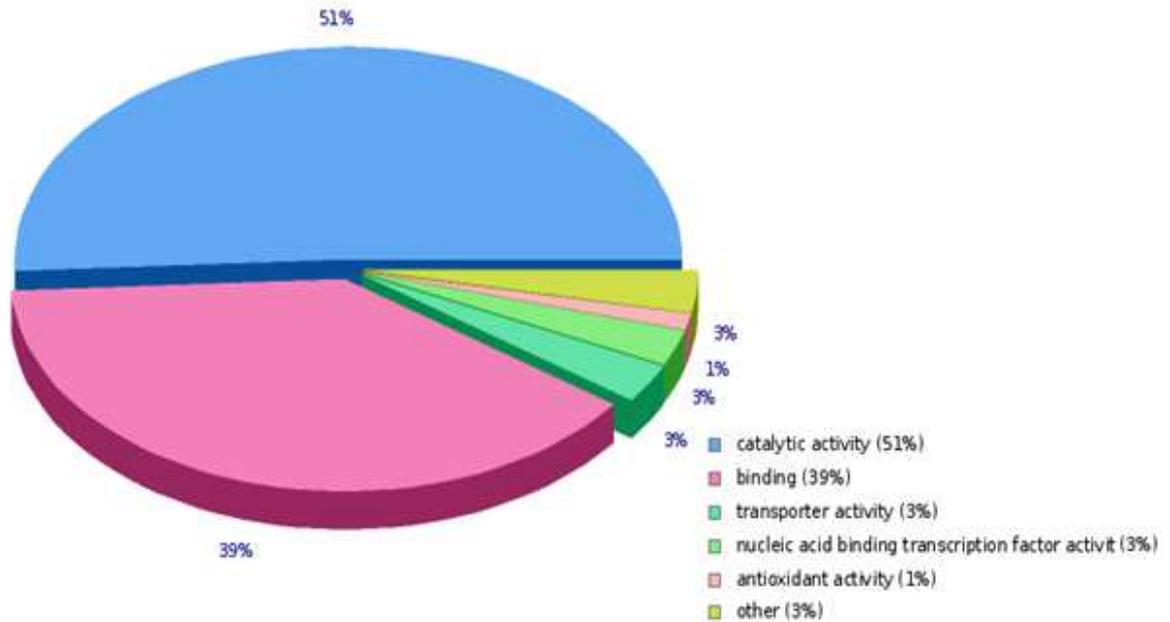
A



B



C

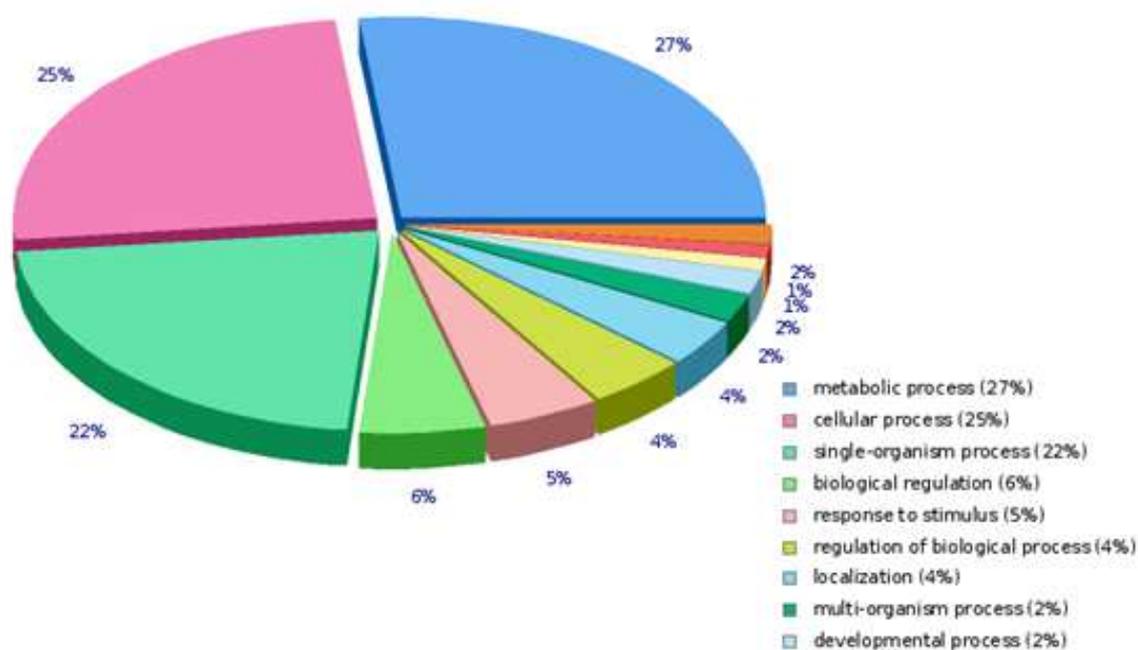


4.4.3.2. Classificação funcional das proteínas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CRM 270 (MT)

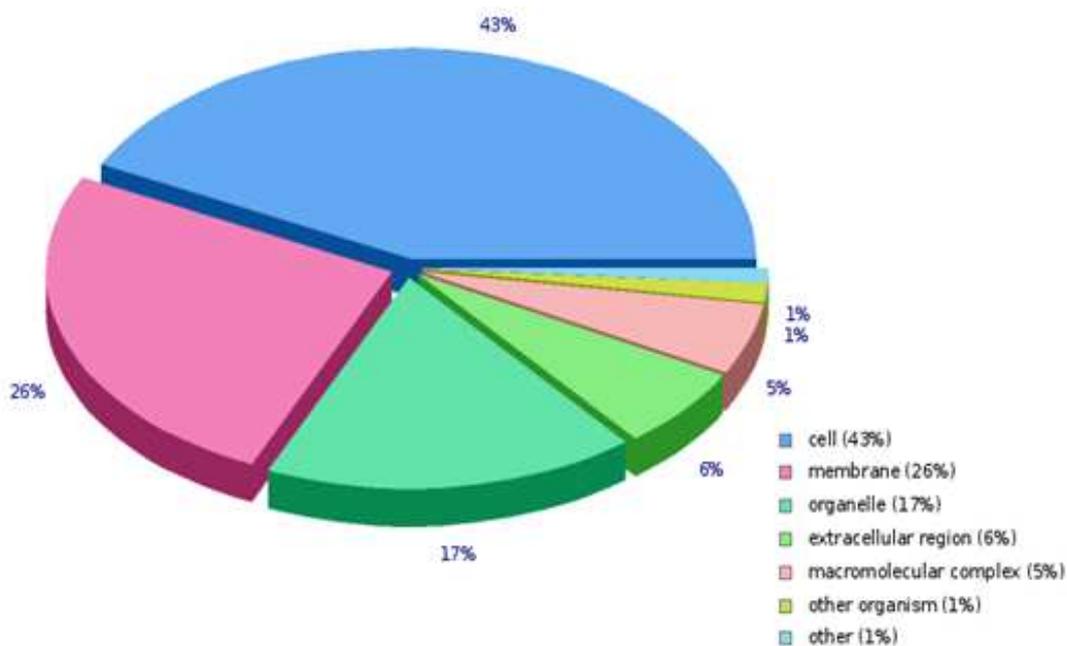
Das 356 proteínas selecionadas com abundância aumentada na cepa MT, conseguimos atribuir classificação ontológica a todas. Dessa maneira, quanto ao processo biológico, as proteínas mais abundantes foram aquelas envolvidas em processos metabólicos (27%), processos celulares (25%) e processos envolvendo um único organismo (20%), dentre outras (**Figura 31A**). Já as proteínas agrupadas como componentes celulares estão relacionadas, em grande parte, com a estrutura da célula (43%), da membrana (26%) e de organelas (17%), dentre outras (**Figura 31B**). Grande parte das proteínas relacionadas a funções moleculares estão ligadas a atividade catalítica (48%), de ligação (39%) e atividade de transporte (5%), dentre outros (**Figura 31C**).

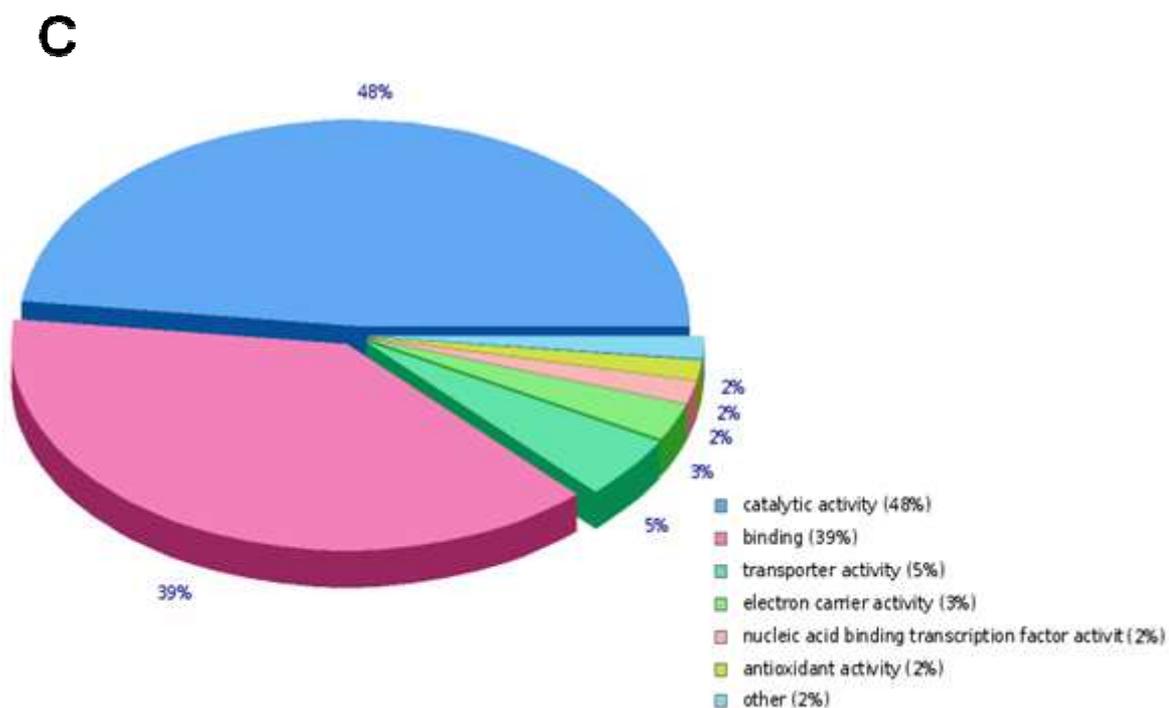
Figura 31. Classificação funcional das proteínas selecionadas da cepa *M. abscessus* subsp. *bolletii* CRM 270 (MT) segundo o Gene Ontology. (A) Processo Biológico, (B) Componente Celular e (C) Função Molecular.

A



B





Através da análise funcional das proteínas identificadas pelo sistema ARGOT 2.5, que inferiu as ontologias gênicas para cada uma delas nas cepas MT e AT, pudemos avaliar dentro de cada domínio as funções que representavam alguma importância significativa. Essa busca (análise de proteínas x funções) poderia ajudar a elucidar o comportamento AT de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 e o MT de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CRM 270. Em paralelo, foram observadas durante a análise funcional dessas proteínas, diferenças nas funções metabólicas e estruturais, que podem não ter relação com a característica de tolerância ao glutaraldeído, mas que são importantes de serem registradas neste trabalho.

Com isso, priorizando a pergunta central desse estudo, ou seja, quais proteínas poderiam estar envolvidas com a tolerância apresentada por *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594, foram escolhidas as funções dentro dos três domínios do GO, que pudessem ter relação com essa característica: ligação e atividade de transporte (Função Molecular) e membrana (Componente Celular). Todas as proteínas que foram identificadas dentro dessas funções, através de similaridade de sequência a um banco de dados, foram avaliadas para estimar a importância dentro deste estudo (**Tabela 7**).

Tabela 8. Resumo das 15 proteínas descritas neste trabalho.

Identificador	Descrição	Classe	Classificação ontológica
X8DD47	<i>Chaperone protein</i> CLpB	<i>Down regulated</i> AT	ligação
X8DPG7, X8DUH1, B1MBL0	<i>Fatty acid desaturase</i>	<i>Down regulated</i> AT	ligação e membrana
X8E3B2	<i>Desaturase desA1</i>	<i>Down regulated</i> AT	ligação
X8DU38	<i>Phosphatidylethanolamine-binding family protein</i>	<i>Down regulated</i> AT	ligação e membrana
X8E051, X8DVH1	<i>Lipoprotein 19 kDa</i>	<i>Down regulated</i> AT	ligação
X8DFF8		<i>Only</i> AT	
A0A0U1A7X6	<i>Regulator LuxR</i>	<i>Only</i> AT	ligação
X8DS72, B1MB57	<i>Protein translocase subunit SecA</i>	<i>Up regulated</i> AT	ligação e membrana
X8DEU4, X8DE78, X8DEK6	<i>Mce family protein</i>	<i>Only</i> AT	ligação, membrana e atividade de transporte
B1MMT3	<i>Macrolide-transport</i>	<i>Up regulated</i> AT	ligação e membrana
A0A0U1A2M2	<i>Aminoglycoside phosphotransferase</i>	<i>Only</i> AT	ligação
X8DIZ4	<i>ADP-ribosyltransferase</i>	<i>Only</i> MT	ligação, membrana e atividade de transporte
X8DIS9	<i>MMPL family protein</i>	<i>Only</i> MT	ligação e membrana
A0A0U1A6R1	<i>Fluoroquinolones export ATP-binding proteins</i>	<i>Only</i> MT	ligação, membrana e atividade de transporte
A0A0U1A2L6	<i>MspA protein</i>	<i>Only</i> AT	membrana e atividade de transporte
X8DTF1, X8DMQ8	<i>MspA family protein</i>	<i>Only</i> MT	membrana e atividade de transporte

Down / up regulated - abundância diminuída/aumentada; *only* - presente apenas nesta condição biológica; AT – altamente tolerante; MT – médio tolerante.

4.4.4 Descrição de proteínas com classificação funcional diversa

Chaperone protein ClpB (ligação)

As *chaperone protein* CLpB (X8DD47) são pequenas proteínas de choque térmico (sHsps) que podem prevenir eficientemente a agregação de proteínas desenoveladas *in vitro*. Contudo, como esta atividade *in vitro* se traduz em função *in vivo* é pouco compreendida (MOGK et al, 2003).

ClpB são chaperonas moleculares dependentes de adenosina trifosfato (ATP), que pertencem à família Hsp100 de ATPases associadas a diversas atividades celulares (AAA +). ClpB tem a notável capacidade de resgatar proteínas de um

estado agregado, mediando assim a desagregação de proteínas danificadas pelo estresse. A recuperação total de proteínas ativas requer a assistência do sistema chaperona DnaK/Hsp70, pois ele previne a agregação de proteínas termolábeis e suporta seu reenvio para o estado nativo. A AAA + chaperona ClpB permite que o sistema DnaK desagregue eficientemente agregados maiores de proteínas dobradas (LEE et al, 2003, MOGK et al, 2003).

A desagregação de agregados de alto peso molecular por ClpB cria agregados menores e de tamanho médio que poderiam expor superfícies hidrofóbicas, que são reconhecidas, por sua vez, pelo sistema chaperona DnaK. É concebível, no entanto, que ClpB também possa auxiliar na ressolubilização desses agregados de tamanho médio, talvez através de um mecanismo de "captura e liberação" ou de translocação, de forma semelhante à mostrada para outras proteínas Hsp100. Embora a geometria e a extensão da ressolubilização permaneçam obscuras, é concebível que o sistema chaperona DnaK possa se ligar aos polipeptídeos imediatamente após a liberação do ClpB, estabilizando assim os intermediários dobráveis e prevenindo a reagregação (LEE et al, 2003).

Como essa chaperona tem a função de mediar a desagregação de proteínas danificadas pelo estresse e no presente trabalho encontra-se *down regulated* na condição biológica AT, não foi verificada nenhuma associação no contexto estudado com a função biológica desta proteína.

Desaturase desA1(binding) e fatty acid desaturases (ligação e membrana)

Fatty acid desaturase (X8DPG7, X8DUH1, B1MBL0) são enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos insaturados, os ácidos micólicos, que por sua vez, são componentes de membranas biológicas, que mantêm a viscosidade da bicamada lipídica, permitindo a mobilidade de certas proteínas (GARBA et al, 2016). Nas micobactérias há uma grande quantidade de ácidos graxos insaturados na parede celular, sugerindo que a fluidez da membrana, proporcionada por esses ácidos graxos, poderia possivelmente contribuir para menor tolerância da cepa de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CRM 270 (MT) e a cepa CBRVS 00594 (AT), já que poderia facilitar a passagem de antimicrobianos através da membrana.

Desaturase *desA1* (X8E3B2) é uma das três *desaturases* anotadas (DesA1-3) no genoma de *M. tuberculosis*, que desempenha papel na biossíntese de ácidos micólicos. Os ácidos micólicos conferem propriedades únicas às micobactérias, como a baixa permeabilidade da parede celular, o aumento das taxas de sobrevivência no hospedeiro e a resistência a antibióticos comumente usados. A inibição de vários passos na biossíntese de ácido micólico por drogas antituberculose como o etambutol, isoniazida e etionamida provou ser uma estratégia útil no tratamento da tuberculose. Como resultado, uma compreensão detalhada da biossíntese de ácido micólico foi um grande objetivo de pesquisa na última década. A caracterização de enzimas chave envolvidas na biossíntese de ácido micólico não só poderia permitir compreender seu papel na fisiologia das micobactérias, mas também levar à identificação de novos alvos de antimicrobianos (YERUVA et al, 2016).

A dessaturação é um passo essencial na biossíntese de ácidos micólicos estruturais e quimicamente diversos. As *desaturases* catalisam a oxidação de ácidos graxos alquil-saturados para produzir ácidos graxos alquil-insaturados introduzindo duas ligações duplas *cis* na extremidade proximal ou distal. Este processo facilita a introdução de vários grupos funcionais na cadeia mero (repetição de pequenas unidades) de ácidos α -micólico para formar diversos ácidos micólicos (YERUVA et al, 2016).

Um estudo realizado por Singh et al (2016) mostrou que o gene *MSMEG5773* (*desA1*), homólogo de *M. tuberculosis desA1*, é essencial para o crescimento de *M. smegmatis*. A depleção de *desA1* em um mutante de *M. smegmatis* levou à redução da biossíntese de ácido micólico e à perda de viabilidade celular e, resultou em fenótipos distintos.

Como a proteína *desaturase desA1* está presente tanto na cepa MT quanto na cepa AT, com maior abundância na cepa MT e, encontram-se *down regulated* na condição biológica AT, não é possível inferir uma condição biológica dessa proteína que interfira na viabilidade celular da cepa de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CRM 270 (MT) no presente estudo.

Phosphatidylethanolamine-binding family protein (ligação e membrana)

Phosphatidylethanolamine-binding family protein (X8DU38), ou família de proteínas de ligação à fosfatidiletanolamina (PEBP), são proteínas altamente conservadas em toda a natureza e relativamente pequenas, normalmente compreendem cerca de 200 aminoácidos. Elas adotam uma dobra globular, que pode se ligar a uma variedade de compostos fosfatos, incluindo fosforiletanolamina, fosfato e fosfotirosina (EULENBURG et al, 2013).

O primeiro PEBP descrito foi uma proteína citosólica de 23 kDa que foi isolada a partir de material cerebral bovino. Subsequentemente, foi mostrado que essa proteína se ligava a fosfatidiletanolamina (PE), um importante componente lipídico polar em muitas membranas celulares (EULENBURG et al, 2013).

Várias proteínas foram isoladas e atribuídas à "família PEBP" com base na homologia de sequência. Estas incluem outros homólogos de mamíferos e homólogos de mosca, fermento, um parasita da malária, entre outros. Como os homólogos PEBP são encontrados em uma variedade tão diversa de espécies, isso implica que a proteína pode estar desempenhando um papel biológico essencial. Nas células de mamíferos, para a PEBP foi sugerido desempenhar um papel na organização dos domínios das membranas ou na biogênese da membrana. O PEBP tem sido implicado neste papel com base na sua afinidade por fosfolípidos (especificamente fosfatidiletanolamina) e seu alto nível de expressão em células em rápido crescimento, como testículos e oligodendrócitos cerebrais. Embora esta possa ser uma função da proteína, o isolamento de PEBP de outras espécies sugere funções alternativas (BANFIELD et al, 1998).

Apesar da presença generalizada e a caracterização de PEBP em diferentes espécies, a função dessas proteínas ainda precisa ser caracterizada. Não está claro se elas têm a mesma função geral em todas as espécies, ou se desempenham uma variedade de papéis. A capacidade da proteína em interagir com a maquinaria de sinalização celular (proteínas de ligação a guanosina trifosfato - GTP), a sua localização aparente em regiões de crescimento celular (testículos, cérebro em desenvolvimento) e capacidade de unir membranas biológicas, implica que estas proteínas podem estar envolvidas na modificação das estruturas da membrana

durante o crescimento celular ou podem atuar como mensageiros entre a membrana celular e o citosol (BANFIELD et al, 1998).

Rv2140c é uma das muitas proteínas conservadas de *M. tuberculosis* para a qual nenhuma função molecular foi identificada. Estudo realizado por Eulenburg et al (2013) determinou a estrutura cristalina em alta resolução do produto do gene *Rv2140c*, que revelou um complexo dimérico que compartilha uma homologia estrutural com a família de proteínas que se liga a fosfatidiletanolamina. *Rv2140c* forma interações de baixo peso molar com uma seleção de análogos solúveis de fosfatidiletanolamina, indicando que tem um papel no metabolismo lipídico. Além disso, a locostatina (inibidor da migração e do crescimento celular) se liga ao *Rv2140c* e também inibe o crescimento do microrganismo modelo *M. smegmatis* (EULENBURG et al, 2013).

No presente trabalho, a PEBP encontra-se *down regulated* na condição biológica AT. Como relatado acima, essas proteínas podem estar envolvidas na modificação das estruturas da membrana durante o crescimento celular; este fato poderia possivelmente explicar uma maior abundância desta proteína na cepa de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CRM 270 (MT).

Conserved 19 kDa lipoprotein family protein (ligação)

A *Lipoprotein 19 kDa* (LpqH) (X8E051, X8DVH1, X8DFF8) é um grande antígeno de parede celular de *M. tuberculosis*. LpqH contribui para a patogenicidade de *M. tuberculosis* e das micobactérias associadas ao complexo *M. tuberculosis*. A lipoproteína de 19 kDa de *M. tuberculosis* é imunodominante tanto em camundongos como em seres humanos e demonstrou estimular a proliferação de células TCD4+, bem como a liberação de IL-2, IFN- γ e IL-12. Acredita-se que a acilação perto da porção N-terminal da LpqH ocorra nos aminoácidos 19-24 e possa contribuir para a sua imunogenicidade. Além disso, a glicosilação dessa proteína inibe as respostas imunes inatas, tais como a liberação de TNF- α , IL-6 e IL-10 por macrófagos, mas não afeta a ligação do anticorpo. Essa proteína também mostrou induzir as células CD8+ a secretar IFN- γ e, especificamente, lisar monócitos infectados com *M.*

tuberculosis, bem como promover a iniciação e ativação de neutrófilos (HUNTLEY; STABEL; BANNANTINE, 2005, PARRA et al, 2017).

Os homólogos da lipoproteína de 19 kDa existem em *Mycobacterium bovis*, *M. avium* e *M. intracellulare*, mas estão ausentes de *Mycobacterium phlei*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *Mycobacterium gordonae* e *M. leprae* (SUTCLIFFE; HARRINGTON, 2004, HUNTLEY; STABEL; BANNANTINE, 2005). Ripoll et al (2009) relataram em *M. abscessus* a presença de quatro genes que codificam proteínas semelhantes a LpqH, espalhados por todo o genoma, sugerindo que essas moléculas podem estar envolvidas na patogenicidade de *M. abscessus*, possivelmente através da modificação da resposta do hospedeiro.

Nesse trabalho, *Lipoprotein 19 kDa* foi encontrada tanto *down regulated* na condição biológica AT como também apenas na condição biológica (*only*) AT. Como essa proteína contribui para a patogenicidade das micobactérias, isso corrobora com o que já foi descrito por alguns autores, que *M. abscessus* é um patógeno intracelular capaz de crescer em macrófagos e sua infecção em camundongos está associada a lesões granulomatosas evoluindo espontaneamente para lesões caseosas (RIPOLL et al, 2009, RIBEIRO et al, 2017).

Regulator LuxR (ligação)

Regulator LuxR (A0A0U1A7X6) é uma proteína reguladora de transcrição, um “jogador chave” no *quorum sensing* (QS), que coordena a expressão de uma variedade de genes, incluindo aqueles que codificam fatores de virulência e biossíntese de antibióticos, motilidade, transferência de plasmídeos, bioluminescência e formação de biofilmes (CHEN; XIE, 2011).

Quorum sensing é um tipo de sinalização célula-célula, no qual os microrganismos regulam a densidade populacional através de sinalização química. As bactérias podem secretar uma molécula-sinal chamada autoindutor (AI), que se harmoniza/concilia com a concentração de AI ambiental. Na presença de alta densidade celular, a molécula AI acumula. Assim, múltiplos genes alvo permanecem não sendo expressos, regulados até que a concentração da molécula AI atinja um limiar. Eventos essenciais para a sobrevivência e propagação das bactérias, como a

síntese de protease extracelular e de polissacarídeo extracelular, a bioluminescência, a biossíntese de antibióticos, a formação de biofilmes, a mobilidade, a conjugação para transferência de plasmídeos e a produção de virulência são regulados pela molécula AI (CHEN; XIE, 2011).

Em alta densidade celular, a concentração da molécula AI atinge um limiar e forma um complexo ativo com o homólogo *LuxR*; este complexo se liga a sequências promotoras específicas chamadas *lux-boxes* que controlam as atividades de transcrição do promotor, permitindo que as bactérias controlem seus comportamentos, propícios à sobrevivência e propagação em ambiente hostil. As proteínas da família *LuxR* afetam tanto a sobrevivência como a propagação de bactérias (CHEN; XIE, 2011).

Alguns genes que codificam as proteínas da família *LuxR* são encontrados em *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. leprae*, *M. abscessus* e *M. smegmatis* (ALONSO-HEARN et al, 2010, CHEN; XIE, 2011). Neste trabalho, a proteína *regulator LuxR* foi encontrada apenas na condição biológica AT. Como foi descrito acima, essa proteína reguladora, quando forma um complexo ativo, permite que os microrganismos controlem seus comportamentos, que propiciem a sobrevivência em ambientes hostis. Possivelmente, isso poderia explicar a presença desta proteína na cepa AT.

Protein translocase subunit SecA (ligação e membrana)

Protein translocase subunit SecA (X8DS72, B1MB57) é o componente ATPase da via bacteriana de secreção Sec. O caminho Sec (para secreção) é essencial e ubíquo e, é responsável pela grande maioria dos estudos de exportação de proteínas. A exportação de proteínas através da via Sec é responsável pela biogênese das membranas celulares e paredes celulares, pela secreção de polipeptídeos, como enzimas hidrolíticas, toxinas, moléculas de sinalização, apêndices de ligação e mobilidade (VRONTOU; ECONOMOU, 2004, WANSON et al, 2015).

A proteína SecA reconhece as proteínas destinadas à exportação do citoplasma e fornece energia para translocá-las através da membrana citoplasmática

através do canal *SecYEG translocase*. As proteínas exportadas pela SecA são sintetizadas como pré-proteínas com peptídeos contendo sinal N-terminal. Após a translocação, o peptídeo sinal é clivado para liberar as proteínas maduras. Tanto o peptídeo sinal como as características da proteína madura são reconhecidos pela SecA (SWANSON et al, 2015). SecA está dez vezes mais presente em comparação com as outras proteínas Sec. Verificou-se que interage com uma infinidade de moléculas, incluindo ela própria, o ribossomo, a cadeia nascente do peptídeo substrato, o precursor completo da proteína substrato, SecB, SecY e diferentes fosfolípidos. Consequentemente, SecA é encontrada tanto no citosol quanto associada à membrana interna. Curiosamente, as micobactérias contêm dois homólogos da SecA, sendo que apenas uma das cópias é essencial para o crescimento e responsável pela maioria das exportações de proteínas que ocorrem - SecA1 é considerada uma proteína *housekeeping* (PIETERS; McKINNEY, 2013, SWANSON et al, 2015).

Em contraste, SecA2 normalmente não é essencial e, é necessária para a exportação de um subconjunto mais limitado de proteínas. Estudos em micobactérias mostram que, mesmo quando super expressas, as duas proteínas SecA são incapazes de se compensar. Assim, cada proteína SecA tem funções distintas na exportação de proteínas. Em *M. tuberculosis*, foi observado que SecA2 (MtbSecA2) não é essencial para o crescimento em cultura desta micobactéria, mas é essencial para a virulência *in vivo*. Além disso, SecA2 é necessária para o crescimento intracelular de *M. tuberculosis* em macrófagos. O papel da SecA2 na promoção do crescimento nos macrófagos é atribuído a prevenção da maturação do fagossoma. Em *Mycobacterium marinum*, sugere-se que a exportação da proteína quinase G (PknG) pela via SecA2 seja pelo menos parcialmente responsável pelo efeito SecA2 na maturação de fagossomas. Em *M. tuberculosis*, a via SecA2 é adicionalmente necessária para restringir a apoptose de macrófagos infectados. Uma possível explicação para o último efeito é a secreção de superóxido dismutase dependente de SecA2, que pode reduzir a apoptose mediada por espécies reativas do oxigênio. Uma associação entre SecA2 e a secreção de fatores de virulência também pode ser observada em outros patógenos bacterianos, como *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (PIETERS; McKINNEY, 2013, SWANSON et al, 2015).

Além dessa proteína já ter sido descrita em *M. tuberculosis* e *M. marinum*, a mesma foi relatada em *M. smegmatis* (SWANSON et al, 2015). Neste trabalho, a proteína *translocase SecA* encontra-se *up regulated* na condição biológica AT. Foram encontradas duas dessas proteínas na cepa de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 (AT) identificadas como X8DS72 (gene *secA2*) e B1MB57 (gene *secA*), esta última sem descrição do homólogo.

Como descrito acima, SecA2 é necessária para o crescimento intracelular de *Mycobacterium* em macrófagos, corroborando com o que já foi descrito por alguns autores, que *M. abscessus* é um patógeno intracelular capaz de crescer em macrófagos (RIPOLL et al, 2009, RIBEIRO et al, 2017).

Mce family protein (ligação, membrana e atividade de transporte)

Mammalian cell entry (Mce) family protein (X8DEU4, X8DE78, X8DEK6) são moléculas transportadoras que formam complexos multi-proteína considerados funcionalmente análogos aos componentes *substrate binding protein* (SBP) dos transportadores ABC. As proteínas da família Mce estão intimamente envolvidas na invasão e existência prolongada em macrófagos hospedeiros (ZHANG; XIE, 2011, PERKOWSKI et al, 2016).

Os quatro sistemas de transporte da família Mce (Mce1-4) em *M. tuberculosis* desempenham papéis em virulência e acredita-se que funcionem na absorção de lipídeos. O transportador Mce melhor caracterizado é o Mce4. Mce4 é necessário para absorção de colesterol, sendo o colesterol um nutriente importante durante a infecção por *M. tuberculosis*. Evidências sugerem que o Mce1 seja responsável pela importação de ácidos micólicos e ácidos graxos de cadeia longa característicos das micobactérias (ZHANG; XIE, 2011, PERKOWSKI et al, 2016).

Embora os transportadores da família Mce tenham uma importância clara para a virulência de *M. tuberculosis* e sejam um componente central do genoma desse microrganismo, ainda não existe uma análise genética sistemática ou bioquímica das proteínas transportadoras Mce individualmente, em termos de suas contribuições para a virulência ou suas funções no mecanismo de transporte. Para os componentes da família de transportadores Mce são atribuídas funções por

analogia aos transportadores ABC clássicos (por exemplo, ATPase, permease ou proteínas ligadoras de soluto) (PERKOWSKI et al, 2016).

Zhang e Xie (2011) demonstraram que os homólogos do gene *mce4a* são altamente conservados entre o gênero *Mycobacterium*, incluindo: *Mycobacterium gastri*, *Mycobacterium interjectum*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium celatum*, *M. bovis*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium xenopi*, *M. avium*, *Mycobacterium terrae* e *Mycobacterium obuense*. Já em um estudo realizado por Ripoll et al (2009), foram relatados sete operons *mce* em *M. abscessus* e apenas quatro em *M. smegmatis*. No presente trabalho, a proteína Mce foi encontrada apenas na condição biológica AT. Foram identificadas três proteínas Mce na cepa de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 (AT) e, apenas a X8DEK6 foi identificada como Mce4.

Como essas proteínas estão intimamente envolvidas na invasão e existência prolongada em macrófagos hospedeiros, isso pode corroborar com o que já foi descrito por alguns autores, que verificaram a presença de lesões granulomatosas evoluindo para lesões caseosas em camundongos infectados com *M. abscessus* (RIPOLL et al, 2009, RIBEIRO et al, 2017).

Probable ABC transporter (Macrolide-transport) ATP-binding protein (ligação e membrana)

Os *ATP binding cassette* (ABC) *transporters*, encontrados em eucariotas e procariotas, constituem uma grande superfamília de permeases de subunidades múltiplas que transportam várias moléculas (íons, aminoácidos, peptídeos, drogas, antibióticos, lipídeos, polissacarídeos, proteínas etc.) usando ATP como fonte de energia. Esses transportadores são importantes fatores de virulência nas bactérias porque estão envolvidos na absorção de nutrientes e na secreção de toxinas e agentes antimicrobianos (BRAIBANT; GILOT; CONTENT, 2000, DE ROSSI; AÍNSA; RICCARDI, 2006).

Os transportadores ABC são classificados como importadores e exportadores, dependendo da direção de translocação de seu substrato. Os importadores são encontrados exclusivamente em procariotas e estão envolvidos na absorção de

moléculas extracelulares. Eles são geralmente associados a uma proteína extra-citoplasmática de ligação ao substrato (SBP) de alta afinidade, localizada no periplasma de bactérias Gram-negativas ou mantida por uma âncora de aminoácidos lipo-amino NH₂ terminal na vizinhança da membrana citoplasmática de bactérias Gram-positivas. Os exportadores são encontrados em procariotas e eucariotas, onde exportam substratos do citoplasma para o ambiente externo. Os exportadores procarióticos incluem proteínas, peptídeos, fármacos, antibióticos ou sistemas de transporte de polissacarídeos e, alguns desses exportadores também exigem proteínas adicionais, como proteínas de membrana externa e/ou proteínas que supostamente conectem essas proteínas exportadoras a proteínas de membrana interna e externa (BRAIBANT; GILOT; CONTENT, 2000, LOUW et al, 2009).

Macrolide-transport (B1MMT3) são transportadores de macrolídeos. Esses transportadores provavelmente conferem resistência de *M. tuberculosis* a antibióticos macrolídeos, provavelmente exportando-os do citoplasma. Curiosamente, um homólogo de *M. smegmatis* de Rv1473 foi recentemente identificado e mostrou ser induzido durante a fase estacionária do crescimento. Durante esta fase de crescimento, *M. smegmatis* e *M. tuberculosis* também se mostraram resistentes aos fármacos anti-micobacterianos padrão (BRAIBANT; GILOT; CONTENT, 2000).

No presente trabalho, esta proteína foi encontrada *up regulated* na condição biológica AT. Como relatado anteriormente, foi detectada resistência na cepa de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CRM 270 e, sensibilidade na cepa de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 ao antibiótico macrolídeo claritromicina pelo MIC. A proteína *Macrolide-transport* está mais abundante na cepa de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594, ou seja, na cepa sensível ao macrolídeo. Porém, mesmo em uma abundância menor, a presença desta proteína explica a resistência à claritromicina da cepa de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CRM 270.

4.4.5 Descrição de proteínas relacionadas às enzimasificadoras de antibióticos

O envelope celular micobacteriano desempenha um papel crucial na proteção da célula contra compostos extracelulares tóxicos. A presença de porinas permite a rápida passagem de quantidades potencialmente letais de compostos e antibióticos hidrofílicos através do envelope. Uma vez internalizados, os antibióticos podem atingir seu alvo no citoplasma e ativar a expressão de potenciais genes de resistência a antimicrobianos. Está bem documentado que o envelope celular atua de forma sinérgica com sistemas internos induzíveis por antibióticos para competir contra os efeitos dos antimicrobianos. Este sistema interno, conhecido como resistência intrínseca, inclui bombas de efluxo, enzimasificadoras/inativadoras de antibióticos, enzimasificadoras de alvo e genes que conferem resistência ao metal (**Tabela 1**) (NESSAR et al, 2012).

Putative aminoglycoside phosphotransferase (ligação) e ADP-ribosyltransferase (ligação, membrana e atividade de transporte)

Aminoglycoside phosphotransferase (A0A0U1A2M2) e ADP-ribosyltransferase (X8DIZ4) são enzimas hidrolíticas ouificadoras de antibióticos.

M. abscessus atingiu notoriedade como uma das espécies micobacterianas mais resistentes aos antibióticos. Grande parte dessa multirresistência aos antimicrobianos deve resultar de uma fraca permeabilidade da parede celular, porém a análise do genoma de *M. abscessus* também revelou a presença de muitos determinantes potenciais de resistência a antimicrobianos (RIPOLL et al, 2009).

Um fator importante no surgimento da resistência aos antibióticos é a existência de enzimas que modificam ou degradam quimicamente os antibióticos. Os genes que codificam estas enzimas são comumente encontrados em elementos genéticos móveis, facilitando a sua propagação. Uma dessas classes de enzimas é a família de aminoglicosídeos fosfotransferase (APH), que usa transferência de fosfato mediada por ATP para modificar quimicamente e inativar antibióticos aminoglicosídeos, como estreptomicina e kanamicina. Outra enzima modificadoras de

antibiótico que já foi descrita é ADP-ribosil transferase, responsável por inativar a rifampicina (NURIZZO et al, 2003, RIPOLL et al, 2009, NESSAR et al, 2012).

Vários artigos científicos relataram a presença dessas enzimas em micobactérias. Nessar et al (2012) descreveram que *M. abscessus* contém essas enzimas que podem modificar aminoglicosídeos transferindo resíduos de acetil ou fosfato em posições-chave dentro do antibiótico, tornando-os inativos. *M. abscessus* possui uma aminoglicosídeo 2-N acetiltransferase e vários homólogos de fosfotransferases aminoglicosídeos. Verificou-se que acetiltransferases e fosfotransferases de *M. smegmatis* e *M. tuberculosis* conferem também resistência a aminoglicosídeos (NESSAR et al, 2012).

Já para o patógeno oportunista *M. smegmatis*, a rifampicina é um antimicrobiano ineficaz devido à presença de uma ADP-ribosiltransferase de rifampicina codificada cromossomicamente (BAYSAROWICH et al, 2008).

Neste trabalho, a proteína *aminoglycoside phosphotransferase* foi encontrada apenas na condição biológica AT e a proteína *ADP-ribosyltransferase* foi encontrada apenas na condição biológica MT.

Apesar de ter sido detectada resistência nas duas cepas empregadas nesse estudo para o antibiótico aminoglicosídeo tobramicina e sensibilidade para o aminoglicosídeo amicacina pela CIM, foi identificada a proteína *aminoglycoside phosphotransferase* apenas na cepa de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594. Já a proteína *ADP-ribosyltransferase* foi anotada apenas na cepa de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CRM 270.

A presença da proteína *aminoglycoside phosphotransferase* na cepa de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 resistente à tobramicina, corrobora com o que foi relatado por Nessar et al (2012), que essa proteína confere resistência intrínseca de *M. abscessus* aos aminoglicosídeos.

4.4.6 Descrição de proteínas relacionadas aos mecanismos de bomba de efluxo

Os mecanismos de efluxo ativos representam potencialmente um dos fatores causadores da resistência a antibióticos em micobactérias. Os mecanismos de bomba de efluxo têm um papel fisiológico protetor de bactérias contra moléculas

tóxicas e manutenção da homeostase celular e equilíbrio fisiológico através da exportação de toxinas ou metabólitos para o ambiente extracelular (NESSAR et al, 2012).

As bombas de efluxo de resistência a multidrogas, por definição, reduzem as concentrações intracelulares de mais de um antibiótico para níveis subinibitórios e, assim, são utilizados para promover o surgimento de resistência a múltiplos antimicrobianos. Os genes que codificam bombas de resistência a múltiplos antimicrobianos são expressos constitutivamente em células do tipo selvagem e, assim, conferem um baixo nível de resistência (LOUW et al, 2009).

Os transportadores de efluxos de resistência a multidrogas utilizam o gradiente eletroquímico transmembranar de prótons ou íons de sódio para expulsar os antimicrobianos da célula e, geralmente são agrupados em quatro superfamílias, principalmente com base na homologia da sequência de aminoácidos. Estes incluem *Major facilitator superfamily* (MFS), a *ATP-binding cassette family*, a família de resistência-nodulação-divisão (*resistance-nodulation-division - RND*) e *small multidrug resistance family* (SMR) (POOLE, 2000, LOUW et al, 2009).

A MFS compreende uma das maiores famílias de transportadores de membrana. As permeases da MFS possuem 12 ou 14 putativos ou segmentos de transmembranas estabelecidos e transportam diversos componentes diferentes, incluindo açúcares simples, oligossacarídeos, inosítois, antimicrobianos, aminoácidos, nucleosídeos, ésteres de organofosfatos, metabólitos do ciclo de Krebs e uma grande variedade de ânions e cátions inorgânicos (DE ROSSI; AÍNSA; RICCARDI, 2006).

No genoma de *M. abscessus* são encontrados genes que codificam os membros da família MFS *ABC transporters* e da família transportadora *mycobacterial membrane protein large* (MmpL). Os transportadores multidrogas de cassete de ligação de ATP (ABC) (*ABC-type multidrug transportes*) utilizam a energia livre da hidrólise de ATP para bombear antimicrobianos para fora da célula e podem ser classificados como importadores (absorção de moléculas extracelulares) ou exportadores (remover substratos para o ambiente externo) (LOUW et al, 2009).

MMPL family protein (ligação e membrana)

A família transportadora MmpL (X8DIS9) está envolvida no transporte de lipídios para a membrana e codifica as proteínas de resistência, nodulação e divisão celular (RND), que é uma família de bombas de resistência a múltiplos antimicrobianos, por meio da mediação do transporte de um grupo diversificado de compostos (catiônicos, aniônicos ou neutro), incluindo várias antimicrobianos, metais e ácidos graxos. Essas proteínas medeiam o transporte através da membrana citoplasmática usando a força motora do gradiente eletroquímico transmembranar de prótons (NESSAR et al, 2012).

Os genes que codificam membros da família de transportadores MmpL estão distribuídos por todo o genoma do *M. abscessus*, mas seu papel nessa espécie ainda não foi estabelecido. Estudos recentes atribuíram uma função de resistência aos antimicrobianos à família MmpL. Pasca et al (2005) demonstraram que o gene *mmpL7* de *M. tuberculosis* confere um alto nível de resistência à isoniazida quando superexpressas em *M. smegmatis* e o nível de resistência foi significativamente diminuído na presença de inibidores de efluxo. No entanto, Domenech et al (2005) construíram cepas de mutantes de *M. tuberculosis* com 11 dos 13 genes de *mmpL* inativados e relataram que a susceptibilidade desses mutantes a um amplo espectro de agentes não foi alterada. Isso levou os autores a sugerir que, ao contrário de sua função em outros organismos, essas proteínas não desempenham um papel significativo na resistência intrínseca a antimicrobianos de *M. tuberculosis* (PASCA et al, 2005, DOMENECH; REED; BARRY, 2005, NESSAR et al, 2012).

No presente trabalho, esta proteína foi encontrada apenas na condição biológica MT, corroborando o que foi relatado por Nessar et al (2012), sobre uma possível função desta família ligada a resistência intrínseca aos antibióticos, isto porque, esta cepa mostrou-se mais resistente aos antibióticos quando realizado o ensaio de avaliação de susceptibilidade. Porém, se fizéssemos uma analogia entre os antimicrobianos, os antibióticos e os desinfetantes, a presença desta família de proteínas na cepa MT não responderia a possível resistência ao glutaraldeído, já que ela deveria estar presente na cepa de *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS nº 00594 (AT).

Fluoroquinolones export ATP-binding protein (ligação, membrana e atividade de transporte)

Fluoroquinolones export ATP-binding proteins (A0A0U1A6R1) são proteínas transportadoras de multidrogas do tipo ABC classificados como exportadores.

A primeira evidência indireta de uma bomba de efluxo para antibiótico em micobactérias surgiu a partir do surgimento rápido de cepas resistentes às fluoroquinolonas (FQ) quando esses antibióticos se tornaram um recurso contra infecções por *M. tuberculosis* multirresistentes.

Nas micobactérias, duas bombas de efluxo multidrogas da família MFS foram associadas ao transporte de FQ: a bomba de efluxo LfrA de *M. smegmatis* e a bomba de efluxo Rv1634 de *M. tuberculosis* (DE ROSSI; AÍNSA; RICCARDI, 2006, NGUYEN; THOMPSON, 2006)

A proteína LfrA foi a primeira bomba de efluxo funcional a ser descrita no gênero *Mycobacterium*. Esta bomba de efluxo exibe ampla especificidade de substrato para FQ mais hidrofílicas. A superprodução dessa proteína leva a um baixo nível resistência à FQ, ao brometo de etídeo, à acridina e a alguns compostos quaternários de amônio em *M. smegmatis* (VIVEIROS; LEANDRO; AMARAL, 2003, DE ROSSI; AÍNSA; RICCARDI, 2006, LOUW et al, 2009).

No presente trabalho, a proteína *fluoroquinolones export ATP-binding* foi encontrada apenas na condição biológica MT.

Apesar de ter sido detectada resistência na CIM, nas duas cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* desse estudo, aos antibióticos ciprofloxacina (segunda geração) e a moxifloxacina (quarta geração), foi identificada a proteína *fluoroquinolones export ATP-binding* na cepa de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CRM 270. Este fato não é corroborado com o que foi relatado por De Rossi, Aínsa e Riccardi (2006), que a presença desta proteína poderia levar a sensibilidade da micobactéria às FQ, isto porque, a cepa CRM 270 apresentou resistência às FQ no ensaio de avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos.

4.4.7 Descrição de proteínas com função de porinas

Uma das características mais marcantes das micobactérias é a sua parede celular exclusiva, que de acordo com vários modelos, compreende uma membrana externa de fluidez e permeabilidade extremamente baixas tanto para solutos hidrofóbicos como hidrofílicos. A robustez da parede celular e a membrana externa impermeável protegem as micobactérias dos estresses ambientais e contribuem para a sua resistência intrínseca a muitos antibióticos. No entanto, apesar desta aparente ênfase na função protetora da membrana externa, as micobactérias devem ser capazes de adquirir nutrientes e liberar produtos residuais. Porinas são canais de proteínas cheios de água, presentes na membrana externa de micobactérias, que permitem a difusão de solutos pequenos e hidrofílicos (HILLMANN et al, 2007)

A bicamada de ácido micólico é uma barreira de permeabilidade extremamente eficiente que protege a célula de compostos tóxicos, sendo considerado o principal determinante da resistência intrínseca de micobactérias aos antibióticos mais comuns, agentes quimioterápicos e desinfetantes químicos (BRENNAN; NIKAIDO, 1995). A bicamada de ácido micólico é funcionalmente análoga à membrana externa de bactérias Gram-negativas. Existem vários caminhos para o transporte através da membrana externa de bactérias Gram-negativas: (i) compostos hidrofóbicos penetram a membrana por dissolução temporária na bicamada lipídica. (ii) os compostos pequenos e hidrofílicos difundem através de canais de proteínas cheias de água, as porinas (NIEDERWEIS, 2003), entre outros.

MspA protein e MspA family protein (membrana e atividade transporte)

MspA protein (A0A0U1A2L6) e *MspA family protein* (X8DTF1, X8DMQ8) são porinas, e constituem mais de 70% de todos os poros de *M. smegmatis* (STAHL et al, 2001).

MspA foi identificada como uma proteína formadora de canais em extratos de clorofórmio-metanol de *M. smegmatis*. A permeabilidade da parede de um mutante

$\Delta mspA$ de *M. smegmatis* para cefaloridina e glicose foi reduzida em nove e quatro vezes, respectivamente (STAHL et al, 2001). O número de poros na parede celular de *M. smegmatis* caiu de 2.400 para 800 por célula no mutante *mspA* na fase de crescimento exponencial, mostrando que MspA é a principal porina de quatro porinas Msp de *M. smegmatis*. A exclusão dos genes *mspA*, *mspC* e *mspD* em um triplo mutante reduziu fortemente a taxa de crescimento de *M. smegmatis*, ressaltando a importância das porinas Msp para absorção de nutrientes. MspA é a primeira proteína de membrana externa micobacteriana cuja estrutura foi definida a nível atômico. A estrutura de cristal ilustrou que oito monômeros MspA constituem um único canal de 9,6 nm de comprimento. Esta arquitetura de proteínas é completamente diferente das porinas triméricas de bactérias Gram-negativas, que possuem um poro por monômero e têm aproximadamente 4 nm de comprimento. Estes resultados estabeleceram MspA como o primeiro membro de uma nova classe de porinas (NIEDERWEIS, 2003, STEPHAN et al, 2005, HILLMANN et al, 2007).

A expressão da porina MspA de *M. smegmatis* em *M. tuberculosis* e *Mycobacterium bovis* BCG promove a absorção de glicose e pode acelerar a taxa de crescimento. A expressão de MspA aumenta as sensibilidades de *M. tuberculosis* e *M. bovis* para antibióticos hidrofílicos, como b-lactâmicos e os antimicrobianos contra a tuberculose isoniazida, etambutol e estreptomicina (MAILAENDER et al., 2004, STEPHAN et al., 2004, NGUYEN; THOMPSON, 2006).

Stephan et al (2004) demonstraram que uma cepa de *M. smegmatis* que sofreu mutação, perdendo a principal porina MspA, aumentou o nível de resistência desta bactéria a alguns antibióticos. (STEPHAN et al, 2004).

4.4.7.1 Relação entre as porinas e o glutaraldeído

Considera-se que o glutaraldeído é predominantemente um biocida reativo à superfície e que forma pontes ou ligações cruzadas com grupos amino das proteínas expostas na superfície das células bacterianas (McDONNELL; RUSSELL, 1999). Embora não sejam conhecidos os mecanismos de resistência das micobactérias ao desinfetante, é razoável supor que mudanças na superfície celular resultando em diminuição da ligação e/ou penetração de glutaraldeído podem ser mecanismos

através dos quais as MCR desenvolvem tolerância. Devido ao papel importante desempenhado pela membrana externa das micobactérias na susceptibilidade aos antimicrobianos e nas interações patógeno-hospedeiro, há, portanto, alguma preocupação de que o uso generalizado de glutaraldeído em contextos clínicos pode selecionar populações resistentes de bactérias, com possíveis consequências sobre a resistência aos antibióticos e a patogenicidade (SVETLÍKOVÁ, 2009).

Os compostos que contêm grupos amino que são suscetíveis à ligação do glutaraldeído na superfície de micobactérias de crescimento rápido incluem proteínas expostas à superfície, dentre elas as porinas e os glicopeptídeos. Além disso, os lipopolissacarídeos da parede celular podem afetar a susceptibilidade de *M. chelonae* ao glutaraldeído (MANZOR et al, 1999). Para avaliar o impacto desses compostos do invólucro celular sobre a resistência de *M. smegmatis* ao glutaraldeído, mutantes mc²155 deficientes em diferentes aspectos de sua biossíntese foram comparados aos respectivos parentes de tipo selvagem para resistência ao glutaraldeído (SVETLÍKOVÁ, 2009).

Os resultados mostraram que os defeitos na expressão de porina do tipo Msp aumentaram drasticamente a resistência de *M. smegmatis* e *M. chelonae* ao glutaraldeído. Uma vez que os defeitos na atividade da porina também aumentaram drasticamente a resistência de *M. chelonae* aos antimicrobianos, os autores também suportaram a hipótese de que os isolados resistentes ao glutaraldeído provavelmente desenvolveram resistência cruzada a múltiplos antibióticos, incluindo alguns utilizados no tratamento clínico das infecções por MCR.

Neste trabalho, a proteína *MspA protein* foi encontrada apenas na condição biológica AT e a proteína *MspA family* foi encontrada apenas na condição biológica MT. Na cepa de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CRM 270 (MT) foram identificadas duas porinas MspA e na cepa CBRVS 00594 (AT), uma porina MspA. Essa informação, pode nos levar a crer que devido a uma quantidade maior de porinas presente na membrana externa da cepa MT, o glutaraldeído teria tido maior facilidade para atravessar a bicamada lipídica da parede desta micobactéria e assim, agir de forma mais efetiva, comparando com a cepa AT.

5 CONCLUSÕES

- ✓ Os resultados da análise comparativa da formação de biofilme por *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 demonstraram que o microrganismo foi capaz de formar biofilme tanto no disco de PC quanto no de AI, mesmo em concentrações elevadas de glutaraldeído;
- ✓ Foi observado que ocorreu uma maior recuperação de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 no disco de PC na presença e ausência de glutaraldeído, do que no disco de AI;
- ✓ A formação do biofilme de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 teve redução quando exposto às concentrações de 1,0 e 1,5% de glutaraldeído, mas não foi totalmente destruído, nos dois discos;
- ✓ A análise da microscopia epifluorescente revelou uma grande quantidade de aglomerados e de bactérias isoladas na ausência e presença de diferentes concentrações de glutaraldeído após os 7 dias de incubação;
- ✓ Todas as amostras analisadas pelo MVCL desenvolveram o biofilme após 7 e 14 dias de incubação, porém em 14 dias de incubação, *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594 demonstrou uma considerável diminuição da quantidade de células viáveis tanto na presença quanto na ausência de glutaraldeído;
- ✓ Foi observada a presença de células viáveis no biofilme de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CBRVS 00594, mesmo após 14 dias, na presença de altas concentrações de glutaraldeído;
- ✓ Foram inferidas 4.126 proteínas na amostra AT e 4.041 na amostra MT após a análise do SEPro;
- ✓ As diferentes condições biológicas apresentaram 3.971 proteínas em comum. Além disso, 189 e 185 proteínas foram inferidas somente em uma condição biológica, MT ou AT, respectivamente;

- ✓ O número total de proteínas diferencialmente abundantes nas comparações entre as cepas MT e AT foi de 304 proteínas;
- ✓ Várias proteínas foram registradas, após análise funcional, como importantes neste estudo, como proteínas relacionadas à patogenicidade, à regulação, ao transporte, às enzimas modificadoras de antibióticos, à bomba de efluxo, entre outros;
- ✓ Foram identificadas duas enzimas hidrolíticas ou modificadoras de antibióticos, a *Aminoglycoside phosphotransferase* (A0A0U1A2M2 - *only* AT) e a *ADP-ribosyltransferase* (X8DIZ4 - *only* MT). Apesar de ter sido detectada resistência nas duas cepas para tobramicina e sensibilidade para amicacina pela CIM, foi identificada a proteína *aminoglycoside phosphotransferase* apenas na cepa AT;
- ✓ Foram identificadas duas proteínas relacionadas a bomba de efluxo, a família transportadora MmpL (X8DIS9 - *only* MT) e *fluoroquinolones export ATP-binding proteins* (A0A0U1A6R1 - *only* MT). Apesar de ter sido detectada resistência na CIM nas duas cepas aos antibióticos ciprofloxacina (segunda geração) e a moxifloxacina (quarta geração), foi identificada a proteína *fluoroquinolones export ATP-binding* na cepa MT;
- ✓ Foram identificadas duas porinas MspA na cepa MT e uma porina MspA na cepa AT.

REFERÊNCIAS

ACHOUAK, W.; HEULIN, T.; PAGÈS, J. M. Multiple facets of bacterial porins. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 199, p. 1-7, 2001.

ADÉKAMBI, T. et al. Amoebal coculture of "*Mycobacterium massiliense*" sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. **J Clin Microbiol.**, v. 42, n.12, p. 5493-5501, 2004.

ADÉKAMBI, T. et al. Survival of environmental mycobacteria in *Acanthamoeba polyphaga*. **Appl Environ Microbiol.**, v. 72, p. 5974-81, 2006.

AEBERSOLD, R.; GOODLETT, D.R. Mass spectrometry in proteomics. **Chem Rev.**, v. 101, p. 269-295, 2001.

ALFA, M.J.; SISLER, J.J.; HARDING, G.K.M. *Mycobacterium abscessus* infection of a norplant contraceptive implant site. **CMAJ.**, v. 153, p. 1293-96, 1995.

ALONSO-HEARN, M. et al. A *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* *LuxR* regulates cell envelope and virulence. **Innate Immun.**, v. 16, p. 235-47, 2010.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alerta sobre infecções por micobactéria não tuberculosa após videocirurgia. Informe técnico. 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/informes/2007/070307.htm>. Acesso em: 05 abr. 2012.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Medidas para interrupção do surto de infecção por MCR e ações preventivas. Informe técnico. 2007b. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/Alertas/informe_tecnico_2.pdf. Acesso em: 05 abr. 2012.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Micobactérias. Nota técnica. 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2008/080808_NotaTecnica_Micobacteria.pdf. Acesso em: 5 abr. 2012.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Nota Técnica Conjunta Nº 01/2009: Infecções por micobactérias de crescimento rápido: fluxo de

notificações, diagnósticos clínicos, microbiológicos e tratamento. Disponível em: <[Http://www.anvisa.gov.br/hotsite/hotsite_micobacteria/nota_tecnica_conjunta.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/hotsite_micobacteria/nota_tecnica_conjunta.pdf)>. Acesso em: 30 nov. 2017.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde. Gerência de Vigilância e Monitoramento em Serviços de Saúde. Comunicado de risco Nº 002/2014. **Infecções por Micobactérias de Crescimento Rápido (MCR) relacionadas a procedimentos invasivos em serviços de saúde e clínicas cosméticas, no período de janeiro de 2010 a setembro de 2014.** 2014.

AUNG, T. T. et al. Biofilms of pathogenic nontuberculous mycobacteria targeted by new therapeutic approaches. **Ant Agents Chemother.**, v. 60, p. 24-35, 2016.

BANFIELD, M. J. et al. Function from structure? The crystal structure of human phosphatidylethanolamine-binding protein suggests a role in membrane signal transduction. **Structure**, v. 6, p. 1245-54, 1998.

BANTSCHEFF, M. et al. Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. **Anal Bioanal Chem.**, v. 4, p. 939-65, 2012.

BARBOSA, E. B. et al. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Rev Assoc Med Bras.**, v. 58, p. 366-75, 2012.

BARBOZA, R. et al. Can the false-discovery rate be misleading? **Proteomics**, v. 11, p. 4105-08, 2011.

BARDOUNIOTIS, E.; CERI, H.; OLSON, M. E. Biofilm formation and biocide susceptibility testing of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium marinum*. **Current Microbiol.**, v. 46, p. 28–32, 2003.

BAYSAROWICH, J. et al. Rifamycin antibiotic resistance by ADP-ribosylation: Structure and diversity of Arr. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 105, p. 4886-91, 2008.

BIGGER, J. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. **Lancet**, v. 244, p. 497–500, 1944.

BLOCK, S. S. Peroxygen compounds. In: **Disinfection, Sterilization and Preservation**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Williams (ed), 2001. p. 185.

BRAIBANT, M.; GILOT, P.; CONTENT, J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 24, p. 449-67, 2000.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 set. 1990.

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

BRITO, A.C. **Estudo fenotípico e molecular de micobactérias de crescimento rápido de interesse em Saúde Pública**. 2008. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2008.

BROWN-ELLIOTT, B.A.; GRIFFITH, D.E.; WALLACE, R.J. Newly described emerging human species of nontuberculous mycobacteria. **Infect Dis Clin North Am.**, v. 16, p. 187-220, 2002.

BROWN-ELLIOTT, B.A.; NASH, K.A.; WALLACE JR, R.J. Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with Nontuberculous Mycobacteria. **Clin Microbiol Rev.**, v. 25, p. 545-82, 2012.

CANAS, B. et al. Mass spectrometry technologies for proteomics. **Brief Funct Genomic Proteomic.**, v. 4, p. 295-320, 2006.

CÂNDIDO, P. H. C. et al. Multidrug-resistant nontuberculous mycobacteria isolated from cystic fibrosis patients. **JCM**, v. 58, p. 2990-97, 2014.

CARBONNE, A. et al. Outbreak of nontuberculous Mycobacterial subcutaneous infections related to multiple mesotherapy injections. **J Clin Microbiol.**, v. 47, p. 1961-64, 2009.

CARDOSO, A.M. et al. Emergence of nosocomial *Mycobacterium massiliense* infection in Goiás, Brazil. **Microbes Infect.**, v. 10, p.1552-57, 2008.

CARDOSO, A. M.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; KIPNIS, A. In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium massiliense* recovered from wound samples of

patients submitted to arthroscopic and laparoscopic surgeries. **Minim Invasive Surg.**, v. 2011, p. 724635, 2011.

CARSON, L.A. et al. Growth characteristics of atypical mycobacteria in water and their comparative resistance to disinfectants. **Appl Environ Microbiol.**, v. 36, n. 6, p. 839-46, 1978.

CARVALHO, P.C. et al. Search engine processor: Filtering and organizing peptide spectrum matches. **Proteomics**, v. 12, p. 944-9, 2012a.

CARVALHO, P.C. et al. PatternLab: from mass spectra to label-free differential shotgun proteomics. **Curr Protoc Bioinformatics**, Chapter 13: Unit 13.19, 2012b.

CARVALHO, P.C. et al. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. **Nature Protocols**, v. 11, p. 102-17, 2016.

CHEN, C.Y.; NACE, G.W.; IRWIN, P.L. A 6X6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. **J Microbiol Methods.**, v. 55, p. 475-9, 2003.

CHEN, J.; XIE, J. Role and regulation of bacterial LuxR-like regulators. **J Cell Biochem.**, v. 112, p. 2694-702, 2011.

CHIU, H.C. et al. Synergistic effect of *imp/ostA* and *msbA* in hydrophobic drug resistance of *Helicobacter pylori*. **BMC Microbiol.**, v. 9, p. 1-14, 2009.

CHO, A.Y. et al. Identification of cutaneous *Mycobacterium massiliense* infections associated with repeated surgical procedures. **Ann Dermatol.**, v. 22, p. 114-8, 2010.

CHOO, S. W. et al. Annotated genome sequence of *Mycobacterium massiliense* strain M154, belonging to the recently created taxon *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* comb. nov. **J Bacteriol.**, v. 194, p. 4778, 2012.

CHOPRA, T. et al. Quantitative Mass Spectrometry reveals plasticity of metabolic networks in *Mycobacterium smegmatis*. **Mol Cell Proteomics.**, v. 13, p. 3014-28, 2014.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS/The National Committee for Clinical Laboratory Standards) Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae,

and Other Aerobic Actinomycetes. Approved Standard - Second Edition. Document M24-A2 Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.

COROS, A.; DE CONNO, E.; DERBYSHIRE, K.M. A *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific insertion sequence is also present in the genome of *Mycobacterium smegmatis*, suggestive of lateral gene transfer among *Mycobacterial* species. **J Bacteriol.**, v. 190, p. 3408-10, 2008.

COSTA, E.A.; ROZENFELD, S. Marcos históricos e conceituais. In: **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2001. p. 15-37.

CAVERLY, L. J.; SPILKER, T.; LIPUMA, J. J. Complete Genome Sequence of *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*. **Genome Announc.**, v. 4, p. e00543-16, 2016.

DALLARI, S.G. Vigilância Sanitária, Direito e Cidadania. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/divulga/conavisa/cadernos/eixo3_texto09.pdf. Acesso em: 06 jul. 2012.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 64, p.847-67, 2000.

DAVIDSON, R. M. et al. Genome sequence of an epidemic isolate of *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* from Rio de Janeiro, Brazil. **Genome Announc.**, v. 1, p. e00617-13, 2013.

DAWSON, C. C.; INTAPA, C.; JABRA-RIZK, M.A. "Persisters": survival at the cellular level. **PLOS Pathog.**, v. 7, p. e1002121, 2011.

DE, A et al. Biofilm colonization in chronic treatment refractory infections presenting with discharging sinuses: A study in a tertiary care hospital of Eastern India. **J Lab Physicians.**, v. 9, p. 125-31, 2017.

DE ROSSI, E.; AÍNSA, J. A.; RICCARDI, G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 30, p. 36-52, 2006.

DHAR, N.; MCKINNEY, J.D. Microbial phenotypic heterogeneity and antibiotic tolerance. **Curr Opin Microbiol.**, v. 10, p. 30–8, 2007.

DOMENECH, P.; REED, M. B.; BARRY, C. E. III. Contribution of the *Mycobacterium tuberculosis* MmpL protein family to virulence and drug resistance. **Infect Immun.**, v. 73, p. 3492-501, 2005.

DONLAN, R.M. Biofilms and device-associated infections. **Emerg Infect Dis.**, v. 7, p. 277-81, 2001.

DUAN, X. et al. Mycobacterium Lysine ϵ -aminotransferase is a novel alarmone metabolism related persister gene via dysregulating the intracellular amino acid level. **Sci Rep.**, v.6, p. 1-10, 2016.

DUARTE, R.S. et al. Epidemic of postsurgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. **J Clin Microbiol.**, v. 47, p. 2149-55, 2009.

EID, A.J. et al. Prosthetic joint infection due to rapidly growing mycobacteria: report of 8 cases and review of the literature. **Clin Infect Dis.**, v. 45, p. 687-94, 2007.

ENG, J. K.; JAHAN, T. A.; HOOPMANN, M. R. Comet: an open-source MS/MS sequence database search tool. **Proteomics**, v. 13, p. 22–4, 2013.

ESTEBAN, J. et al. Biofilm development by potentially pathogenic non-pigmented rapidly growing mycobacteria. **BMC Microbiol.**, v. 8, p.184, 2008a.

ESTEBAN, J. et al. Epidemiology of infections due to nonpigmented rapidly growing mycobacteria diagnosed in an urban area. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 27, p. 951-7, 2008b.

EULENBURG, G et al. Structural and biochemical characterization of Rv2140c, a phosphatidylethanolamine-binding protein from *Mycobacterium tuberculosis*. **FEBS Lett.**, v. 587, p. 2936-42, 2013.

FALKINHAM, J.O.III. Epidemiology of infection by nontuberculous Mycobacteria. **Clin Microbiol Rev.**, v. 9, p. 177-215, 1996.

FLORES, V. C. et al. Antibiofilm effect of antimicrobials used in the therapy of mycobacteriosis. **Microb Pathog.**, v. 99, p. 229-35, 2016.

FONTANA, R. T. As micobactérias de crescimento rápido e a infecção hospitalar: um problema de saúde pública. **Rev Bras Enferm.**, v. 61, p. 371-6, 2008.

FRAUD, S.; MAILLARD, J.Y.; RUSSELL, A.D. Comparison of the mycobactericidal activity of ortho-phthalaldehyde, glutaraldehyde and other dialdehydes by a quantitative suspension test. **J Hosp Infect.**, v. 48, p. 214-21, 2001.

FRAUD, S. et al. Effects of ortho-phthalaldehyde, glutaraldehyde and chlorhexidine diacetate on *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus* strains with modified permeability. **J Antimicrob Chemother.**, v. 51, p. 575-84, 2003.

FREITAS, D. et al. An outbreak of *Mycobacterium chelonae* infection after LASIK. **Ophthalmology**, v. 110, p. 246-85, 2003.

FRÖHLICH, T.; ARNOLD, G.J. Proteome research based on modern liquid chromatography-tandem mass spectrometry: separation, identification and quantification. **J Neural Transm.**, v. 113, p. 973-94, 2006.

FUX, C.A. et al. Survival strategies of infectious biofilms. **Trends Microbiol.**, v. 13, p. 34-40, 2005.

GARBA, L et al. Molecular cloning and functional expression of a $\Delta 9$ - fatty acid desaturase from an antarctic *Pseudomonas* sp. A3. **Plos one**, v. 11, p. e0160681, 2016.

GOMES, A. S. G. **Estudo comparativo dos perfis proteômicos de cepas selvagem e aposimbótica de *Strigomonas culicis***. 2014. 230 p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, 2014.

GOMEZ-ALVAREZ, V.; REVETTA, R. P. Whole-genome sequences of four strains closely related to members of the *Mycobacterium chelonae* group, isolated from biofilms in a drinking water distribution system simulator. **Genome Announc.**, v. 4, p. e01539-15, 2016.

GORG, A. et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 21, p. 1037-53, 2000.

GRAVES, P.R.; HAYSTEAD, T.A.J. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 66, p. 39-63, 2002.

- GRIFFITH, D. E. et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 175, p. 367–416, 2007.
- GRIFFITH, D. E. et al. *Mycobacterium abscessus* “Pleased to Meet You, Hope You Guess My Name...” **Ann Am Thorac Soc.**, v. 12, p. 436-39, 2015.
- GRIFFITHS, P.A. et al. Glutaraldehyde-resistant *Mycobacterium chelonae* from endoscope washer disinfectors. **J Appl Microbiol.**, v. 82, p. 519-26, 1997.
- GROOTE, M.A.; HUIT, G. Infections due to rapidly growing mycobacteria. **Clin Infect Dis.**, v. 42, p. 1756-63, 2006.
- GUIMARÃES, T. et al. Pseudooutbreak of rapidly growing mycobacteria due to *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* in a digestive and respiratory endoscopy unit caused by the same clone as that of a countrywide outbreak. **Am J Infect Control.**, v. 44, p. e221-e226, 2016.
- GYGI, S. P. et al. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. **Nat Biotech.**, v. 17, p. 994–999, 1999.
- HAN, X., ASLANIAN, A., YATES, J.R. III. Mass Spectrometry for Proteomics. **Curr Opin Chem Biol.**, v. 12, p. 483–90, 2008.
- HALL-STOODLEY, L.; LAPPIN-SCOTT, H. Biofilm formation by the rapidly growing mycobacterial species *Mycobacterium fortuitum*. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 168, p. 77-84, 1998.
- HE, Z.; DE BUCK, J. Cell wall proteome analysis of *Mycobacterium smegmatis* strain MC2 155. **BCM Microbiol.**, v. 10, p. 1-10, 2010.
- HINRICHSEN, S. L. Micobacérias de crescimento rápido – MCR. **Prática hospitalar.** Ano IX, n. 53, p. 106-111, 2007.
- HÖFLING-LIMA, A.L. et al. In vitro of fluoroquinolones against *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae* causing infections keratitis after LASIK in Brazil. **Cornea**, v. 24, p. 730-4, 2005.

HOWARD, S.T.; BYRD, T.F. The rapid growing mycobacteria: saprophytes and parasites. **Microbes Infect.**, v. 2, p. 1845-53, 2000.

HOWARD, S. T. et al. Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. **Microbiol.**, v. 152, p. 1581-90, 2006.

HUNTLEY, J. F. J.; STABEL, J. R.; BANNANTINE, J. P. Immunoreactivity of the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 19-kDa lipoprotein. **BMC Microbiol.**, v. 5, p. 1-8, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3240.009**: Método confirmatório para avaliação da atividade micobactericida de desinfetantes. Rev. 00. Rio de Janeiro, 2016. 15p.

JEONG, B.H. et al. The first Korean case of nontuberculous Mycobacterial lung disease caused by *Mycobacterium abscessus* subspecies *bolletii* in a patient with bronchiectasis. **Tuberc Respir Dis.**, v. 76, p. 30-3, 2014.

JUNQUEIRA, M.; CARVALHO, P.C. Tools and challenges for diversity-driven proteomics in Brazil. **Proteomics**, v. 12, p. 2601–06, 2012.

KENT, P.T; KUBICA, GP. Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory. USDHHS. Center for Disease Control, Atlanta, 1985.

KEREN, I. et al. Characterization and transcriptome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* persisters. **MBio.**, v. 2, p. e00100-11, 2011.

KIM, H.Y. et al. Outbreak of *Mycobacterium massiliense* infection associated with intramuscular injections. **J Clin Microbiol.**, v. 45, p. 3127-30, 2007.

KIM, J. et al. Subspecies distribution and macrolide and fluoroquinolone resistance genetics of *Mycobacterium abscessus* in Korea. **Int J Tuberc Lung Dis.**, v. 20, p. 109-14, 2016.

KUMAR, C. Bioinformatics analysis of mass spectrometry-based proteomics data sets. **FEBS Lett.**, v. 583, p. 1703-12, 2009.

KWON, Y.H. et al. A case of skin and soft tissue infection caused by *Mycobacterium abscessus*. **Ann Dermatol.**, v. 21, p. 84-7, 2009.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-5, 1970.

LANE, C.S. Mass spectrometry-based proteomics in the life sciences. **CMLS.**, v. 62, p. 848-69, 2005.

LANGSRUD, S.; SUNDHEIM, G. Factors contributing to the survival of poultry associated *Pseudomonas* spp. exposed to a quaternary ammonium compound. **J Appl Microbiol.**, v. 82, p. 705-12, 1997.

LAVEZZO, E. et al. Enhancing protein function prediction with taxonomic constraints – The Argot 2.5 web server. **Methods**, v. 93, p. 15-23, 2016.

LEÃO, S.C. et al. Proposal that *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* be united and reclassified as *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* comb. nov., designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* subsp. nov. and emended description of *Mycobacterium abscessus*. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 61, p. 2311-3, 2011.

LEÃO, S. C. et al. Draft Genome Sequence of *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594. **Genome Announc.**, v. 1, p. e00896-13, 2013.

LEE, M.R. et al. Otitis media and otomastoiditis caused by *Mycobacterium massiliense* (*Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*). **J Clin Microbiol.**, v. 50, p. 3754-6, 2012.

LEE, M.R. et al. Bacteraemia caused by *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* and *M. abscessus* subsp. *bolletii*: Clinical features and susceptibilities of the isolates. **J Antimicrobial Agents.**, v. 43, p. 438–41, 2014.

LEE, S. et al. The Structure of ClpB: a molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state. **Cell**, v. 115, p. 229-40, 2003.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. Microbiologia Médica e Imunologia. 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 154-60.

LEWIS, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. **Nat Rev Microbiol.**, v. 5, p. 48-56, 2007.

LINK, A.J. et al. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. **Nat. Biotechnol.**, v. 17, p. 676-82, 1999.

LORENA, N.O.S.; DUARTE, R.S.; PITOMBO, M.B. Infecção por micobactérias de crescimento rápido após procedimentos videocirúrgicos – a hipótese do glutaraldeído. **Rev Col Bras Cir.**, v. 36, p. 266-67, 2009.

LORENA, N.S. et al. *Mycobacterium massiliense* BRA100 strain recovered from postsurgical infections: resistance to high concentrations of glutaraldehyde and alternative solutions for high level disinfection. **Acta Cir Bras.**, v. 25, p. 455-9, 2010.

LOUW, G. E. et al. A balancing act: Efflux/influx in Mycobacterial drug resistance. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 53, p. 3181-9, 2009.

LPSN.BACTERIO.NET. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterio.net/mycobacterium.html> . Acesso em: 10 out. 2017.

LUNA, J.A.C. Micobactérias atípicas. **BSCP Can Ped.**, v. 25, p. 237-48, 2001.

MALLICK, P.; KUSTER, B. Proteomics: a pragmatic perspective. **Nat Biotechnol.**, v. 28, p. 695-709, 2010.

MANZOOR, S.E. et al. Reduced glutaraldehyde susceptibility in *Mycobacterium chelonae* associated with altered cell wall polysaccharides. **J Antimicrob Chemother.**, v. 43, p. 759-65, 1999.

MARTÍN-DE-HIJAS, N. Z. et al. Biofilm development by clinical strains of non-pigmented rapidly growing mycobacteria. **Clin Microbiol Infect.**, v. 15, p. 931-6, 2009.

McDONNELL, G.; RUSSELL, A.D.; Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. **Clin Microbiol Rev.**, v. 12, p. 147-79, 1999.

MCDONNELL, G.E. Chemical Disinfection. In: **Antisepsis, disinfection, and sterilization: types, action and resistance**. Washington, DC: ASM Press (ed), 2007. p. 85-88.

MICHALSKI, A. et al. Ultra high-resolution linear ion trap Orbitrap mass spectrometer (Orbitrap Elite) facilitates top down LC MS/MS and versatile peptide fragmentation modes. **Mol Cell Proteomics.**, v. 11, p. 1-11, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Ocorrência de surto de infecções por micobactérias não tuberculosas pós-cirúrgicas no Rio de Janeiro/RJ. Nota Técnica N° 02/DEVEP/SVS/MS, Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2007. Disponível em: <www.sobracilrj.com.br/micobacterias/Nota%20técnica%20MS.doc>. Acesso em: 30 nov. 2017.

MOGK, A. et al. Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. **Mol Microbiol.**, v. 50, p. 585-95, 2003.

MONEGO, F. et al. Molecular identification and typing of *Mycobacterium massiliense* isolated from postsurgical infections in Brazil. **Braz J Infect Dis.**, v. 15, p. 436-41, 2011.

MOUGARI, F. et al. Infections caused by *Mycobacterium abscessus*: epidemiology, diagnostic tools and treatment. **Expert Rev Anti Infect Ther.**, v.12, p. 1139-54, 2016.

MOUGARI, F. Selection of resistance to clarithromycin with regard to the subspecies in *Mycobacterium abscessus*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 61, p. e00943-16, 2017.

MUÑOZ- EGEA, M. C. et al. Effect of ciprofloxacin in the ultrastructure and development of biofilms formed by rapidly growing mycobacteria. **BMC Microbiol.**, v. 15, p. 1-6, 2015.

MUSHATT, D. M., WITZIG, R. S. Successful treatment of *Mycobacterium abscessus* infections with multidrug regimens containing clarithromycin. **Clin Infect Dis.**, v. 20, p. 1441-42, 1995.

NASH, K.A.; BROWN-ELLIOTT, B.A.; WALLACE JR, R.J. A Novel gene, *erm(41)*, confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* but is absent from *Mycobacterium chelonae*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 53, p. 1367-76, 2009.

NAVES, P. et al. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. **Microb Pathog.**, v. 45, p. 86-91, 2008.

NESSAR, R. et al. *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. **J Antimicrob Chemother.**, v. 67, n. 4, p. 810–8, 2012.

NESVIZHSKII, A. I. A survey of computational methods and error rate estimation procedures for peptide and protein identification in shotgun proteomics. **J Proteomics.**, v. 73, p. 2092-123, 2010.

NESVIZHSKII, A. I. Proteogenomics: concepts, applications and computational strategies. **Nat Methods.**, v. 11, p. 1114-25, 2014.

NGUYEN, L.; THOMPSON, C. J. Foundations of antibiotic resistance in bacterial physiology - the mycobacterial paradigm. **Trends Microbiol.**, v. 14, p. 304-12, 2006.

NOMURA, K. et al. Antibiotic susceptibility of glutaraldehyde-tolerant *Mycobacterium chelonae* from 24 bronchoscope washing machines. **Am J Infect Control.**, v. 32, p. 185-8, 2004.

NUNES, L. S. et al. Outbreaks due to *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* in southern Brazil: persistence of a single clone from 2007 to 2011. **J Medical Microbiol.**, v. 63, p. 1288-93, 2014.

NURIZZO, D. et al. The crystal structure of aminoglycoside-3'-phospho-transferase-IIa, an enzyme responsible for antibiotic resistance. **J Mol Biol.**, v. 327, p. 491-506, 2003.

O'FARREL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J Biol Chem.**, v. 250, p. 4007-21, 1975.

OJHA, A. et al. GroEL1: A dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria. **Cell**, v. 123, p. 861-73, 2005.

OJHA, A. et al. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. **Mol Microbiol.**, v. 69, p. 164-174, 2008.

ORMAN, M. A.; BRYNILDSEN, M. P. Dormancy is not necessary or sufficient for bacterial persistence. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 57, p. 3230-9, 2013.

ONG, S.-E. et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. **Mol Cell Proteomics**, v. 1, p. 376–386, 2002.

ONG, S.-E.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. **Nat Chem Biol**, v. 1, p. 252–62, 2005.

ONG, S.-E.; MANN, M. A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). **Nat Protoc.**, v. 1, p. 2650–60, 2006.

PARRA et al. Scrutiny of *Mycobacterium tuberculosis* 19 kDa antigen proteoforms provides new insights in the lipoglycoprotein biogenesis paradigm. **Sci Rep.**, v. 7, p.1-12, 2017.

PASCA, M. R. et al. *mmpL7* gene of *Mycobacterium tuberculosis* is responsible for isoniazid efflux in *Mycobacterium smegmatis*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 49, p. 4775-7, 2005.

PATTERSON, S.D.; AEBERSOLD, R.H. Proteomics: the first decade and beyond. **Nat Genet.**, v. 33, p. 311-23, 2003.

PERKINS, D.N. et al. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, v. 20, p. 3551-67, 1999.

PERKOWSKI, E. F. et al. An orphaned Mce-associated membrane protein of *Mycobacterium tuberculosis* is a virulence factor that stabilizes Mce transporters. **Mol Microbiol.**, v. 100, p. 90-107, 2016.

PHILLIPS, M.S.; VON REYN, C.F. Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. **Clin Infect Dis.**, v. 33, p. 1363-74, 2001.

PIETERS, J.; MCKINNEY, J. D. Pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* and its interaction with the host organism. **Curr Top Microbiol Immunol.**, p. 374:v-vi, 2013.

PITOMBO, M.B.; LUPI, O.; DUARTE, R.S. Infecções por micobactérias de crescimento rápido resistentes a desinfetantes: uma problemática nacional? **Rev Bras Ginecol Obstet.**, v. 31, n. 11, p. 529-33, 2009.

POOLE, K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram-positive bacteria and the mycobacteria. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 44, p. 2595-99, 2000.

PRIMM, T.P.; LUCERO, C.A.; FALKINHAM, J.O. III. Health impacts of environmental mycobacteria. **Clin Microbiol Rev.**, v. 17, p. 98-106, 2004.

RAMIS, I. B. et al. Antimicrobial susceptibility of rapidly growing mycobacteria using the rapid colorimetric method. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 34, p. 1403-13, 2015.

RAMOS, M.C. et al. A retrospective bacteriological study of mycobacterial infections in patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Braz J Infect Dis.**, v. 4, p. 86-90, 2000.

RECHT, J. et al. Genetic analysis of sliding motility in *Mycobacterium smegmatis*. **J Bacteriol.**, v. 182, p. 4348-51, 2000.

RECHT, J.; KOLTER, R. Glycopeptidolipid acetylation affects sliding motility and biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. **J Bacteriol.**, v. 183, p. 5718-24, 2001.

RENDON, E. F. et al. *Mycobacterium mucogenicum* and other non-tuberculous Mycobacteria in potable water of a trauma hospital: a potential source for human infection. **J Hosp Infect.**, v.80, p. 74-6, 2012.

RHOADES, E. R. et al. *Mycobacterium abscessus* glycopeptidolipids mask underlying cell wall phosphatidyl-*myo*-inositol mannosides blocking induction of human macrophage TNF- α by preventing interaction with TLR2. **J Immunol.**, v. 183, p. 1997-2007, 2009.

RIBEIRO, G. M. et al. Increased survival and proliferation of the epidemic strain *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* CRM0019 in alveolar epithelial cells. **BMC Microbiology.**, v. 17, p. 1-14, 2017.

RICHARDS, J. P.; OJHA, A.K. Mycobacterial biofilms. **Microbiol Spectr.**, v. 2, p. 1-11, 2014.

RIPOLL, F. et al. Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. **Plos One**, v.4, p. e5660, 2009.

RODRIGUES, E. A. C. et al. Proteção antiinfecçiosa e procedimentos de desinfecção, esterilização e antissepsia. In: **Infecções hospitalares, prevenção e controle**. São Paulo: Sarvier (ed), 1997. p. 416.

ROSS, P. L. et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. **Mol Cell Proteomics**, v. 3, p. 1154–69, 2004.

RUSSEL, A.D. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. **Lancet Infect Dis.**, v. 3, p. 794-803, 2003.

SAMPAIO, J.L. et al. Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR is a useful tool for typing *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus* isolates. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 55, p. 107-18, 2006.

SANTOS, R. et al. Detection and identification of mycobacteria in the Lisbon water distribution system. **Water Sci Technol.**, v. 52, p. 177-80, 2005.

SHARBATI-TEHRANI, S. et al. Porins limit the intracellular persistence of *Mycobacterium smegmatis*. **Microbiology**, v. 151, p. 2403-10, 2005.

SHARMA, G. et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets. **Biologicals**, v. 42, p. 1–7, 2014.

SHARMA, I. M.; PETCHIAPPAN, A.; CHATTERJI, D. Quorum sensing and biofilm formation in mycobacteria: role of c-di-GMP and methods to study this second messenger. **IUBMB Life.**, v. 66, p. 823-34, 2014.

SHIN, J.H. et al. Prevalence of non-tuberculous mycobacteria in a hospital environment. **J Hosp Infect.**, v. 65, p. 143-8, 2007.

SHIN, A.R. et al. Characterization and identification of distinct *Mycobacterium massiliense* extracellular proteins from those of *Mycobacterium abscessus*. **J Microbiol.**, v. 48, p. 502-11, 2010.

SHINNICK, T.M.; GOOD, R.C. Mycobacterial taxonomy. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 13, p. 884-901, 1994.

SINGH, A. et al. Identification of a desaturase involved in mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium smegmatis*. **Plos One**, v. 10, p. e0164253, 2016.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal Biochem.**, v. 150, p. 76-85, 1985.

SMITH, B. et al. The OBO Foundry: coordinated evolution of ontologies to support biomedical data integration. **Nat Biotechnol.**, v. 11, p. 1251-55, 2007.

SCHOREY, J.S.; SWEET, L. The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis. **Glycobiology**, v. 18, p. 832–41, 2008.

SOCHOROVÁ, Z. et al. Morphological and proteomic analysis of early stage air–liquid interface biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. **Microbiology**, v. 160, p. 1346-56, 2014.

SOUSA, S. et al. Nontuberculous mycobacteria pathogenesis and biofilm assembly. **Int J Mycobacteriol.**, v. 4, p. 36-43, 2015.

SOUTO, A. S.S. **Avaliação da suscetibilidade de *Mycobacterium massiliense* isolados de surto epidêmico de infecções de sítio cirúrgico em hospitais do Rio de Janeiro frente a desinfetantes**. 2011. 87 p. Tese (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2011.

Standard PN-EN 14348: 2006 (EN 14348: 2005): Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of mycobactericidal activity of chemical disinfectants in the medical area including instrument disinfectants – Test method and requirements (phase 2, step 1).

STEEN, H.; MANN, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 5, p. 699–711, 2004.

STEPHAN, J. et al. Multidrug resistance of a porin deletion mutant of *Mycobacterium smegmatis*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 48, p. 4163-70, 2004.

STEPHAN, J. et al. The growth rate of *Mycobacterium smegmatis* depends on sufficient porin-mediated influx of nutrients. **Mol Microbiol.**, v. 58, p. 714-30, 2005.

SUTCLIFFE, I. C.; HARRINGTON, D. J. Lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*: an abundant and functionally diverse class of cell envelope components. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 28, p. 645-59, 2004.

SVETLÍKOVÁ, Z. et al. Role of porins in the susceptibility of *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium chelonae* to aldehyde-based disinfectants and drugs. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 53, p. 4015-8, 2009.

SWANSON, S. et al. Structural similarities and differences between two functionally distinct SecA proteins, *Mycobacterium tuberculosis* SecA1 and SecA2. **J Bacteriol.**, v. 198, p. 720-30, 2015.

TIMERMAN, A. Micobactérias não-tuberculosas e doenças associadas. In: **Tratado de Infectologia**. 3.ed. Editora Atheneu, 2005.

TIWARI, T.S. et al. Forty years of disinfectant failure: outbreak of postinjection *Mycobacterium abscessus* injection caused by contamination of benzalkonium chloride. **Clin Infect Dis.**, v. 36, p. 954-62, 2003.

TORTOLI, E. et al. Lethal *Mycobacterium massiliense* sepsis, Italy. **Emerg Infect Dis.**, v. 14, p. 984-5, 2008.

TORTOLI, E. et al. Emended description of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* and *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* and designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* comb. nov. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 66, p. 4471-79, 2016.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Procariotos: Domínios *bacteria* e *archaea*. In: **Microbiologia**. 8. ed. Artmed Editora, 2005. p. 324-25.

USLAN, D.Z. et al. Skin and soft tissue infections due to rapidly growing mycobacteria. **Arch Dermatol.**, v. 142, p. 1287-92, 2006.

- VAEREWIJCK, M. J. M. et al. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 29, p. 911-34, 2005.
- VALLEDOR, L.; JORRÍN, J. Back to the basics: Maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses. **J Proteomics.**, v. 74, p. 1-18, 2011.
- VAN KLINGEREN, B.; PULLEN, W. Glutaraldehyde resistant mycobacteria from endoscope washers. **J Hosp Infect.**, v. 25, p. 147-9, 1993.
- VESTER, B.; DOUTHWAITE, S. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 45, p. 1-12, 2001.
- VIANA-NIERO, C. et al. Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. **J Clin Microbiol.**, v. 46, p. 850-5, 2008.
- VIJAYARAGHAVAN, R. et al. Hospital outbreak of atypical mycobacterial infection of port sites after laparoscopic surgery. **J Hosp Infect.**, v. 64, p. 344-7, 2006.
- VILLAR, G. B. et al. Risk Factors for *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* Infection after Laparoscopic Surgery during an Outbreak in Brazil. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v. 36, p. 81-6, 2015.
- VIVEIROS, M.; LEANDRO, C.; AMARAL, L. Mycobacterial efflux pumps and chemotherapeutic implications. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 22, p. 274-8, 2003.
- VRONTOU, E.; ECONOMOU, A. Structure and function of SecA, the preprotein translocase nanomotor. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1694, p. 67-80, 2004.
- WAGNER, D.; YOUNG, L.S. Nontuberculous mycobacterial infections: a clinical review. **Infection**, v. 32, p. 257-70, 2004.
- WALLACE, R.J.; BROWN, B.A.; GRIFFITH, D.E. Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. **Ann Rev Microbiol.**, v. 52, p. 453-90, 1998.

WALTHER, T. C.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. **J Cell Biol.**, v. 190, p. 491–500, 2010.

WANG, M. et al. Label-free mass spectrometry-based protein quantification technologies in proteomic analysis. **Brief Funct Genomic Proteomic**, v. 7, p. 329–39, 2008.

WANG, R.; MARCOTTE, E. M. The proteomic response of *Mycobacterium smegmatis* to anti-tuberculosis drugs suggests targeted pathways. **J Proteome Res.**, v. 7, p. 855-65, 2008.

WASHBURN, M.P., WOLTERS D., YATES, JR. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. **Nat Biotechnol.**, v. 19, p. 242-47, 2001.

WILLIAMS, M.M. et al. Structural analysis of biofilm formation by rapidly and slowly growing nontuberculous mycobacteria. **Appl Environ Microbiol.**, v. 75, p. 2091-8, 2009.

WILSON, R.W. et al. *Mycobacterium immunogenum* sp. nov., a novel species related to *Mycobacterium abscessus* and associated with clinical disease, pseudo-outbreaks and contaminated metalworking fluids: an international cooperative study on mycobacterial taxonomy. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 51, p. 1751-64, 2001.

WISNIEWSKI, J. R. Mass Spectrometry – based proteomics principles, perspectives, and challenges. **Arch Pathol Lab Med.**, v. 132, p. 1566–69, 2008.

WISNIEWSKI, J. R. et al. Universal sample preparation method for proteome analysis. **Nat Methods**, v. 6, p. 359-62, 2009.

YATES, J.R., 3rd. Mass spectral analysis in proteomics. **Annu Rev Biophys Biomol Struct.**, v. 33, p. 297-316, 2004.

YATES, J. R.; RUSE, C. I.; NAKORCHEVSKY, A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. **Annual Rev Biomed Eng.**, v. 11, p. 49–79, 2009.

YERUVA, V.C. et al. The *Mycobacterium tuberculosis* desaturase DesA1 (Rv0824c) is a Ca²⁺ binding protein. **Biochem Biophys Res Com.**, v. 480, p. 29-35, 2016.

ZAMBRANO, M.; KOLTER, R. Mycobacterial Biofilms: a greasy way to hold it together. **Cell**, v. 123, p. 762-64, 2005.

ZHANG, B.; CHAMBERS, M.C.; TABB, D.L. Proteomic parsimony through bipartite graph analysis improves accuracy and transparency. **J Proteome Res.**, v. 6, p. 3549-557, 2007.

ZHANG, F.; XIE, J-P. Mammalian cell entry gene family of *Mycobacterium tuberculosis*. **Mol Cell Biochem.**, v. 352, p. 1-10, 2011.

ZHANG, X. et al. Multidimensional liquid chromatography in proteomics--a review. **Anal Chim Acta.**, v. 664, p. 101-13, 2010a.

ZHANG, Y. et al. Refinements to label free proteome quantitation: how to deal with peptides shared by multiple proteins. **Anal Chem.**, v. 82, p. 2272-81, 2010b.

ZHU, H.; BILGIN, M.; SNYDER, M. Proteomics. **Annu Rev Biochem.**, v. 72, p. 783-812, 2003.

APÊNDICE A (em CD)

Tabela suplementar 1a. Lista de todas as proteínas identificadas (FDR < 1%) no proteoma de *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS nº 00594 (AT)

Legenda: tamanho – tamanho em resíduos de aminoácidos; NSAF (*normalized spectral abundance fator*) – fator de abundância espectral normalizado; cobertura – percentagem de resíduos de aminoácidos identificados em relação ao total de resíduos de uma proteína; score – *ranking* ou classificação da identificação, calculado pelo programa *PatternLab for proteomics* (CARVALHO et al., 2016).

Tabela suplementar 1b. Lista de todas as proteínas identificadas (FDR < 1) no proteoma de *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS CRM 270 (MT).

APÊNDICE B (em CD)

Tabela suplementar 2a. Lista de proteínas diferencialmente abundantes detectadas em ambas as condições biológicas (MT e AT) com significância estatística (FDR <0,05%). Essas proteínas representam os pontos azuis no *volcano plot* (Figura 6).

Tabela suplementar 2b. Lista das proteínas detectadas apenas na condição biológica AT.

Tabela suplementar 2c. Lista das proteínas detectadas apenas na condição biológica MT.