



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Taiane Freitas Medeiros

**Polimorfismos em genes do metabolismo de ácidos micólicos em isolados de
Mycobacterium tuberculosis de Santa Catarina, Sul do Brasil**

Florianópolis

2021

Taiane Freitas Medeiros

**Polimorfismos em genes do metabolismo de ácidos micólicos em isolados de
Mycobacterium tuberculosis de Santa Catarina, Sul do Brasil**

Tese submetida ao Programa de Pós Graduação
em Farmácia da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do título de Doutora em
Farmácia
Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo, Dra.

Florianópolis

2021

Medeiros, Taiane Freitas

Polimorfismos em genes do metabolismo de ácidos micólicos em isolados de Mycobacterium tuberculosis de Santa Catarina, Sul do Brasil / Taiane Freitas Medeiros ; orientador, Maria Luiza Bazzo, 2021.

94 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Tuberculose. 3. Mycobacterium tuberculosis. 4. Ácidos micólicos. 5. Polimorfismos. I. Bazzo, Maria Luiza . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Taiane Freitas Medeiros

**Polimorfismos em genes do metabolismo de ácidos micólicos em isolados de
Mycobacterium tuberculosis de Santa Catarina, Sul do Brasil**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado pela
banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Harrison Magdinier Gomes
Fundação Oswaldo Cruz

Profa. Dra. Jussara Kasuko Palmeiro
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Karin Silva Caumo)
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão
que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Farmácia.

Profa. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna, Dra.
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Profa. Maria Luiza Bazzo, Dra.
Orientadora

Florianópolis, 2021

Este trabalho é dedicado aos meus avós e aos meus queridos pais.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Maria Luiza Bazzo pela valiosa orientação, exemplo de profissionalismo e pelo conhecimento compartilhado nesses anos de laboratório.

À Dra. Mara Cristina Scheffer que não mediu esforços para encontrar os pacientes durante seu doutorado, sem os quais esse trabalho não teria sido possível.

Aos queridos, Mirela e Richard, que contribuíram muito para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular, Sorologia e Microbiologia (LBMMS) Manoela, Marcos, Fernando, Hana, Henrique, Felipe, Alisson, Cida, Renata e Jéssica pela amizade e apoio em todos os momentos. À Juliana, minha coorientada de TCC, pelo auxílio na execução inicial do trabalho.

Aos funcionários do Serviço de Análises Clínicas do Hospital Universitário/UFSC.

À UFSC e ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, pelo conhecimento e formação.

À minha família. Aos meus pais, Rejane e Leonardo, à minha irmã Marcela, aos meus avós, Edite e Ruben (*in memorian*), às minhas tias Renata e Rita (*in memorian*), pelo amor incondicional, incentivo ao estudo e por estarem ao meu lado, me apoiando em todas etapas da minha vida.

Aos amigos Gustavo, Pamela, Cacá, Carla, Alana, Ana Julia, Maick, Iasmim e Giovana pela amizade, apoio e palavras de incentivo. Ao Bruno, meu incansável incentivador.

RESUMO

Mycobacterium tuberculosis, agente causador da tuberculose (TB), uma das doenças infecciosas que mais mortes têm causado no mundo, possui uma parede celular complexa, que contém na sua composição ácidos micólicos (AM), os quais desempenham papel importante no processo de patogênese, virulência e sobrevivência, conferindo aos bacilos proteção frente a ambientes hostis. Os genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de diferentes grupos funcionais de AM se destacam por sua importância em diferentes funcionalidades das micobactérias. Neste estudo, os dados do sequenciamento completo do genoma foram empregados para avaliar mutações em genes relacionados ao metabolismo de AM de *M. tuberculosis* relacionando-as a dados clínicos, epidemiológicos e SIT (*Spoligotype International Type*) de isolados clínicos de pacientes com TB pulmonar de municípios da Grande Florianópolis. As mutações *Rv3057c* Asp112Ala (104/151), *Rv3720* His70Arg (104/151) e *Rv3802c* Val50Phe (105/151) ocorreram em 69% dos isolados e apresentaram associação significativa com a linhagem LAM. O SIT 216/LAM5 (13,2%; 20/151), encontrado com maior frequência, estava associado a mutações nos genes *accD2* Lys23Glu, *kasA* Gly269Ser, *mmaA4* Asn165Ser, *otsB1* Asp617Asn, *Rv3057c* Asp112Ala, *Rv3720* His70Arg, *Rv3802c* Val50Phe e *tgs4* Ala216Glu. Os isolados do SIT 73/T (6,6%; 10/151) apresentaram um padrão de mutações gênicas; as mutações *amiD-Rv3376* 3790075G>A, *fbpA-afbB* 4266941G>A, *echA11* Asn220fs e *otsB2* Ser110Arg ocorreram exclusivamente nesses 10 isolados. Os SITs 20/LAM1, 64/LAM6, 50/H3, 137/X2 e 119/X1 apresentaram relação com mutações específicas. Foi possível observar diferença entre o perfil de mutações relacionadas com SITs da linhagem LAM e SITs das linhagens T, Haarlem e X. Observou-se associação significativa entre o desfecho de tratamento no qual a cultura permaneceu positiva após quatro meses de tratamento (2,6%; 4/151) e as variações *echA11* Asn220fs, *lipR* Pro43Leu, *otsB1* Ala386Thr, *otsB2* Ser110Ar, *rip* Arg351Trgp, *Rv0194* Asp714Glu, *Rv1687c* Gly55Ser, *PE_PGRS33-bacA* 2062805C>G, *glyA1-desA2* 1221912C>A, *Rv2242-fabD* 2516567G>C e *fbpA-afbB* 4266941G>A. Neste estudo, foi possível identificar um repertório amplo de polimorfismos de nucleotídeo único em genes relacionados ao metabolismo de AM em isolados de *M. tuberculosis* e também foi possível descrever, pela primeira vez, a variabilidade que ocorreu entre isolados de diferentes SIT/sublinhagens da Linhagem 4 circulantes na Grande Florianópolis, Santa Catarina.

Palavras-chave: ácidos micólicos; *Mycobacterium tuberculosis*; mutação; linhagem.

ABSTRACT

Tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* is one of the most world's deadliest infectious diseases. The bacterium has a complex cell wall containing mycolic acids (MA), which play an important role in pathogenesis, virulence, and survival by protecting the cell against harsh environments. Studies have shown that genes encoding enzymes involved in MA synthesis are essential to mycobacterial functionality. This study used whole-genome sequencing to evaluate mutations in genes related to MA metabolism in *M. tuberculosis* isolates from pulmonary tuberculosis patients of the Florianópolis Metropolitan Area, Santa Catarina, Brazil, and assessed associations with clinical, epidemiological, and SIT data. The mutations *Rv3057c* Asp112Ala (104/151), *Rv3720* His70Arg (104/151), and *Rv3802c* Val50Phe (105/151) were identified in about 69% of the isolates and were related to the LAM lineage. SIT 216/LAM5 (13.2%, 20/151) had the highest frequency and was associated with the mutations *accD2* Lys23Glu, *kasA* Gly269Ser, *mmaA4* Asn165Ser, *otsB1* Asp617Asn, *Rv3057c* Asp112Ala, *Rv3720* His70Arg, *Rv3802c* Val50Phe, and *tgS4* Ala216Glu. All SIT 73/T isolates (6.6%, 10/151) showed a characteristic and exclusive gene mutation pattern: *amiD* *Rv3376* 3790075G>A, *fbpA-aftB* 4266941G>A, *echA11* Asn220fs, and *otsB2* Ser110Arg. SITs 20/LAM1, 64/LAM6, 50/H3, 137/X2, and 119/X1 were also related to specific mutations. SITs from the LAM lineage differed in mutation profile from those of the T, Haarlem, and X lineages. There was a significant association between fourth-month sputum smear positivity (2.6%, 4/151) and the gene variants *echA11* Asn220fs, *lipR* Pro43Leu, *otsB1* Ala386Thr, *otsB2* Ser110Ar, *rip* Arg351Trp, *Rv0194* Asp714Glu, *Rv1687c* Gly55Ser, *PE_PGRS33-bacA* 2062805C>G, *glyA1-desA2* 1221912C>A, *Rv2242-fabD* 2516567G>C, and *fbpA-aftB* 4266941G>A. It was possible to identify a broad repertoire of single-nucleotide polymorphisms in genes related to MA metabolism in *M. tuberculosis* isolates. This study also described, for the first time, the variability between different SITs/sublineages of Lineage 4 circulating in Florianópolis Metropolitan Area.

Keywords: mycolic acid; *Mycobacterium tuberculosis*; mutation; lineage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência de novos casos de tuberculose no mundo por 100.000 habitantes em 2019.	19
Figura 2. Modelo proposto do envelope celular micobacteriano.	27
Figura 3. Via biossintética de ácidos micólicos em <i>M. tuberculosis</i>	31
Figura 4. Estruturas químicas dos principais ácidos micólicos de <i>M. tuberculosis</i>	32
Figura 5. Análise filogenética do complexo <i>M. tuberculosis</i> e sua distribuição geográfica.....	40
Figura 6. Resultados de <i>Spoligotyping</i> agrupados em família.....	49
Figura 7. Árvore filogenética de máxima verossimilhança para os 151 isolados de <i>M.tuberculosis</i> incluídos no estudo.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfis de spoligotyping dos 151 isolados incluídos no estudo.....	50
Tabela 2. Variação gênica encontrada nos 151 isolados com relação a genes relacionados ao metabolismo de AM.	52
Tabela 3. Mutações intergênicas dos 151 isolados de <i>M. tuberculosis</i> com relação a genes relacionados ao metabolismo de AM.....	56
Tabela 4. Associação entre o SIT 20/LAM1 e mutações encontradas em genes relacionados ao metabolismo de AM.	59
Tabela 5. Associação entre o SIT 216/LAM5 e mutações encontradas em genes relacionados ao metabolismo de AM.	60
Tabela 6. Associação entre o SIT 64/LAM6 e mutações encontradas em genes relacionados ao metabolismo de AM.	61
Tabela 7. Associação entre o SIT 73/T e mutações encontradas em genes relacionados ao metabolismo de AM.	62
Tabela 8. Associação entre o SIT 50/H3 e mutações encontradas em genes relacionados ao metabolismo de AM.	63
Tabela 9. Associação entre o SIT 137/X2 e mutações encontradas em genes relacionados ao metabolismo de AM.	64
Tabela 10. Associação entre desfecho desfavorável e mutações encontradas em genes relacionados ao metabolismo de AM.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Proteína carreadora de acil (do inglês <i>Acyl carrier protein</i>)
AM	Ácidos micólicos
BAAR	Bacilos álcool-ácido resistentes
BRICS	Brasil, Rússia, Índia, China, África do Sul
CoA	Coenzima A
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
DR	<i>Direct Repeat</i>
EMB	Etambutol
FAS	Sintase de ácido graxo (do inglês <i>Fatty Acid Synthetase</i>)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IGRA	<i>Interferon Gamma Release Assay</i>
INH	Isoniazida
IS	Sequência de inserção
LAM	<i>Latin American and Mediterranean</i>
MIRU	<i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PPD	Prova tuberculínica (do inglês <i>Purified Protein Derivative</i>)
PZA	Pirazinamida
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RIF	Rifampicina
SIT	<i>Spoligotype International Type</i>

SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
ST	<i>Shared Types</i>
TB	Tuberculose
TB-MDR	TB multirresistente
TB-XDR	TB extensivamente resistente
TDM	Trealose dimicolato
TMM	Trealose monomicolato
TSA	Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeat</i>
WGS	Sequenciamento Completo do Genoma (do inglês <i>Whole Genome Sequencing</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	Tuberculose	17
2.1.1	Epidemiologia da Tuberculose.....	18
2.1.2	Diagnóstico da Tuberculose.....	19
2.1.2.1	<i>Baciloscopia</i>	20
2.1.2.2	<i>Cultura.....</i>	20
2.1.2.3	<i>Métodos Moleculares</i>	21
2.1.3	Tratamento da Tuberculose	22
2.2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>.....	24
2.3	Ácidos Micólicos em <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.....	26
2.4	Genoma de <i>M. tuberculosis</i>.....	33
2.4.1	Epidemiologia Molecular	34
2.4.1.1	<i>Métodos clássicos de genotipagem.....</i>	35
2.4.1.1.1	RFLP da sequência IS6110.....	35
2.4.1.1.2	MIRU-VNTR	36
2.4.1.1.3	Spoligotyping.....	36
2.4.1.2	<i>Sequenciamento completo do genoma (WGS)</i>	37
2.4.2	Diversidade genética.....	39
2.4.3	Genética dos Ácidos Micólicos.....	41
3	OBJETIVOS	43
3.1	Objetivo Geral	43
3.2	Objetivos Específicos	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1	Aspectos éticos	44

4.2	Amostragem e critérios de inclusão.....	44
4.3	Sequenciamento de genoma completo	45
4.4	Análise Bioinformática.....	45
4.5	Análise Estatística.....	47
5	RESULTADOS.....	48
5.1	Amostragem.....	48
5.2	Descrição da população estudada.....	48
5.3	Análise molecular por <i>Spoligotyping</i>	48
5.4	Análise do sequenciamento completo do genoma	52
6	DISCUSSÃO	66
7	CONCLUSÃO	72
8	PERSPECTIVAS.....	73
	REFERÊNCIAS.....	74

1 INTRODUÇÃO

Entre as doenças infecciosas, a tuberculose (TB) é uma das que mais mortes tem causado no mundo. Trata-se de uma doença infectocontagiosa de caráter crônico, causada por bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, que afeta principalmente os pulmões (PANDOLFI *et al.*, 2007; WHO, 2020). Estima-se que 1,7 bilhão de pessoas estejam infectadas pelo bacilo causador da TB e que no ano de 2019, tenham ocorrido 10,0 milhões de casos novos e 1,4 milhão de mortes devido à doença (WHO, 2020). No Brasil, no mesmo ano, foram diagnosticados 73.864 casos novos e, em 2018, foram registrados 4.490 óbitos (BRASIL, 2020).

M. tuberculosis, principal representante do complexo *M. tuberculosis*, possui uma arquitetura única da parede celular, que consiste em uma camada externa espessa, altamente impermeável, com alto teor de lipídios (BRENNAN; NIKAIDO, 1995; YASSIN, 2011; VILCHÈZE; KREMER, 2017). A parede celular é formada por uma camada de peptidoglicanos ligada covalentemente a arabinogalactanos esterificados em sua porção externa com ácidos micólicos (AM) (BARRERA, 2007; GUENIN-MACÉ; SIMÉONE; DEMANGEL, 2009). Os AM são ácidos graxos α -alquil, β -hidroxi de cadeia longa de alto peso molecular e, dentre os componentes lipídicos, representam componentes essenciais do envelope celular de *M. tuberculosis* (PAWEŁCZYK; KREMER, 2014). Estudos sobre os genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de diferentes grupos funcionais de AM têm destacado a sua importância em diferentes funcionalidades das micobactérias (YUAN *et al.*, 1998; DUBNAU *et al.*, 2000; GLICKMAN; COX; JACOBS, 2000; RAO *et al.*, 2006; PEYRON *et al.*, 2008).

Evidências sugerem que *M. tuberculosis* apresenta pouca diversidade na sequência genômica, porém isolados exibem grandes diferenças na apresentação fenotípica em termos de virulência, resposta imune conferida e transmissibilidade (PETERS *et al.*, 2016). A constituição lipídica da parede celular de *M. tuberculosis*, em especial AM, os quais desempenham papel importante no processo de patogênese, virulência e sobrevivência, conferindo aos bacilos proteção frente a ambientes hostis. Esta micobactéria produz grande variedade de lipídios complexos, incluindo diversos tipos de AM, o que se reflete no número de genes envolvidos no seu metabolismo. Sugere-se que ocorra uma forte seleção em genes que são

importantes para a fisiologia de *M. tuberculosis*, esperando-se, assim, que genes essenciais sejam conservados, como os relacionados ao metabolismo de AM (COLE *et al.*, 1998; PEPPERELL *et al.*, 2013; PORTEVIN *et al.*, 2014). Contudo, considerando que um dos principais medicamentos utilizados no tratamento da TB, a isoniazida, tem como alvo o metabolismo de AM, os genes envolvidos neste metabolismo podem estar sob seleção diversificada (PORTEVIN *et al.*, 2014).

Com a disponibilidade de sequências do genoma de diferentes estirpes de *M. tuberculosis* tornou-se possível realizar comparações de todo o genoma, permitindo a identificação de mutações de genes que se correlacionam com o metabolismo de AM (CUBILLOS-RUIZ; MORALES; ZAMBRANO, 2008; TEN BOKUM *et al.*, 2008; JHINGAN *et al.*, 2016). A abordagem genômica, utilizando análise por sequenciamento completo do genoma (do inglês *Whole Genome Sequencing* - WGS), é uma ferramenta importante que permite realizar essa identificação. Existem poucos dados sobre mutações em genes relacionados ao metabolismo de AM em *M. tuberculosis* e, até o momento, nenhum estudo que correlacione os perfis genômicos a dados clínicos, epidemiológicos e com as sublinhagens.

Dada a importância dos AM na composição da parede celular de *M. tuberculosis*, estudos de epidemiologia genômica que correlacionem esses dados são importantes, pois podem fornecer informações sobre a relação de mutações com desfechos de tratamento e com a variabilidade fenotípica observada entre diferentes sublinhagens. Bem como, nortear estudos em busca de novos alvos para o desenvolvimento de agentes quimioterápicos direcionados contra a síntese dessa estrutura única em *M. tuberculosis*.

Este estudo buscou, pela primeira vez, avaliar mutações em genes relacionados ao metabolismo de AM de *M. tuberculosis* em isolados clínicos de pacientes com TB pulmonar de municípios da Grande Florianópolis e sua relação com dados de epidemiologia genômica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tuberculose

A TB é uma das principais causas de adoecimento e morte da sociedade humana desde a antiguidade. Sendo, atualmente, uma das dez principais causas de morte no mundo (WHO, 2020).

A história da TB tem sido rastreada até a Idade da Pedra, no período paleolítico, há cerca de 3,3 milhões de anos. Alcançou níveis epidêmicos na Europa e na América do Norte nos séculos XVIII e XIX. Devido à sua natureza infecciosa, resposta imunológica complexa, progressão crônica e necessidade de tratamento de longo prazo, a TB sempre foi um grande problema de saúde pública e esteve associada a uma alta taxa de mortalidade ao longo dos séculos. E, embora, tenha diminuído durante o século XX nos países desenvolvidos, continua sendo uma séria ameaça em países de renda média baixa e economias emergentes, especialmente, com o surgimento de estirpes resistentes aos medicamentos utilizados no seu tratamento e à crescente associação com infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (LUCA; MIHAESCU, 2013; PEZZELLA, 2019; WHO, 2019).

A TB é caracterizada como uma doença infectocontagiosa de caráter crônico, causada por bactérias do complexo *M. tuberculosis* (PANDOLFI *et al.*, 2007; WHO, 2019). O pulmão é o órgão mais comumente afetado pela infecção por *M. tuberculosis* com estimativas de envolvimento pulmonar de 79 a 92% em indivíduos com TB ativa, contudo, a infecção pode afetar qualquer tecido (BLOOM *et al.*, 2017; LYON; ROSSMAN, 2017). A transmissão ocorre de forma direta por via aérea, pela inalação de aerossóis contendo no seu interior o bacilo, proveniente de indivíduos com TB pulmonar ativa (indivíduos bacilíferos), por meio de tosse, espirro ou fala (CAMPOS, 2006; LEÃO; PORTAELS, 2007; PANDOLFI *et al.*, 2007; PHILIPS; ERNST, 2012). Os sintomas mais frequentes da TB são tosse persistente produtiva, com muco e eventualmente sangue, febre, sudorese noturna, inapetência, palidez e emagrecimento (GUTIERREZ *et al.*, 2001; BRASIL, 2011a).

2.1.1 Epidemiologia da Tuberculose

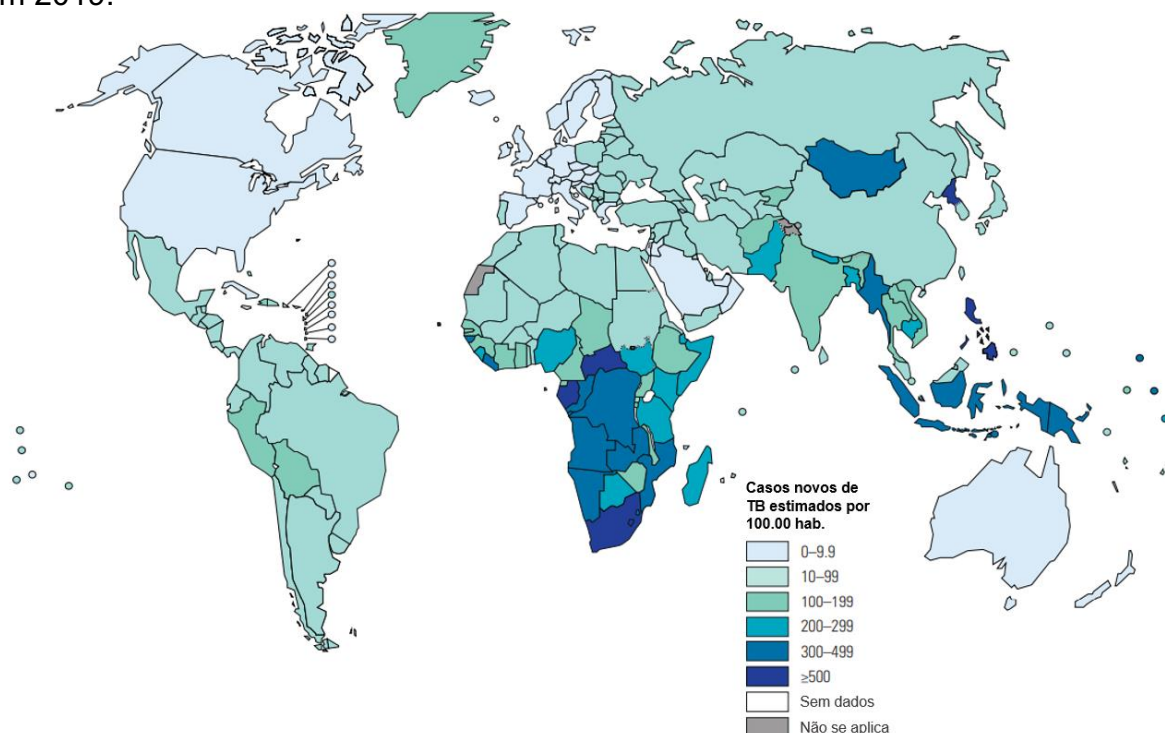
Entre as doenças infecciosas, a TB é uma das que mais têm causado mortes no mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 1,7 bilhão de pessoas estejam infectadas pelo bacilo causador da TB e que no ano de 2019, tenham ocorrido 10,0 milhões de casos novos, correspondendo a uma taxa de incidência de 130/100.000 habitantes, e, destes, 815.000 eram soropositivos para HIV. Estima-se, também, que 1,4 milhão de mortes tenham ocorrido devido à doença, desses 208.000 eram HIV soropositivos. A taxa de incidência de TB varia entre os países, as menores taxas são observadas principalmente em países de alta renda, como a maioria dos países da Europa Ocidental, Estados Unidos, Canadá, Austrália e Nova Zelândia. Nesses países a incidência é menor que 10/100.000 habitantes (Figura 1). A maior parte do número de casos estimados em 2019 ocorreu na Região do Sudeste Asiático, Região Africana e Região do Pacífico Ocidental, somando 87% dos casos; proporções menores ocorreram na Região do Mediterrâneo Oriental (8,2%), Região das Américas (2,9%) e Região da Europa (2,5%). Na Região das Américas, embora a maior parte dos países apresente taxas menores que 100/100.000 habitantes (Figura 1), a incidência de TB está aumentando lentamente, devido a uma tendência de aumento no Brasil. O Brasil ocupa o 19º lugar entre os 30 países identificados como detentores da maior carga de TB, que juntos somam 86,4% dos casos relativos à incidência anual. O Brasil faz parte dos países do BRICS que, juntamente com a Rússia, Índia, China e África do Sul, correspondem a mais de 40% da carga global de TB em incidência e mortes e aproximadamente 58% da carga global de resistência aos fármacos anti-TB (WHO, 2020).

No Brasil, em 2019, foram diagnosticados 73.864 casos novos, o que corresponde a uma taxa de incidência de 35,0/100.000 habitantes, 13.610 casos pulmonares de retratamento e, em 2018, foram registrados 4.490 óbitos (2,2 óbitos/100.000 hab.) em decorrência da TB. Uma tendência de queda do coeficiente de incidência da TB foi observada no país entre os anos de 2010 e 2016, contudo, este coeficiente aumentou nos anos de 2017 e 2018, em relação ao período anterior (BRASIL, 2020).

No Estado de Santa Catarina (SC), foram registrados 1695 casos novos de TB em 2019, destes 85,1% eram casos de TB pulmonar. O estado encontra-se entre

aqueles com as mais baixas taxas de incidência de TB, 23,7/100.000 habitantes, porém alguns municípios apresentam taxas iguais e/ou superiores às do Brasil. É o caso da capital do estado, Florianópolis, que apresenta taxa de 44,5/100.000 habitantes (BRASIL, 2020).

Figura 1. Incidência de novos casos de tuberculose no mundo por 100.000 habitantes em 2019.



Fonte: Adaptado de WHO, 2020.

Estima-se que no mundo, aproximadamente, 362.700 pessoas tenham desenvolvido TB multirresistente (TB-MDR) e, dessas, uma média de 6,0 % tiveram TB extensivamente resistente (TB-XDR) (WHO, 2020).

2.1.2 Diagnóstico da Tuberculose

O diagnóstico rápido e o tratamento dos casos novos de TB, que em sua maioria são suscetíveis aos medicamentos usados no tratamento de primeira escolha, constituem a essência do controle da TB, curando o paciente e interrompendo a cadeia de transmissão da doença (UPLEKAR *et al.*, 2015; SOTGIU *et al.*, 2016).

O diagnóstico da TB é realizado por exame clínico, que está embasado nos sintomas relatados pelo paciente e no exame físico; exame radiológico de tórax, no qual os diferentes achados apontam para a suspeita de doença ativa ou doença passada e, também, o tipo e a extensão do comprometimento pulmonar; testes imunológicos (prova tuberculínica - PPD e o testes do tipo IGRA - *Interferon Gamma Release Assay*), baseados na resposta imune contra o bacilo da TB, que podem indicar probabilidade de um indivíduo ter a infecção latente; e pelo diagnóstico laboratorial, que pode ser realizado por baciloscopia, cultura e/ou teste rápido molecular, confirmando o diagnóstico de TB (BURRIL, 2007; WHO, 2011; CDC, 2014; DE KEYSER, DE KEYSER, DE BAETS, 2014; CAMPBELL *et al.*, 2015; BRASIL, 2019).

2.1.2.1 Baciloscopia

Considerando o tempo necessário para crescer as culturas de escarro, a técnica mais rápida e fácil de diagnosticar a TB pulmonar é a baciloscopia, a qual se baseia na pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) em esfregaços de amostras clínicas, que, no Brasil, são geralmente corados pelo método Ziehl-Neelsen. Trata-se de uma metodologia simples, rápida e de baixo custo (BRASIL, 2008; BRASIL, 2009; WHO, 2011; DESIKAN, 2013), a qual permite estimar a quantidade de bacilos presente na amostra (CHERIAN, THOMAS, 2011; WILDNER *et al.*, 2011). Essa metodologia é importante, pois possibilita o acompanhamento do tratamento, o que irá determinar se a terapia está sendo eficiente (BRASIL, 2009). A principal desvantagem dessa metodologia é a sensibilidade limitada, uma vez que, o número mínimo de BAAR necessário para produzir um resultado positivo é estimado em 5000 bacilos/mL de amostra. Nos casos em que o número de bacilos é inferior, estima-se em 10% a chance de se observar BAAR (WHO, 2006b; BRASIL, 2008; BRASIL, 2011a; CHERIAN, THOMAS, 2011; PARSONS *et al.*, 2011).

2.1.2.2 Cultura

Para realizar o diagnóstico de TB, a cultura é considerada o método padrão-ouro. Essa metodologia permite a multiplicação e o isolamento de BAAR, a partir da

semeadura da amostra clínica, em meios de cultura específicos para micobactérias, permitindo, também, a posterior identificação da espécie de micobactéria isolada, realização do teste de sensibilidade a antimicrobianos e estudos epidemiológicos (WHO, 2006; BRASIL, 2008; BRASIL, 2011b; CHEGOU *et al.*, 2011). É um método de elevada sensibilidade no diagnóstico da TB pulmonar, sendo capaz de detectar a partir de 10 a 100 bacilos/mL na amostra (BRASIL, 2008; WHO, 2010; BRASIL, 2011a). Os métodos clássicos de cultura de micobactérias utilizam a semeadura da amostra em meios de cultura sólidos a base de ovo. São métodos de baixo custo, que apresentam um índice de contaminação menor, no entanto, o tempo de detecção do crescimento bacteriano nesse meio varia de 14 a 30 dias e pode se estender por até oito semanas, sendo essa a sua principal desvantagem como metodologia para diagnóstico de micobactérias (CHENG; YEW; YUEN, 2005; WHO, 2006; BRASIL, 2011a). O desenvolvimento da cultura líquida possibilitou agilizar o tempo de crescimento do bacilo, sendo essa cultura mais rápida e mais sensível do que a convencional, em meio sólido (CHIEN *et al.*, 2000; TORTOLI, PALOMINO, 2007; BATTAGLIOLI *et al.*, 2014). Sistemas automatizados de cultura líquida diminuem o tempo de identificação para aproximadamente 14 dias (TORTOLI, PALOMINO, 2007; BRASIL, 2008; PARSONS *et al.*, 2011; BATTAGLIOLI *et al.*, 2014; BRASIL, 2020).

2.1.2.3 Métodos Moleculares

Devido ao crescimento lento, o complexo *M. tuberculosis* foi um dos primeiros grupos de microrganismos a se beneficiar com a introdução do diagnóstico molecular através de metodologias que promovem a amplificação de ácidos nucleicos, como a reação em cadeia da polimerase (PCR). Essa técnica baseia-se na amplificação enzimática de uma sequência específica de DNA (TAKAHASHI, TAMURA, TAKASU, 2012). Como vantagem, a utilização da PCR no diagnóstico da TB fornece resultados com sensibilidade superior aos da baciloscopia e em um tempo menor que a cultura, especialmente em casos paucibacilares (WILSON, 2011; LIRA *et al.*, 2012). Os alvos moleculares mais utilizados são a sequência de inserção IS6110, o gene 16S rRNA e o gene da proteína MPB64/MTP64 (MEHTA *et al.*, 2012).

A OMS passou a recomendar, em 2010, o uso do sistema GeneXpert MTB / RIF (Cepheid Inc., Sunnyvale, Califórnia, EUA) para programas nacionais de TB em países em desenvolvimento, como parte da Estratégia Global de Prevenção da TB pós 2015. No Brasil, ele foi implementado na rede pública do país em 2014 (BRASIL, 2019). Esse sistema automatizado baseia-se na metodologia de PCR em tempo real que utiliza sondas de hidrólise do tipo *molecular beacons* para a detecção de *M. tuberculosis* e resistência à rifampicina. É um teste rápido e de fácil manuseio, os resultados são obtidos em duas horas, requer o mínimo de instalações de biossegurança e tem uma alta sensibilidade em TB. Contudo, este método não é recomendado para monitoramento do tratamento. Quando comparado com a cultura, que é o padrão de referência, o Xpert MTB / RIF apresenta sensibilidade e especificidade abaixo do ideal (particularmente entre indivíduos com baciloscopia negativa e pessoas vivendo com HIV) (FRIEDRICH *et al.*, 2013; BOYLES *et al.*, 2014; WHO, 2014a; WHO, 2020).

Em 2017, a OMS avaliou e recomendou um ensaio de próxima geração, o Xpert® MTB / RIF Ultra (chamado de “Xpert Ultra”). Esse ensaio apresenta sensibilidade aprimorada para casos de TB pulmonar com baciloscopia negativa (CHAKRAVORTY *et al.*, 2017; DORMAN *et al.*, 2018), em pacientes HIV soropositivos (DORMAN *et al.*, 2018), em casos de TB extrapulmonar (WU *et al.*, 2019) e em pacientes pediátricos, especialmente HIV soropositivos (SABI *et al.*, 2018). Esse ensaio utiliza a mesma plataforma GeneXpert® do Xpert MTB / RIF (WHO, 2020).

2.1.3 Tratamento da Tuberculose

O Brasil, buscando alcançar desfechos favoráveis, vem desenvolvendo diversas ações com recomendações para implementação de estratégias assistenciais que favoreçam o estabelecimento do vínculo e a adesão visando o alcance de um diagnóstico precoce e tratamento oportuno, e conseqüentemente, prevenção da TB droga resistente (BRASIL, 2020). Mundialmente, entre os 30 países com alta carga de TB, o Brasil é um dos países que alcançou melhores coberturas de tratamento (> 80%) (WHO, 2020).

No Brasil, o tratamento para TB é feito na rede pública de saúde e fornecido gratuitamente pelo Ministério da Saúde. O esquema padrão de tratamento para TB pulmonar e extrapulmonar sensível (casos novos e retratamento) é realizado com a combinação de quatro fármacos – isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA) e etambutol (EMB) – e tem duração de seis meses. O esquema é realizado em duas fases: a primeira é a fase intensiva, com dois meses de duração, na qual são administrados os quatro fármacos; e a segunda é a fase de manutenção que dura quatro meses, na qual administram-se INH e RIF (BRASIL, 2011a; BRASIL, 2019).

Dentre os fármacos de primeira linha utilizados no tratamento da TB, a INH e a RIF são os que possuem maior poder bactericida, diminuindo rapidamente a transmissibilidade entre os indivíduos. Esses dois fármacos são ativos em todas as populações bacilares sensíveis (intracavitárias, em granulomas ou intracelulares) (CAMPOS, 2007; BRASIL, 2011a).

A RIF, um derivado semissintético da rifamicina, foi introduzida como um medicamento anti-TB em 1972. Esse fármaco atua bloqueando a transcrição, inibindo a síntese de RNA. Inibe especificamente a RNA polimerase dependente de DNA da bactéria sensível, cessando a síntese de proteínas da célula bacteriana. É o fármaco com maior poder esterilizante nas lesões caseosas, sendo essencial, na redução da ocorrência de recidiva da doença (BRASIL, 2011a; UNISSA; HANNA, 2017).

A INH é utilizada desde 1952. Apresenta em sua estrutura um anel piridínico e um grupo hidrazida, componentes essenciais para a alta atividade contra *M. tuberculosis*. Tem função bactericida sobre os bacilos de multiplicação rápida, mas tem ação restrita sobre os bacilos de crescimento lento (geralmente intracelulares) e aqueles de multiplicação intermitente (geralmente extracelulares). A INH é um pró fármaco que é ativado por uma enzima codificada pelo gene *katG*, a catalase peroxidase KatG. Uma vez ativo, gera espécies reativas de oxigênio e radicais orgânicos reativos, que atacam múltiplos alvos no bacilo da TB. O principal alvo da inibição é a via de síntese de AM da parede celular, onde a enoil ACP redutase (InhA) foi identificada como o alvo da inibição da INH (WINDER; COLLINS, 1970; BANERJEE et al., 1994; ZHANG, 2005).

A PZA começou a ser utilizada no tratamento da TB em 1980. Desde então, tem desempenhado um papel único na redução da duração do tratamento de um período de 9 a 12 meses para 6 meses, pois atua na eliminação dos bacilos

persistentes e na esterilização das lesões, uma vez que esse fármaco é ativo somente em meio ácido (no interior dos macrófagos), o que não é adequado para a ação de outros medicamentos anti-TB (BRASIL, 2011a; UNISSA; HANNA, 2017).

O EMB, utilizado no tratamento da TB desde 1966, interfere na biossíntese de arabinogalactano, principal polissacarídeo da parede celular micobacteriana. Ele inibe a ação da enzima arabinosil transferase codificada pelo gene *embB*. Essa enzima atua na polimerização de arabinose para arabinogalactano. O EMB é um fármaco bacteriostático de baixa potência utilizado para prevenir a emergência de bacilos resistentes (TAKAYAMA; KILBURN, 1989; WOLUCKA *et al.*, 1994; TELENTI *et al.*, 1997; ZHANG, 2005; BRASIL, 2011a).

Ao iniciar o tratamento, a carga bacilar diminui rapidamente, o que se correlaciona com infectividade reduzida. A baciloscopia continua sendo uma medida importante para avaliar a resposta ao tratamento. E, embora o tratamento diretamente observado, com duração de seis meses com medicamentos de primeira linha, tenha o objetivo de impedir o surgimento de resistência aos medicamentos em casos de suscetibilidade aos fármacos (NATHANSON *et al.*, 2006; WATANABE *et al.*, 2016) a não conversão da baciloscopia está associada a resultados mal sucedidos de tratamento, incluindo o abandono e falha do tratamento (MLOTSHWA *et al.*, 2016).

Em SC, foram observadas altas taxas de não conversão da baciloscopia e abandono do tratamento. Na população prisional, em aproximadamente 62% dos casos avaliados não ocorreu conversão da baciloscopia após os dois primeiros meses de fase intensiva do tratamento (MEDEIROS *et al.*, 2017) e na população geral, em 17% dos casos ocorreu abandono de tratamento (NOGUEIRA *et al.*, 2016).

2.2 *Mycobacterium tuberculosis*

Em 1882, Robert Koch descobriu o agente causador da TB, uma doença causada por bactérias que compõem o complexo *Mycobacterium tuberculosis*. O complexo é composto por *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. suricattae*, *M. mungi*, *M. orygis*, e tem como seu principal representante *M. tuberculosis* (KOCH, 1882; van INGEN *et al.*, 2012; CDC, 2013; COSCOLLA *et al.*, 2013; EUZEBY, 2014a). Pertencem à família *Mycobacteriaceae*, subordem *Corynebacterineae*, ordem *Actinomycetales*, subclasse

Actinobacteridae, classe *Actinobacteria* e domínio *Bacteria* (PANDOLFI *et al.*, 2007; EUZEBY, 2014b).

M. tuberculosis é um bacilo reto ou ligeiramente curvo, imóvel, não esporulado, não encapsulado, que mede de 1 a 10 µm de comprimento por 0,2 a 0,6 µm de largura. É um patógeno aeróbio estrito que necessita de oxigênio para crescer e se multiplicar, apresenta multiplicação lenta com um tempo de geração perto de 24 horas. Por ser capaz de sobreviver e de se multiplicar no interior de células fagocitárias, é considerado um microrganismo intracelular facultativo, de virulência variável (CAMPOS, 2006; PANDOLFI *et al.*, 2007; WHO, 2015). *M. tuberculosis* praticamente não se cora pela coloração de Gram devido a suas características tintoriais, sendo coradas pelo método de Ziehl-Neelsen que utiliza a carbolfucsina, o que confere coloração vermelha às micobactérias (FOULDS; O'BRIEN, 1998; ROSEMBERG; TARANTINO, 2002; VILCHÈZE; KREMER, 2017).

O bacilo apresenta características tintoriais distintas das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas devido à arquitetura única da sua parede celular. A maioria dos lipídeos micobacterianos são constituintes do envelope celular, o que fornece uma barreira de permeabilidade extraordinariamente eficiente a compostos nocivos, tornando as micobactérias resistentes intrinsecamente a muitos medicamentos (BRENNAN; NIKAIDO, 1995). A parede celular consiste em uma camada externa espessa, altamente impermeável, com alto teor de lipídios (40 - 60%) (YASSIN, 2011; VILCHÈZE; KREMER, 2017). É formada por uma camada de peptidoglicano ligada covalentemente a um polissacarídeo ramificado, o arabinogalactano, esterificado em sua porção externa com ácidos graxos de alto peso molecular, os AM (BARRERA, 2007; GUENIN-MACÉ; SIMÉONE; DEMANGEL, 2009), os quais são orientados paralelamente uns aos outros e perpendiculares ao plano do envelope celular. A estrutura e composição da parede celular têm influência direta na viabilidade bacteriana (HETT; RUBIN, 2008) e na interação com a célula hospedeira (BRENNAN, 2003). A camada lipídica confere às micobactérias resistência à descoloração por álcool-ácido, caráter hidrofóbico, resistência a antimicrobianos e a diversos agentes químicos, capacidade de formar biofilme e propriedades imunológicas importantes (ROSEMBERG, TARANTINO, 2002; BARRERA, 2007). A estrutura da parede celular também desempenha papel crucial no processo de patogênese, virulência e

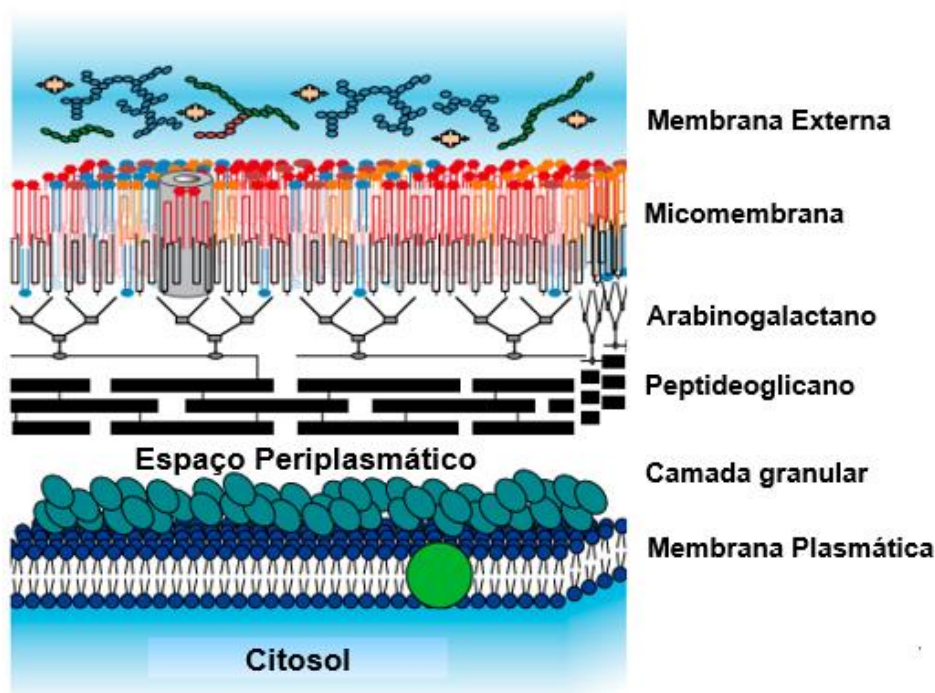
sobrevivência, conferindo aos bacilos proteção frente a ambientes hostis (YASSIN, 2011; VILCHÈZE; KREMER, 2017).

2.3 Ácidos Micólicos em *Mycobacterium tuberculosis*

Dentre os componentes lipídicos, os AM são os ácidos graxos principais e específicos, que representam componentes essenciais do envelope celular de *M. tuberculosis*. Na parede de *M. tuberculosis*, os AM estão ligados covalentemente a arabinogalactanos, o polissacarídeo que, juntamente com o peptidoglicano, forma o esqueleto insolúvel da parede celular (BARRY *et al.*, 1998; PAWEŁCZYK; KREMER, 2014), também são encontrados como trealose monomicolatos (TMM), trealose dimicolatos (TDM) e hidróxi ácidos livres (MINNIKIN *et al.*, 2002; VERSCHOOR; BAIRD; GROOTEN, 2012). Essas formas, presumivelmente desempenham um papel crucial na arquitetura e impermeabilidade do envelope celular, participando dos dois folhetos da membrana externa micobacteriana, também chamada de micomembrana (Figura 2) (HOFFMANN *et al.*, 2008; SANI *et al.*, 2010; MARRAKCHI; LANÉELE; DAFFÉ, 2014).

AM são ácidos graxos α -alquil, β -hidróxi de cadeia longa de alto peso molecular. Estruturalmente, distinguem-se nos AM duas cadeias hidrocarbonadas: uma cadeia alquil curta (C22 a C24) chamada cadeia α (colocada na posição α de acordo com o grupo funcional ácido carboxílico) e um meroaldeído de cadeia longa (C42 a C62), a cadeia meromicólica (parte da molécula que vai do metil terminal ao átomo de carbono que contém o grupo hidróxila). Na posição proximal da cadeia meromicólica, geralmente há um anel de ciclopropano, e na posição distal observa-se outro anel de ciclopropano, bem como grupos funcionais hidrófilicos: metoxi e ceto (KOWALSKI *et al.*, 2014; PAWEŁCZYK; KREMER, 2014). Todas as micobactérias sintetizam AM, mas somente micobactérias patogênicas (por exemplo, *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. bovis*) produzem quantidades significativas de AM com anéis de ciclopropano (BARRY *et al.*, 1998; BARKAN *et al.*, 2010).

Figura 2. Modelo proposto do envelope celular micobacteriano.



A micomembrana corresponde à barreira de permeabilidade. A camada externa é composta por proteínas, glicanos e pequena quantidade de lipídios. O folheto interno é formado por um arranjo paralelo de cadeias AM (em preto) ligadas a arabinogalactanos que estão ligados covalentemente aos peptidoglicanos; o folheto interno da micomembrana é composto de lipídios livres que incluem dimicolato de trealose - TDM (em vermelho), monomicolato de trealose - TMM (em laranja), vários glicolipídios (em marrom) e fosfolipídios (em azul). A camada granular acima da membrana plasmática é composta de proteínas; essas proteínas podem precipitar em decorrência do tratamento das bactérias antes da observação por microscopia eletrônica de transmissão e produzir uma aparência mais espessa para o folheto externo da membrana plasmática. Fonte: Adaptado de MARRAKCHI; LANÉELE; DAFFÉ, 2014.

A biossíntese de AM, que ocorre no citoplasma, envolve duas vias distintas, denominadas sintases de ácidos graxos tipos I e II (FAS I e FAS II). A FAS-I, do tipo eucariótico, catalisa a síntese de novos ácidos graxos a partir de acetil-CoA. Em contraste, a FAS-II é semelhante aos sistemas encontrados em bactérias, parasitas do filo Apicomplexa e plantas e é composto por quatro enzimas dissociáveis que agem de forma sucessiva e repetitiva para alongar a cadeia acil crescente (COLE *et al.*, 1998).

A via biossintética de AM pode ser considerada composta por quatro subvias: (A) produção de malonil-CoA, (B) via FAS-I, (C) via FAS-II e (D) condensação dos produtos de FAS-II e FAS-I em ácido alfa- (D1), metoxi- (D2) e ceto-micólicos (D3) (Figura 3). FAS-I e FAS-II são dependentes da produção de malonil-CoA e têm os seus produtos convertidos em diferentes AM na subvia D (RAMAN RAJAGOPALAN; CHANDRA, 2005; TAKAYAMA; WANG; BESRA, 2005; RAMAN; RAJAGOPALAN; CHANDRA, 2007).

A parte inicial da via utiliza as vias gerais de biossíntese de ácidos graxos observadas na maioria dos organismos. O alongamento dos ácidos graxos depende da disponibilidade de ACP e malonil-CoA, a holoAcpM. A transacilase malonil:AcpM, a enzima FabD, gera malonil-AcpM (KREMER et al. 2001). Em seguida, a FabH (β -cetoacil ACP sintase) catalisa uma reação de condensação dos iniciadores C14-CoA de FAS I com malonil-AcpM (CHOI et al., 2000). O FAS-I micobacteriano é bimodal e, além de gerar ácidos graxos C18, também sintetiza ácidos graxos C24-26 (BLOCH, 1977). O produto formado é direcionado para a via FAS II (BHATT et al. 2007). Ao contrário das sintases de tipo II de outras bactérias, a FAS II micobacteriana é incapaz de realizar síntese de ácidos graxos do início a partir da acetil-CoA; então, ela alonga os acil-CoAs de cadeia média, previamente sintetizados pelo FAS I, para gerar cadeias meromicolil-ACP longas. Propõe-se que o ácido graxo C20 seja o ponto de partida onde o sistema FAS-II assume a síntese do segmento mero de cadeia longa, dos metoxi- e ceto-AM (RAMAN RAJAGOPALAN; CHANDRA, 2005; TAKAYAMA; WANG; BESRA, 2005; RAMAN; RAJAGOPALAN; CHANDRA, 2007; COXON *et al.*, 2013; TSAI *et al.*, 2017).

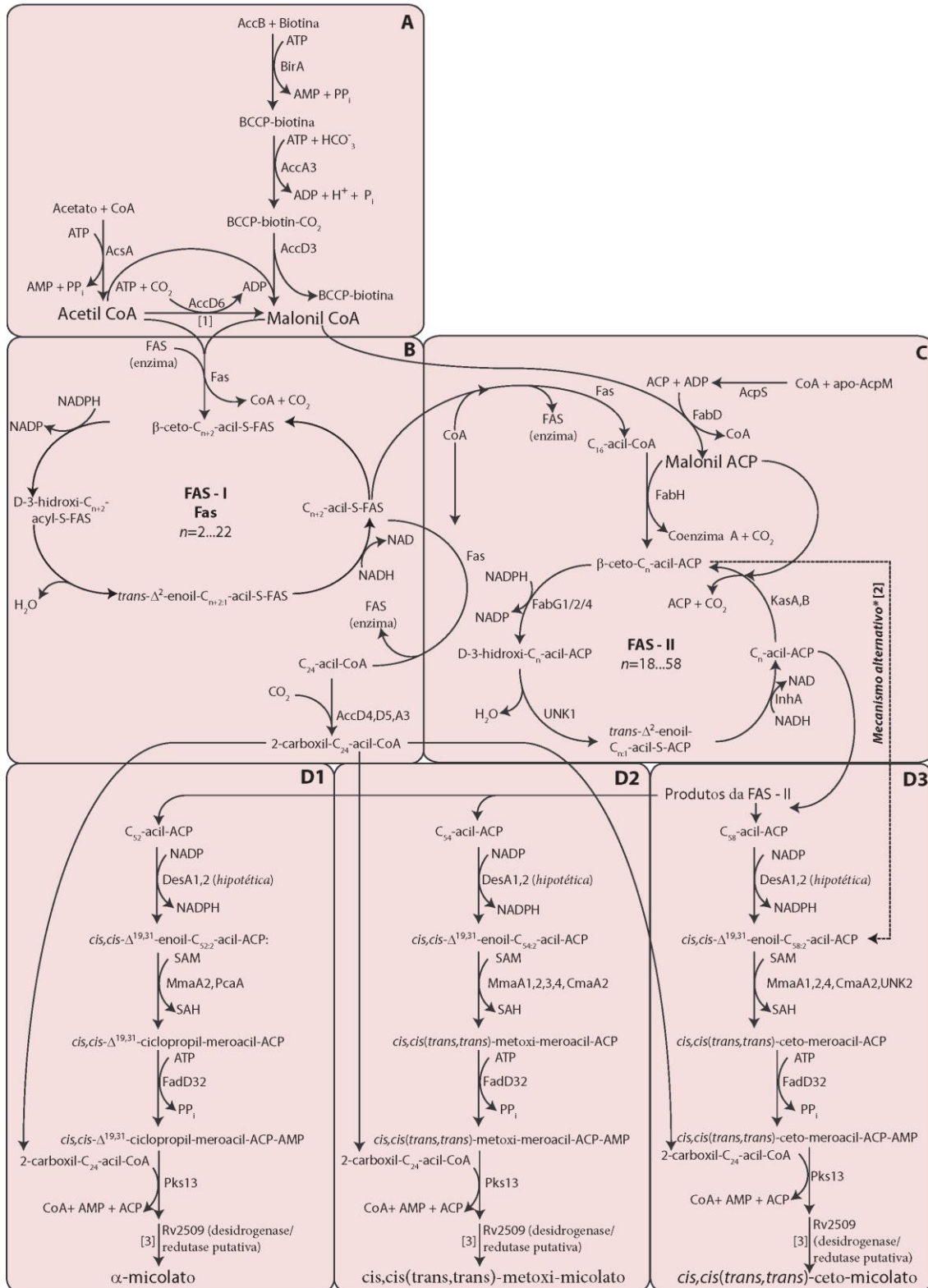
Na via FAS II, ocorrem ciclos de reações de ceto-redução, desidratação e enoilredução, as quais são catalisadas por MabA (FabG1), uma β -cetoacil-AcpM redutase (MARRAKCHI *et al.*, 2002); HadAB / BC, uma β hidroxiacil-AcpM hidratase (SACCO *et al.*, 2007); InhA, uma enoil-AcpM redutase (BANERJEE *et al.*, 1994), respectivamente. Em FAS II, ocorrem ciclos sucessivos, nos quais a reação de condensação de FabH é substituída pela ação de KasA e KasB, duas β -cetoacil sintases (SCHAEFFER *et al.*, 2001; KREMER *et al.*, 2002a). A cadeia acil ligada ao AcpM é estendida por duas unidades de carbono em cada ciclo, formando um meromicolato de cadeia longa saturado de C42-C62, que pode sofrer modificações como adição de grupos metoxi e ceto e ciclopropanação, introdução do anel proximal

de cis-ciclopropano em metoxi- e ceto-AM, introdução do grupo metil no ramo proximal e anel trans-ciclopropano em meroácidos trans-oxigenados (DUBNAU *et al.*, 2000; GLICKMAN *et al.*, 2000; GLICKMAN, 2003; BARKAN *et al.*, 2010). A cadeia de meromicolato é ativada por uma ligase de acil-AMP graxo, a FabD32 (TRIVEDI *et al.*, 2004), assim, a ligação do meromicolil-AMP ao éster α -alquil-CoA ocorre pela ação da Pks13, gerando um α -alquil- β -ácido ceto-micólico (GANDE *et al.*, 2004; PORTEVIN *et al.*, 2004), uma família de metiltransferases dependentes de S-adenosil-metionina que modificam AMs do envelope celular com ramificação metil e anéis de ciclopropano (YUAN; BARRY III, 1996; BARKAN *et al.*, 2010). A metiltransferase MmaA2 é necessária para a introdução do anel distal de ciclopropano da alfa-AM (GLICKMAN, 2003) e a metiltransferase MmaA4 introduz a ramificação metil e grupo hidroxila adjacente na insaturação cis distal. Mostrou-se que a deleção do gene *mmaA4* inibiu a síntese de ambos, os metoxi- e os ceto-AMs. (ALAHARI *et al.*, 2009; COXON *et al.*, 2013).

Nos estágios finais na síntese da parede celular de *M. tuberculosis* ocorre o transporte e a ligação de AM recentemente sintetizados ao complexo peptidoglicano-arabinogalactano da parede celular e a formação de TDM (TAKAYAMA; WANG; BESRA, 2005). Inicialmente, há a formação de TMM pela transferência de um grupo micolil de micolil-Pks13 para D-manopiranosil-1-fosfoheptaprenol pela ação de uma micoliltransferase (BESRA *et al.*, 1994), em seguida outra micoliltransferase transfere o micolil de micolil-D-manopiranosil-1-fosfoheptaprenol para trealose-6-fosfato formando TMM-fosfato. Após a remoção do fosfato, o TMM é transportado para fora da célula através de uma família de bombas de efluxo (proteínas de membrana micobacteriana grandes - MmpL) (TAKAYAMA; WANG; BESRA, 2005; GRZEGORZEWICZ *et al.*, 2012; VARELA *et al.*, 2012). E, por fim, o complexo de antígeno 85 de micoliltransferase (FbpA, FbpB e FbpC) realiza a ligação da porção de AM da TMM ao arabinogalactano (JACKSON *et al.*, 1999). O complexo Ag85 também catalisa a formação de TDM, a partir de duas moléculas de TMM, liberando trealose (TAKAYAMA; WANG; BESRA, 2005). TDM, ou "fator de corda", está relacionado à patogenicidade de *M. tuberculosis* (RAMAN RAJAGOPALAN; CHANDRA, 2005; TAKAYAMA; WANG; BESRA, 2005; RAMAN; RAJAGOPALAN; CHANDRA, 2007; COXON *et al.*, 2013; TSAI *et al.*, 2017).

M. tuberculosis produz três classes principais de AM derivadas de diferentes modificações enzimáticas da cadeia principal meromícólica de ácidos graxos: alfa, metoxi e ceto-AM, conforme apresentado na Figura 4. Os alfa-AM não possuem nenhuma funcionalidade de oxigênio diferente do grupo β -hidroxil, mas possuem dois anéis de ciclopropano, sendo assim, diferentes dos ácidos micólicos oxigenados (metoxi- e ceto-AM). A caracterização bioquímica de ácidos micólicos em culturas de células de *M. tuberculosis* H37Rv indicam claramente que alfa-AM é o AM predominante e compreende até 49% dos micolatos na parede celular, enquanto metoxi- e ceto-micolatos estão presentes em menores quantidades, 27% e 24%, respectivamente. O alfa-AM é um ácido graxo cis, cis-diciclopropil. Existem duas variações estruturais deste AM, dependendo da fonte. Estas variações estão no comprimento do grupo alquilo terminal e no número de grupos metileno entre os anéis ciclo-ciclopropano e o grupo carboxil. Os AM oxigenados possuem modificações polares que contêm funções de oxigênio na porção distal da cadeia de meromícólica, ao passo que as modificações apolares, ou seja, anéis de ciclopropano e insaturações, são encontradas tanto no grupo proximal (mais próximo do grupo β -hidroxil) quanto na posição periférica da cadeia. Além das diferenças na estrutura química, há diferenças significativas na conformação e na estrutura espacial (BARRY *et al.*, 1998; WATANABE *et al.*, 2001; BARKAN *et al.*, 2010; KOWALSKI *et al.*, 2014; PAWEŁCZYK; KREMER, 2014; PORTEVIN *et al.*, 2014). Tanto metoxi-AM quanto ceto-AM possuem subclasses, as quais são caracterizadas pela presença de anéis de cis-ciclopropano ou grupos trans-ciclopropano com uma ramificação metil adjacente, sendo o primeiro predominante em metoxi-AM e o último em ceto-AM (WATANABE *et al.*, 2001; WATANABE *et al.*, 2002; GROENEWALD *et al.*, 2014).

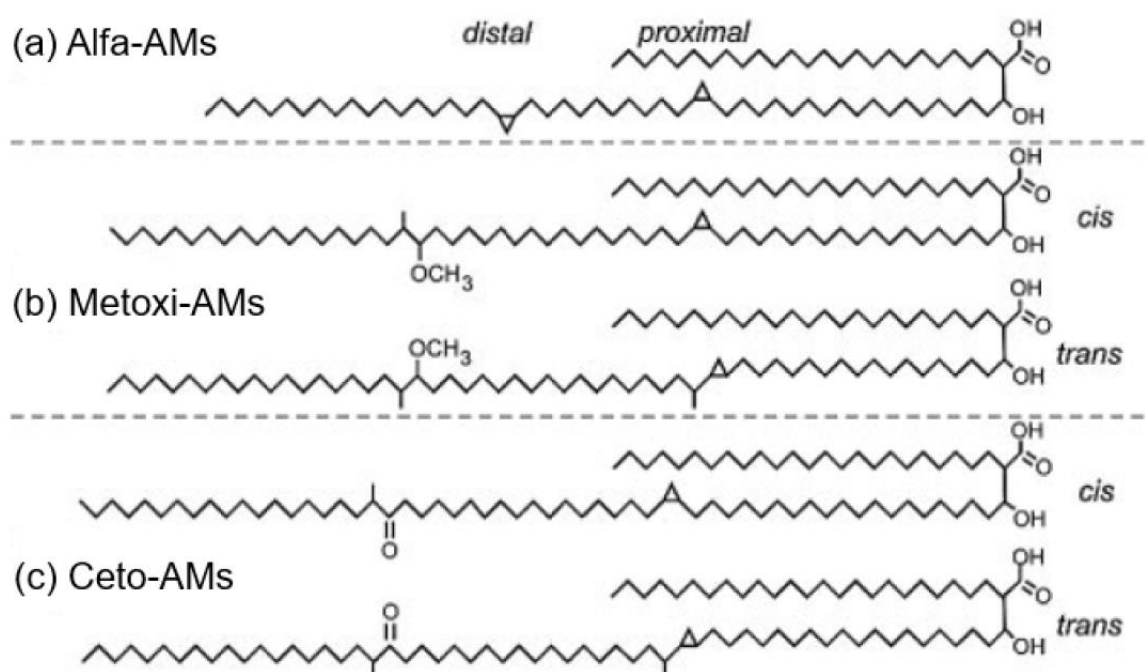
Figura 3. Via biossintética de ácidos micólicos em *M. tuberculosis*.



A figura é composta por quatro partes principais: A, B, C e D {D1, D2, D3}. Os metabólitos principais são indicados em letras de tamanho maior. As proteínas que catalisam cada reação são indicadas à direita das setas de reação. A biossíntese de AM pode ser considerada como composta por quatro subcaminhos: (A) produção de acetil e malonil CoA, (B) ácido graxo

sintase-I (FAS-I) via, (C) ácido graxo sintase-II (FAS-II) via, e (D) condensação de Produtos FAS-II e FAS-I em α - (D1), metoxi-(D2) e ácidos ceto-micólicos (D3). FAS-I e FAS-II (subvias B e C) são dependentes sobre a produção de malonil CoA (produzido em A). Os produtos de B e C são então convertidos em diferentes ácidos micólicos em D. * Besra e colaboradores levantaram a hipótese de um mecanismo alternativo baseado em evidências bioquímicas. Sugere-se que a cis-insaturação em a cadeia de meroácidos é provocada por desidrases e isomerases. β -hidroxiacilACP desidrase e 2-trans-enoil-ACP isomerase. Fonte: Adaptado de RAMAN; RAJAGOPALAN; CHANDRA, 2007.

Figura 4. Estruturas químicas dos principais ácidos micólicos de *M. tuberculosis*.



Existem cinco formas de AM em *M. tuberculosis*. Estão ilustrados acima alfa-AM, metoxi-AM e ceto-AM. Os anéis de ciclopropano no alfa-AM têm a configuração cis. Os metoxi-AM e ceto-AM podem ter a configuração cis ou trans no anel proximal de ciclopropano. Legenda: AM – Ácidos Micólicos. Fonte: Modificado de TAKAYAMA; WANG; BESRA, 2005.

Estes e outros tipos de AM estão presentes em proporções variáveis em diferentes espécies de micobactérias, apresentando um perfil específico de AM, que pode ser utilizado para diferenciar subespécies dessas bactérias (BUTLER; GUTHERTZ, 2001; SONG *et al.*, 2009; RIVERA-BETANCOURT *et al.*, 2013). A existência de perfis específicos de AM em diferentes contextos sugere que as propriedades físicas e, portanto, as funções biológicas de ambos os derivados de AM e AM livres podem ser determinadas pela sua composição química básica (YUAN *et al.*, 1998; GROENEWALD *et al.*, 2014). Estudos sobre os genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de diferentes grupos funcionais de AM têm destacado

a sua importância em diferentes funcionalidades das micobactérias. Quando há ausência de um grupo cis-ciclopropano proximal em α -AM, *M. bovis* BCG não é capaz de estabelecer uma infecção letal, em comparação à estirpe selvagem (GLICKMAN; COX; JACOBS, 2000). A trans-ciclopropanação de AM oxigenados suprime a inflamação e virulência induzida por *M. tuberculosis* (RAO *et al.*, 2006). Sendo, então, a ciclopropanação e estereoquímica do ciclopropano importantes para a relação estrutura-função dos AM. Ceto-AM apresentaram-se em maior quantidade em bactérias que cresceram em macrófagos e, na ausência de ceto-AM, a entrada e replicação dentro de macrófagos foram prejudicadas (YUAN *et al.*, 1998), sugerindo que ceto-AM desempenham um papel chave na infecção de macrófagos. AM oxigenados podem ser essenciais para a patogenicidade em camundongos (DUBNAU *et al.*, 2000) e tem-se sugerido que desempenham um papel importante no acúmulo de lipídios e formação de células esponjosas no local da infecção e assim, possivelmente, facilitem a persistência a longo prazo no hospedeiro (PEYRON *et al.*, 2008).

Além disso, sabe-se que, de uma forma geral, os AM estão relacionados com características únicas das micobactérias e desempenham papel fundamental na sua patogenicidade. As características mais importantes incluem propriedades como a resistência à lesão química, resistência ao sistema imune do hospedeiro, redução da ação eficaz de antimicrobianos hidrofóbicos, resistência à desidratação e capacidade de persistir e se multiplicar dentro do ambiente hostil do fagolisossoma dos macrófagos (DAFFÉ; DRAPER, 1998; YASSIN, 2011; VERSCHOOR; BAIRD; GROOTEN, 2012; PAWEŁCZYK; KREMER, 2013; SLAMA *et al.*, 2016). Observa-se também que diferenças nas respostas imunitárias do hospedeiro a diferentes estirpes são, pelo menos em parte, atribuídas a diferenças na composição lipídica dos seus envelopes celulares (EHRT; SCHNAPPINGER, 2007; FORRELAD *et al.*, 2013).

2.4 Genoma de *M. tuberculosis*

O genoma da cepa *M. tuberculosis* H37Rv foi totalmente sequenciado em 1998. Ele compreende 4.411.529 pares de base (pb) e um conteúdo G+C (guanina e citosina) de 65,6% que se apresenta relativamente constante ao longo do genoma

(COLE *et al.*, 1998). Com a disponibilidade de sequências do genoma de diferentes estirpes de *M. tuberculosis* tornou-se possível realizar comparações de todo o genoma. As estirpes de *M. tuberculosis* geneticamente heterogêneas são divididas em grupos chamados de linhagens ou genótipos, os quais são caracterizadas por variações específicas que se acumulam gradualmente durante a evolução (FILLIOL *et al.*, 2006; GAGNEUX *et al.*, 2006; GAGNEUX; PETER, 2007; PROZOROV; DANILENKO, 2011; JAGIELSKI *et al.*, 2014). As linhagens podem apresentar variação no número de cópias de genes, sequências de inserções (IS), inserções / deleções (*indels*) de vários nucleotídeos e mutações pontuais conhecidas como polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (GAGNEUX *et al.*, 2006; MIKHEECHEVA *et al.*, 2017). Os SNPs são considerados marcadores promissores, pois fornecem alta resolução e resultados inequívocos. SNPs em vários grupos de genes podem ser utilizados para genotipagem, incluindo genes constitutivos e de resistência a fármacos (FORD *et al.*, 2013; COLL *et al.*, 2014; FEUERRIEGEL *et al.*, 2014). SNPs sinônimos e não sinônimos podem ser utilizados para realizar a genotipagem. Algumas alterações de aminoácidos podem ser neutras, mas algumas podem afetar a função das proteínas. O uso de SNPs não sinônimos permite a detecção de grupos bacterianos com fenótipo potencialmente alterado (MIKHEECHEVA *et al.*, 2017).

2.4.1 Epidemiologia Molecular

Buscando identificar os determinantes de distribuição, transmissão e manifestação de uma doença na população e visando a possibilidade de intervenção e prevenção, houve o desenvolvimento da epidemiologia molecular que integra abordagens epidemiológicas convencionais com técnicas moleculares baseadas no reconhecimento de sequências ou padrões genéticos de um microrganismo (FOXMAN, RILEY, 2001).

A expansão da aplicação de técnicas genômicas fornece novos caminhos para o combate da TB, tendo sido utilizada para abordar inúmeras questões, cujas respostas estão avançando na prática clínica. Essas investigações normalmente dependem da capacidade dos métodos utilizados de genotipar isolados clínicos (BORGDORFF; VAN SOOLINGEN, 2013).

2.4.1.1 Métodos clássicos de genotipagem

A análise de marcadores genéticos permite classificar as estirpes de *M. tuberculosis* em diferentes linhagens e analisar a distribuição dessas estirpes na população, além de estudar fatores de risco na dispersão da doença. Dentre as metodologias de genotipagem de *M. tuberculosis* mais utilizadas estão o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) da sequência de inserção IS6110, MIRU (*Mycobacterial Interspersed Repeat Units*) e *Spoligotyping* (*Spacer Oligonucleotide Typing*) (KREMER *et al.*, 1999; MURRAY; ALLAND, 2002; GAGNEUX; SMALL, 2007; GILLESPIE, 2007).

2.4.1.1.1 RFLP da sequência IS6110

No RFLP da sequência de inserção IS6110, realiza-se a digestão de DNA genômico utilizando a enzima de restrição PvuII seguida por hibridização *Southern blotting* com sondas para a sequência IS6110, diferenciando as estirpes pelo padrão do tamanho molecular dos fragmentos gerados. Esse método baseia-se na distribuição dessa sequência em diferentes estirpes, que é diferente entre os isolados não relacionados epidemiologicamente (van EMBDEN *et al.*, 1993; SCHURCH; van SOOLINGEN, 2012).

O RFLP da sequência IS6110 foi a primeira técnica utilizada na genotipagem de *M. tuberculosis* e considerada como método padrão-ouro, apresenta uma resolução maior do que o método *spoligotyping* e pode distinguir estirpes do complexo *M. tuberculosis*. No entanto, essa técnica é demorada, trabalhosa e requer grande quantidade de DNA para sua realização. Além disso, quando aplicada em estirpes com número de cópias da sequência IS6110 inferior a seis, tem sua capacidade discriminatória diminuída, podendo apresentar padrões idênticos mesmo em isolados não epidemiologicamente relacionados. Nesse caso, é necessário a utilização de métodos de genotipagem complementares como o MIRU-VNTR e/ou *Spoligotyping* (van SOOLINGEN *et al.*, 1991; KREMER *et al.*, 1999; GOULDING *et al.*, 2000; SCHURCH; van SOOLINGEN, 2012; JONSSON *et al.*, 2014).

2.4.1.1.2 MIRU-VNTR

A metodologia MIRU-VNTR baseia-se no número variável de repetições em tandem (*Variable number of tandem repeats* – VNTR) de unidades repetitivas de DNA micobacteriano (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units* – MIRUs) que variam de 40 a 100 pb (SUPPLY et al., 2000). Nessa metodologia são utilizados iniciadores específicos para realizar a amplificação de múltiplos *loci* por PCR e são identificados os tamanhos dos fragmentos amplificados, utilizando um método de separação, como eletroforese em gel, sistema de capilaridade ou HPLC. O tamanho do produto amplificado reflete o número de cópias do MIRU-VNTR alvo (SUPPLY et al., 2000; MAZARS et al. 2001; ALLIX et al., 2004; EVANS et al. 2004).

O poder discriminatório do método MIRU-VNTR é proporcional ao número de *loci* avaliado, em geral, quando se utiliza apenas 12 *loci* o poder discriminatório é menor que o RFLP-IS6110. Quando é utilizado o conjunto de 15 *loci*, seu valor preditivo para avaliar a transmissão de *M. tuberculosis* foi considerado igual ao do RFLP-IS6110 e o de 24 *loci* definido como uma ferramenta de alta resolução para estudos filogenéticos. Quando a análise é realizada em combinação com *Spoligotyping* o poder discriminatório aumenta (MATHEMA et al., 2006; SUPPLY et al., 2006).

2.4.1.1.3 Spoligotyping

Spoligotyping é uma técnica amplamente utilizada para a genotipagem do complexo *M. tuberculosis* que, em geral, apresenta um poder discriminatório menor do que RFLP-IS6110 ou MIRU-VNTR. A metodologia é utilizada para avaliar a diversidade genética do *locus* DR (*Direct Repeats*), que é membro de uma grande família de repetições de DNA, denominadas CRISPR. Consiste em repetições diretas de 36 pb, que se alternam com espaçadores únicos que têm comprimento de 35 a 41 pb (KAMERBEEK et al., 1997; KANDUMA et al., 2003; ARNOLD, 2006; BRUDEY et al., 2006; MAKAROVA et al., 2011).

A técnica é baseada em uma PCR seguida de uma hibridização que é realizada em uma membrana que contém oligonucleotídeos imobilizados, ligados previamente de forma covalente, específicos para cada uma das 43 sequências

espaçadoras. O resultado é visualizado por meio de uma reação de quimioluminescência e os diferentes padrões de hibridização são interpretados pela presença ou ausência de cada sequência espaçadora analisada (GOYAL et al. 1997; KAMERBEEK et al., 1997; SANTOS, KIPNIS, KIPNIS, 2007).

O *Spoligotyping* é um método rápido, de simples execução, possui alta reprodutibilidade e permite a detecção e diferenciação de estirpes de *M. tuberculosis* simultaneamente, além de diferenciar os membros do complexo *M. tuberculosis* (KAMERBEEK et al., 1997), pois seus resultados são expressos através de padrões que podem ser facilmente analisados em programas de computador, o que permite a realização de estudos com muitas amostras e facilita a comparação de resultados intra e interlaboratoriais (GOYAL et al., 1997; KREMER et al., 1999; MATHEMA et al., 2006).

Para esta técnica, instituiu-se um banco mundial de padrões de *Spoligotyping*, de acesso livre, contendo *spoligo*types de milhares de isolados clínicos de muitos países. Sendo o SITVIT2 (Institute Pasteur de La Guadeloupe, França) o maior banco de dados de genotipagem mundial na atualidade. Este banco de dados é composto por mais de 111.635 isolados clínicos do complexo *M. tuberculosis* obtidos de 169 países (COUVIN et al., 2019). A nível mundial, os *spoligo*types comuns a mais de um isolado são designados *Shared Types* (ST) e a cada um deles são atribuídos um número *Spoligo*type *International Type* (SIT). O SIT designa padrões genéticos compartilhados por dois ou mais pacientes, sendo designados como *Orphan* os padrões relatados em um único isolado (DEMAY et al., 2012). Com base no padrão de *Spoligotyping*, diferentes linhagens e sublinhagens do complexo *M. tuberculosis* foram definidas, as quais possuem distribuição geográfica global bastante variável (GAGNEUX; SMALL, 2007; COUVIN et al., 2019).

2.4.1.2 Sequenciamento completo do genoma (WGS)

Métodos de genotipagem clássica de bactérias do complexo *M. tuberculosis* podem ajudar a diferenciar e compreender cadeias de transmissão recentes e abordar questões clínicas. Têm sido utilizados como ferramentas para avaliar os programas de controle da TB ao apontar possíveis fatores de risco para eventos de transmissão

recentes. Contudo, os métodos clássicos analisam apenas um conjunto selecionado de regiões altamente polimórficas que baseando-se apenas em marcadores contidos em porções pequenas do genoma (BARNES; CAVE, 2003; MERKER et al., 2017).

O WGS oferece novas oportunidades tanto em pesquisas quanto em aplicações em saúde pública por meio de análise de genomas completos de várias estirpes simultaneamente, fornecendo mais informações, com precisão, quando comparado com os métodos tradicionais de genotipagem (KOSER et al., 2012; NIEMANN; SUPPLY, 2014; WALKER et al., 2015). O sequenciamento do genoma é um processo que determina a ordem dos nucleotídeos presentes no DNA de um organismo, baseando-se em métodos bioquímicos (BRANDÃO, 2009). O método mais rápido e econômico é o sequenciamento *shotgun* para gerar leituras curtas (40–250 bp) que serão alinhadas a um genoma de referência. Atualmente os sequenciadores Illumina são os mais utilizados. As análises de bioinformática são utilizadas para juntar esses fragmentos mapeando as leituras individuais com o genoma de referência (BEHJATI; TARPEY, 2013).

A princípio, o WGS fornece a melhor solução para a classificação de linhagens para rastrear fontes de infecção e redes de transmissão e permite a previsão simultânea do perfil completo de suscetibilidade antimicrobiana de um determinado isolado. Nos últimos anos, houve uma expansão considerável na capacidade do WGS nos laboratórios de referência em TB de forma global, oferecendo uma alternativa mais rápida aos métodos de diagnóstico convencionais e uma diminuição no custo quando realizado em maior escala (REVEZ et al., 2017; CRyPTIC, 2018; NIKOLAYEVSKYY et al., 2019).

Os resultados do estudo realizado por Meehan e colaboradores (2019) sugerem que os *clusters* baseados na metodologia de *spoligotyping* podem abranger eventos de transmissão que ocorreram quase 200 anos antes da amostragem, enquanto MIRU-VNTR de 24 *loci* geralmente representavam três décadas de transmissão. Em vez disso, a genotipagem baseada em WGS que aplica baixos limiares de alelos SNP ou cgMLST permite a determinação de eventos de transmissão recentes, por exemplo em intervalos de tempo de até 10 anos utilizando um *cutoff* de 5 SNP / alelo.

As tecnologias de sequenciamento estão avançando em um ritmo rápido e vêm contribuindo para superar as limitações das técnicas de genotipagem clássicas.

Além disso, à medida que o custo de reagentes e instrumentos continua diminuindo, as oportunidades de aplicação do sequenciamento na linha de frente no combate à TB poderão se expandir cada vez mais (GALAGAN, 2014).

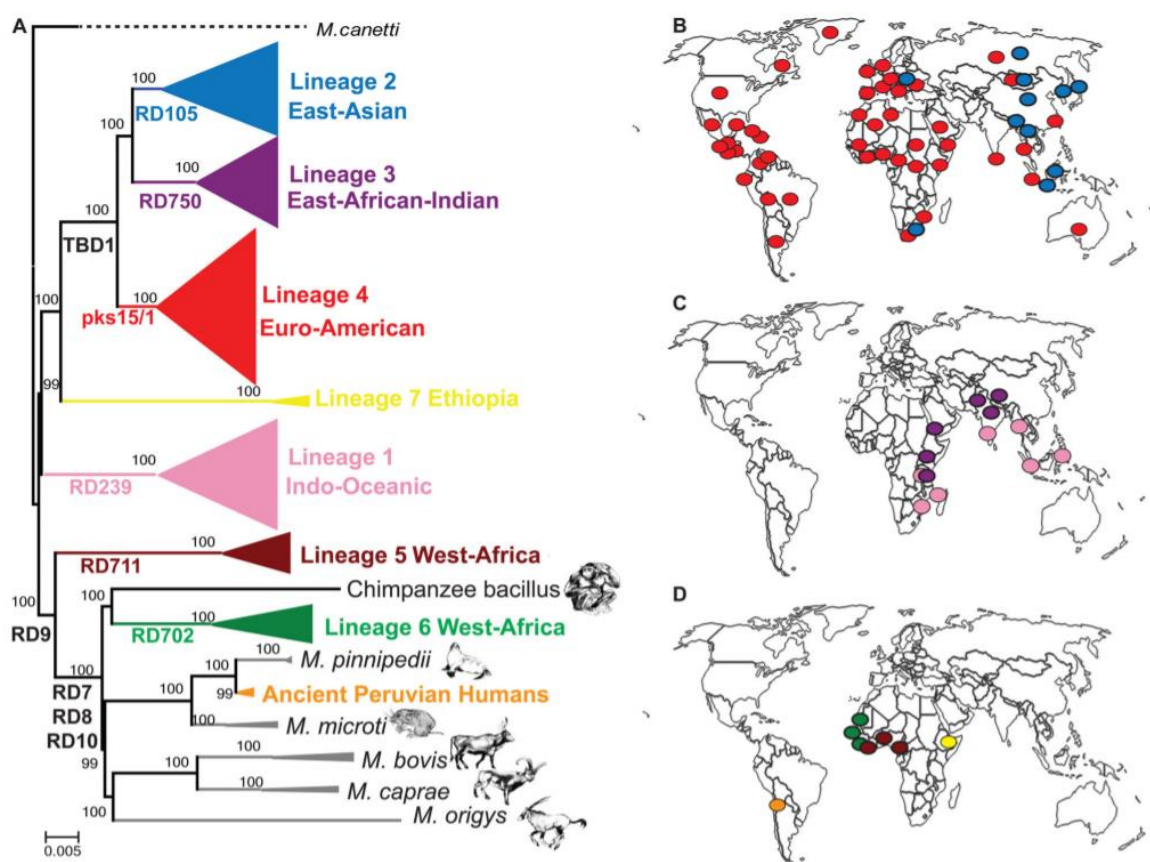
2.4.2 Diversidade genética

O sequenciamento do genoma completo, a genômica comparativa e a biologia de sistemas estão gerando *insights* sobre as origens e a evolução contínua do *M. tuberculosis*, bem como a base molecular de sua patogenicidade. Isso tem implicações importantes para a perspectiva da doença, desenvolvimento de novos medicamentos e vacinas e tratamento de pacientes usando as terapêuticas (GALAGAN, 2014).

Uma diversidade genética substancial vem sendo descrita entre estirpes de *M. tuberculosis* prevalentes em diferentes partes do mundo (GAGNEUX et al., 2006). O complexo *M. tuberculosis* associado ao homem é classificado em sete diferentes linhagens filogenéticas (Figura 5): Linhagem 1 – East Africa, The Philippines, Rim of Indian Ocean; Linhagem 2 – East Asia; Linhagem 3 – East Africa, Central Asia; Linhagem 4 – Europe, America, Africa; Linhagem 5 – West African 1; Linhagem 6 – West African 2; Linhagem 7 - Ethiopia (COMAS et al., 2013).

Algumas linhagens são capazes de persistir em diferentes populações humanas e outras são capazes de persistir apenas em uma ou algumas populações hospedeiras específicas (KIRZINGER; STAVRINIDES, 2012). Dentre as linhagens mais adaptadas ao homem, a Linhagem 4 é a que apresenta maior frequência em todos os continentes, sendo, geograficamente, a causa mais comum de TB humana (DEMAY et al., 2012; COSCOLLA; GAGNEUX, 2014). Membros das linhagens modernas, Linhagem 4 e Linhagem 2, são responsáveis pela maioria dos casos de TB no mundo (Figura 5.B) e algumas de suas estirpes estão associadas a grandes surtos de TB sensível e resistente a medicamentos (COSCOLLA; GAGNEUX, 2010, 2014; COSCOLLA et al., 2013). Foi demonstrado, também, que essas linhagens causam progressão mais rápida para doença ativa e são mais virulentas em modelos animais quando comparadas com linhagens antigas (GAGNEUX et al., 2006).

Figura 5. Análise filogenética do complexo *M. tuberculosis* e sua distribuição geográfica.



A. Análise de máxima verossimilhança modificada de Bos e colaboradores (2014). O suporte ao nó após 1000 replicações de *bootstrap* é mostrado nos ramos e a árvore é enraizada pelo grupo externo *M. canettii*. Polimorfismos de sequência grande (LSPs) são indicados ao longo dos ramos. A barra de escala indica o número de substituições de nucleotídeos por local. **B, C e D.** Linhagens do complexo *M. tuberculosis* dominantes por país. O ponto amarelo e o laranja representam a linhagem 7 na Etiópia e as cepas do complexo *M. tuberculosis* extintas do Peru, respectivamente; B mostra as linhagens mais difundidas geograficamente, C, as linhagens distribuídas de forma intermediária e D, as linhagens mais restritas geograficamente. Fonte: COSCOLLA; GAGNEUX, 2014.

A Linhagem 4 compreende as sublinhagens T, S, LAM, X, Haarlem, Ural, Cameroon, Turkey (GAGNEUX; SMALL, 2007; COUVIN et al., 2019). As sublinhagens da Linhagem 4 foram encontradas amplamente dispersas, mas padrões claros de estrutura geográfica são discerníveis (STUCKI et al, 2016). As linhagens LAM e Haarlem são relatadas em todo o mundo, enquanto, outras são geograficamente restritas, como as linhagens de Camarões e Uganda, que são mais prevalentes nesses países, respectivamente (KOROKORO et al., 2012; WAMPANDE et al., 2013).

Acredita-se que as estirpes LAM e Haarlem tenham sido trazidas para o continente americano pelos europeus, nos séculos XVIII e XIX, durante o período de colonização e migrações para o Novo Mundo (PAULSEN, 1987; BRYNILDSRUD et al., 2018). No entanto, variantes africanas do complexo *M. tuberculosis* como *M. africanum* ou sublinhagens da Linhagem 4, como Camarões e Uganda, estão quase ausentes no continente americano, mesmo com o grande número de africanos que chegaram à América trazidos como escravos (YEBOAH-MANU et al., 2011).

A sublinhagem LAM é predominante em países da América Latina (~ 34–52%) (CANDIA et al., 2007; CERZO et al., 2012; BALCELLS et al., 2015). No Brasil, a sublinhagem LAM é a mais prevalente, seguida pelas sublinhagens T e Haarlem (GOMES et al., 2012), assim como em Santa Catarina (NOGUEIRA et al., 2016; PRIM et al., 2016; MEDEIROS et al., 2017).

2.4.3 Genética dos Ácidos Micólicos

Com a disponibilidade de sequências do genoma de diferentes estirpes de *M. tuberculosis* tornou-se possível realizar comparações de todo o genoma. Permitindo, assim, a identificação da presença de deleções ou mutações de genes que se correlacionam com virulência, incluindo genes relacionados com o metabolismo de AM (CUBILLOS-RUIZ; MORALES; ZAMBRANO, 2008; TEN BOKUM et al., 2008; JHINGAN et al., 2016).

Evidências sugerem que a diversidade filogenética tem importantes consequências fenotípicas (COSCOLLA; GAGNEUX, 2010), inter ou intralinhagem. Em estudo recente destacou-se tendências no metabolismo de AM compartilhados por estirpes pertencentes à mesma linhagem filogenética. Contudo, pôde ser observada uma diversidade substancial intralinhagem no que se refere ao metabolismo lipídico, consistente com o elevado número de SNPs presentes em duas ou mais estirpes, mas não em toda linhagem (PORTEVIN et al., 2014).

Estudos sobre os genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de diferentes grupos funcionais de AM têm destacado a sua importância em diferentes funcionalidades das micobactérias (GLICKMAN; COX; JACOBS, 2000). *M. tuberculosis* está entre um grupo de bactérias altamente virulentas que exibem níveis extremamente baixos de diversidade genética na sua população (ACHTMAN, 2008).

Esta micobactéria produz grande variedade de lipídios complexos, incluindo diversos tipos de AM, o que se reflete no número de genes envolvidos no seu metabolismo. Sugere-se que ocorra uma forte seleção em genes que são importantes para a fisiologia de *M. tuberculosis*, esperando-se, assim, que genes essenciais sejam conservados, como os relacionados ao metabolismo de AM (COLE et al., 1998; PEPPERELL et al., 2013; PORTEVIN et al., 2014). Contudo, considerando que um dos principais medicamentos utilizados no tratamento da TB tem como alvo o metabolismo de AM, os genes envolvidos neste metabolismo podem estar sob seleção diversificada (PORTEVIN et al., 2014).

Os resultados de Portevin e colaboradores (2014) mostraram que o *background* genético da cepa influencia o metabolismo de AM e sugere que a diversidade da cepa deve ser considerada no desenvolvimento de novos fármacos antituberculose que têm como alvo a síntese de AM. Também foi demonstrado que padrões de AM se diferenciavam substancialmente entre as cepas individuais do complexo *M. tuberculosis*, sugerindo uma faixa ainda mais ampla na tolerância a medicamentos entre essas cepas. A variabilidade específica da linhagem ou na permeabilidade a antimicrobianos ligada ao conteúdo de AM também teria implicações clínicas significativas, uma vez que a genotipagem da cepa poderia ser implementada no futuro como uma abordagem personalizada no tratamento da TB (MULLER et al., 2013; PORTEVIN et al., 2014).

Com isso, neste estudo, a análise dos dados do WGS foi empregada para determinar, pela primeira vez, mutações em genes relacionados ao metabolismo de AM de *M. tuberculosis* em isolados clínicos de pacientes com TB pulmonar de municípios da Grande Florianópolis.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar mutações nos genes relacionados à metabolização de ácidos micólicos em estirpes de *M. tuberculosis* circulantes na Grande Florianópolis baseado nos dados do WGS.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar mutações genômicas (SNPs e *indels*) em genes envolvidos no metabolismo de AM.
- Associar as mutações encontradas nos genes relacionados ao metabolismo de AM com o SIT/sublinhagem obtidos por *Spoligotyping*.
- Associar as mutações encontradas nos genes relacionados ao metabolismo de AM com os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob número de protocolo: 2.054.560 CAAE: 66795917.1.0000.0121. Os indivíduos que concordaram em participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.2 Amostragem e critérios de inclusão

Neste estudo foram incluídas 151 isolados clínicos de *M. tuberculosis* como um estrato da amostragem do trabalho de tese de Scheffer (2017), “Influência de fatores de risco do paciente e de características de *Mycobacterium tuberculosis* no desfecho dos casos novos de tuberculose pulmonar tratados com esquema básico: uma coorte prospectiva de dois anos na grande Florianópolis/SC”, que estudou uma coorte com 223 pacientes com diagnóstico de TB pulmonar confirmado por cultura, que realizaram diagnóstico nos municípios de Florianópolis e São José e iniciaram tratamento com esquema básico para TB pulmonar, de maio de 2014 a maio de 2016. O estudo incluiu pacientes que concordaram em participar do estudo mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Pacientes com histórico prévio de tratamento anti-TB foram excluídos do estudo. Os isolados clínicos de *M. tuberculosis* foram coletados antes de os pacientes iniciarem o tratamento anti-TB.

As amostras do estudo de Scheffer (2017) foram bem caracterizadas. Os dados clínicos e demográficos dos pacientes foram coletados de prontuários nas unidades de saúde e questionários aplicados aos pacientes pela autora. Os dados laboratoriais foram obtidos pelos métodos de baciloscopia e cultura. As baciloscopias foram realizadas utilizando-se o método de Ziehl-Neelsen, de acordo com as recomendações do Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias (BRASIL, 2008) e as culturas foram realizadas em meios de cultura Ogawa-Kudoh (Laborclin – Brasil), incubadas a 37°C durante 28 dias para o isolamento de *M. tuberculosis*. A partir de colônias isoladas de *M. tuberculosis*, foi realizada a extração de DNA utilizando o método de CTAB (brometo de

cetiltrimetilamônio) descrito por van Soolingen e colaboradores (1994). O DNA extraído foi utilizado na realização da genotipagem dos isolados de *M. tuberculosis* pela técnica de *Spoligotyping* (*Spacer oligonucleotide typing*) (KAMERBEEK et al., 1997). Os perfis encontrados foram comparados com o banco mundial de *spoligo*types The SITVIT WEB (http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/query; Institute Pasteur de la Guadeloupe, França), sendo que cada padrão do perfil corresponde a um SIT (KAMERBEEK et al., 1997; SOLA et al., 2001).

Os 151 isolados clínicos deste estudo foram selecionados de acordo com a qualidade do DNA disponível para realizar o sequenciamento de genoma completo.

4.3 Sequenciamento de genoma completo

O DNA genômico das 151 estirpes clínicas de *M. tuberculosis* foi submetido ao WGS. Para isso, aproximadamente, um micrograma de DNA foi fragmentado em um sonicador Q800R2 (QSonica, Newtown, CT, EUA) utilizando os seguintes parâmetros: sonicação de 3 minutos com 15 segundos de pulso ligado, 15 segundos de pulso desligado e 20% de amplitude. Com o auxílio de esferas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Código A63882), o DNA fragmentado foi selecionado por tamanho (600-700 pb). A Biblioteca de DNA foi preparada usando o Kit de Preparação de Biblioteca de DNA NEBNext® Ultra™ II para Illumina® (New England BioLabs, Código E7645L). Os adaptadores e os oligos de 8bp baseados em Kozarewa e Turner (2011) foram adquiridos da IDT® (Integrated DNA Technologies, San Diego, CA) e usados no lugar daqueles fornecidos no kit de preparação NEB em uma abordagem de indexação dupla. O sequenciamento de extremidade pareada (2 × 150 pb) foi realizado em um sequenciador NextSeq da Illumina usando um kit de 300 ciclos v2 ou alto rendimento (Illumina, código FC-404-2003 ou código FC-404-2004) usando o procedimento padrão do Illumina®.

4.4 Análise Bioinformática

A ferramenta FastQ (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) foi utilizada para realizar uma análise inicial de qualidade das *reads*. Essa análise foi repetida após as *reads* serem cortadas para remover as sequências dos

adaptadores e leituras de baixa qualidade usando trimmomatic (v0.33) (parâmetros: LEADING: 3 TRAILING: 3 SLIDINGWINDOW: 4: 20 MINLEN: 36) (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014). Em seguida, as *reads* foram mapeadas com o genoma de referência *M. tuberculosis* H37Rv (número de acesso do GenBank: NC_000962.3) usando BWA-MEM (v0.7.16). Samtools (v1.9) (LI et al., 2009) foi usado para converter o formato SAM para BAM e ordenar as sequências mapeadas. A qualidade do arquivo BAM resultante foi verificada usando Qualimap (GARCÍA-ALCALDE et al., 2012) e Sambamba (v0.6.8) foi usado para marcar as *reads* duplicadas (TARASOV et al., 2015). Variantes (SNPs e *indels*) foram identificadas usando Samtool. As variantes foram filtradas com base nos seguintes critérios: qualidade do mapeamento ≥ 50 , qualidade do alinhamento da base ≥ 23 e ≤ 2000 *reads* cobrindo cada local. Depois, filtrou-se o VCF bruto com os seguintes parâmetros: profundidade mínima de leitura de 10 para chamar uma variante e profundidade máxima de leitura de 2000. A anotação funcional variante dos arquivos VCF foi realizada com snpEff (v4.3) (CINGOLANI et al., 2012). As variantes não-sinônimas identificadas nos genes: *accA2*, *accA3*, *accD2*, *accD3*, *accD4*, *accD5*, *accD6*, *acpM*, *adhD*, *adhE1*, *amiD*, *bacA*, *cmaA1*, *cmaA2*, *desA1*, *desA2*, *desA3*, *echA10*, *echA11*, *fabD*, *fabD2*, *fabG1*, *fabG2*, *fabG4*, *fabH*, *fadD13*, *fadD32*, *fgd2*, *faz*, *fbpA*, *fbpB*, *fbpC*, *fbpD*, *fcoT*, *fgd2*, *hadA*, *hadB*, *hadC*, *inhA*, *irtA*, *irtB*, *kasA*, *kasB*, *lipR*, *mmaA1*, *mmaA2*, *mmaA3*, *mmaA4*, *mmpL11*, *mymA*, *mymT*, *otsB1*, *otsB2*, *pcaA*, *pks13*, *rip*, *Rv0161*, *Rv0194*, *Rv0519c*, *Rv0774c*, *Rv1272c*, *Rv1273c*, *Rv1686c*, *Rv1687c*, *Rv1747*, *Rv2509*, *Rv3057c*, *Rv3087*, *Rv3400*, *Rv3720*, *Rv3802c*, *sadH*, *tgs4*, *ufaA1*, *umaA* e *virS* (TAKAYAMA; WANG; BESRA et al., 2005; LEW et al., 2011; PORTEVIN et al., 2014) foram tabuladas para inferir análises estatísticas.

A análise filogenética foi realizada utilizando a *pipeline* Snippy v4.3.6 (<https://github.com/tseemann/snippy>) para o chamamento de variantes e alinhamento dos SNPs. Uma árvore filogenética de verossimilhança foi gerada utilizando a ferramenta *PhyML*, aplicando o modelo de substituição nucleotídica *General Time Reversible* (GTR) e o suporte de ramificação avaliado pelo Teste de Razão de Verossimilhança Aproximado (aLRT), conforme implementado em *Seaview* (GOUY; GUINDON; GASCUEL, 2010). A árvore resultante foi enraizada utilizando o ancestral comum *M. canetti* (número de acesso Genbank: NC_019950.1). Por fim, a ferramenta online *Itol* foi utilizada para a visualização e anotação da árvore (<https://itol.embl.de>).

4.5 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa IBM SPSS Statistics v26. Foram aplicados os testes estatísticos Qui-quadrado e Exato de Fisher para a verificação de uma possível associação entre a presença de variantes em genes relacionados ao metabolismo de AM, desfechos (cura, falha de tratamento e morte), abandono de tratamento, resultados de baciloscopia e classificação baseada em *spoligotyping* entre as estirpes de *M. tuberculosis* avaliadas. Considerou-se significativo um valor de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Amostragem

No presente estudo, foram avaliados 151 isolados clínicos de pacientes diagnosticados com TB pulmonar em municípios da Grande Florianópolis, tratados com esquema básico, no período de maio de 2014 a maio de 2016.

5.2 Descrição da população estudada

Dos 151 pacientes incluídos neste estudo, 96 (63,6%) eram do sexo masculino. A média de idade encontrada foi de $37,13 \pm 13,98$ anos e variou de 15 a 83 anos, sendo que 49,0% (74/151) tinham idade de 26 a 45 anos. Com relação a fatores de risco e comorbidade, 27 (17,9%) indivíduos apresentavam coinfeção TB-HIV. Outros agravos associados à TB foram encontrados, 13 (8,6%) indivíduos tinham diabetes mellitus, 47 (31,1%) apresentavam histórico de abuso de álcool, 85 (56,3%) eram usuários de tabaco e 47 (31,1%) usuários de drogas ilícitas.

A baciloscopia no diagnóstico apresentou-se positiva em 92,0% (139/151) dos casos e negativa em 8,0% (12/151). Com relação aos resultados da baciloscopia de acompanhamento, foi possível observar que, dos 151 indivíduos avaliados, 58,9% (89/151) realizaram baciloscopia no segundo mês e, desses, 38,2% (34/89) apresentaram resultados de baciloscopia positivos, e 47,7% (72/151) realizaram baciloscopia no quarto mês, dos quais, foram positivas 19,4% (14/72) das amostras.

Com relação ao desfecho, 70,9% (107/151) foram encerrados por cura, 21,9% (33/151) abandonaram o tratamento, 4,0% (6/151) dos casos foram encerrados como óbito e 2,6% (4/151) dos casos apresentaram cultura positiva após quatro meses de tratamento.

5.3 Análise molecular por *Spoligotyping*

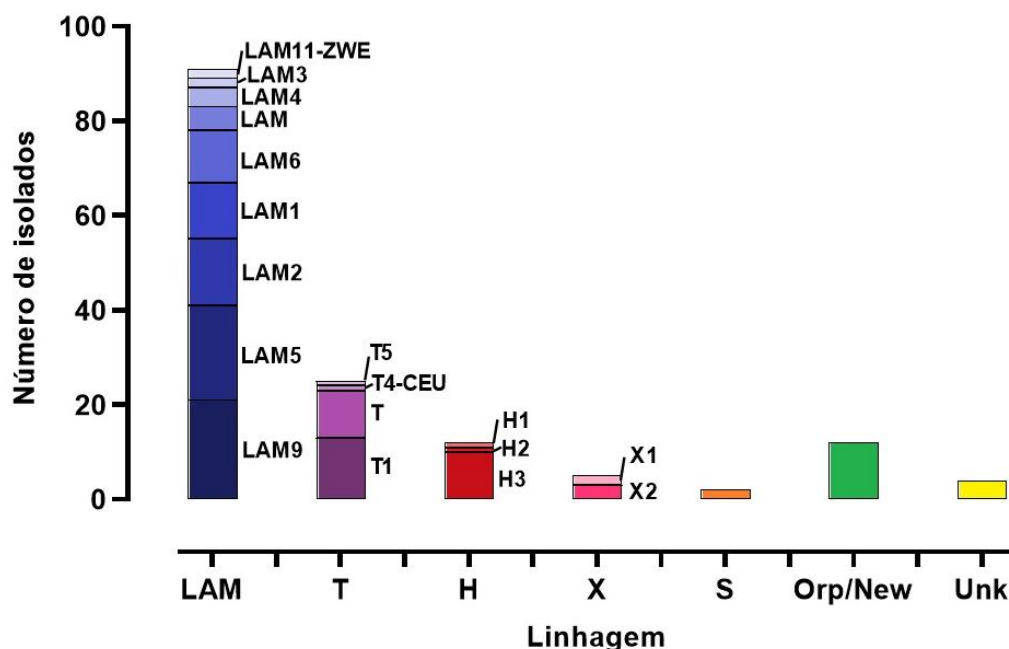
A análise dos 151 isolados pelo método de *Spoligotyping* permitiu a identificação de 53 *spoligotypes* diferentes: 136 isolados foram classificados como pertencentes a 38 SITs, 15 isolados pertencem a 13 diferentes perfis novos (*orphan*)

e quatro isolados apresentaram três perfis desconhecidos. Entre os 53 *spoligotypes*, foram identificadas 5 linhagens e 19 sub linhagens (H1, H2, H3, LAM, LAM1, LAM11-ZWE, LAM2, LAM3, LAM4, LAM5, LAM6, LAM9, S, T, T1, T4-CEU1, T5, X1, X2). Na Tabela 1, constam os resultados de *spoligotyping*, incluindo a relação dos *spoligotypes*, SIT, sublinhagem e frequência.

Dentre os isolados estudados, a linhagem LAM foi a mais frequente, representando 60,3% (91/151), seguida da família T com 16,6% (25/151), da Haarlem (H) com 7,9% (12/151), da X com 3,3% (5/151) e da S com 1,3% (2/151) (Figura 6).

Com relação às 19 sublinhagens, a mais frequente foi a LAM9 representando 13,9% (21/151) do isolados, seguida da LAM5 com 13,2% (20/151), da LAM2 com 9,3% (14/151), da T1 com 8,6% (13/151), da LAM1 com 7,9% (12/151), da LAM6 com 7,3% (11/151), da H3 e T com 6,6% (10/95) cada, da LAM com 3,3% (5/151), da LAM4 com 2,6% (4/151), da X2 com 2,0% (3/151). As sublinhagens LAM11-ZWE, LAM3, S e X1 representaram 1,3% (2/151) dos isolados, cada; e as sublinhagens H1, H2, T4-CEU1 e T5 representaram 0,7% (1/151) dos isolados, cada.

Figura 6. Resultados de *Spoligotyping* agrupados em família.



Legenda: LAM: *Latin-American-Mediterranean*; H: *Haarlem*; Orp: *Orphan*; Unk: *Unknown*.
Fonte: a autora.

5.4 Análise do sequenciamento completo do genoma

Por meio da análise do WGS foram avaliadas mutações em 76 genes relacionados com o metabolismo de AM. A análise realizada nas 151 estirpes incluídas no estudo encontrou 163 variações, 134 gênicas (Tabela 2) e 29 intergênicas (Tabela 3), sendo que em 15 genes (*adhD*, *desA1*, *fabG2*, *fcoT*, *hadA*, *hadB*, *hadC*, *irtB*, *mmaA2*, *mymA*, *Rv1273c*, *Rv1686c*, *Rv3400*, *sadH*, *ufaA1*) não foram encontradas nenhuma mutação.

Tabela 2. Variação gênica encontrada nos 151 isolados com relação a genes relacionados ao metabolismo de AM.

<i>locus</i>	Nome do gene	Variação	Mudança de aa	n.
<i>Rv0161</i>	-	332C>T	Ala111Val	4
		1160C>T	Ala387Val	2
		792dupC	Val265fs	3
<i>Rv0162c</i>	<i>adhE1</i>	761T>G	Ile254Ser	1
<i>Rv0194</i>	-	221T>C	Met74Thr	147
		1291G>C	Gly431Arg	15
		1046T>C	Val349Ala	2
		1753T>C	Cys585Arg	1
		2049G>A	Trp683*	1
		2142C>A	Asp714Glu	1
		2546C>T	Ala849Val	1
		256C>T	His86Tyr	1
		442delG	Val148fs	1
		830C>T	Ala277Val	1
<i>Rv0202c</i>	<i>mmpL11</i>	1345C>G	Arg449Gly	3
		2234G>A	Arg745Gln	3
		2575A>G	Ile859Val	1
<i>Rv0242c</i>	<i>fabG4</i>	152G>A	Gly51Asp	2
		287C>T	Pro96Leu	2
		295C>A	Leu99Ile	1
<i>Rv0469</i>	<i>umaA</i>	140C>T	Ala47Val	6
		485G>A	Arg162Gln	1
		487_489dupATG	Met163dup	1
		788A>G	His263Arg	1
<i>Rv0503c</i>	<i>cmaA2</i>	13G>A	Gly5Ser	1
<i>Rv0519c</i>	-	812A>T	Gln271Leu	3
<i>Rv0533c</i>	<i>fabH</i>	46A>C	Gln182His	2

Legenda: * = Stop; fs = Frameshift

Tabela 2 (cont.). Variação gênica encontrada nos 151 isolados com relação a genes relacionados ao metabolismo de AM.

<i>locus</i>	Nome do gene	Variação	Mudança de aa	n.
<i>Rv0642c</i>	<i>mmaA4</i>	494A>G	Asn165Ser	97
		253G>A	Gly85Ser	1
		652G>C	Glu218Gln	1
<i>Rv0643c</i>	<i>mmaA3</i>	368G>A	Arg123Gln	1
<i>Rv0649</i>	<i>fabD2</i>	649C>T	Gln217*	1
<i>Rv0774c</i>	-	178G>A	Asp60Asn	3
		58A>G	Thr20Ala	2
		85delC	Pro64fs	2
<i>Rv0904c</i>	<i>accD3</i>	545G>T	Gly182Val	1
<i>Rv0973c</i>	<i>accA2</i>	869T>G	Val290Gly	1
<i>Rv0974c</i>	<i>accD2</i>	153C>G	Asn51Lys	143
		67A>G	Lys23Glu	46
		284G>A	Cys95Tyr	2
		856C>T	Pro286Ser	2
		949T>G	Ser317Ala	1
<i>Rv1141c</i>	<i>echA11</i>	8A>G	Asp3Gly	1
		655delA	Asn220fs	10
<i>Rv1142c</i>	<i>echA10</i>	236A>G	Asp79Gly	3
		745G>A	Asp249Asn	1
<i>Rv1272c</i>	-	1801A>G	Ile601Val	6
<i>Rv1348</i>	<i>irtA</i>	1861C>G	Pro621Ala	2
<i>Rv1484</i>	<i>inhA</i>	247G>A	Gly83Arg	2
<i>Rv1687c</i>	-	163G>A	Gly55Ser	1
<i>Rv1747</i>	-	457A>G	Thr153Ala	5
<i>Rv1819c</i>	<i>bacA</i>	1522C>T	Arg508Cys	1
<i>Rv2006</i>	<i>otsB1</i>	97G>A	Pro33Asn	1
		1849G>A	Pro617asn	27
		3826T>C	Phe1276Leu	1
		1156G>A	Ala386Thr	4
		1345G>A	Asp449Asn	1
		1880T>C	Val627Ala	1
		2108T>C	Val703Ala	1
		3826T>C	Phe1276Leu	1

Legenda: * = Stop; fs = Frameshift

Tabela 2 (cont.). Variação gênica encontrada nos 151 isolados com relação a genes relacionados ao metabolismo de AM.

<i>locus</i>	Nome do gene	Variação	Mudança de aa	n.
<i>Rv2244</i>	<i>acpM</i>	224C>T	Ala75Val	1
<i>Rv2245</i>	<i>kasA</i>	805G>A	Gly269Ser	46
<i>Rv2246</i>	<i>kasB</i>	959G>T	Gly320Val	1
<i>Rv2247</i>	<i>accD6</i>	100C>A	Leu34Met	1
		395T>A	Val132Asp	2
<i>Rv2509</i>	-	628T>G	Phe210Val	1
<i>Rv2524c</i>	<i>fas</i>	2453A>C	Asp818Ala	1
		3134C>G	Ala1045Gly	2
		4162A>G	Ile1388Val	2
		758G>T	Arg253Leu	2
		7784C>A	Thr2595Asn	5
		8095G>T	Ala2699Ser	6
		1543G>A	Gly515Ser	1
		3434A>G	Asn1145Ser	2
<i>Rv3057c</i>	-	319G>T	Asp107Tyr	1
		335A>C	Asp112Ala	104
		824T>C	Val275Ala	14
<i>Rv3082c</i>	<i>virS</i>	539A>G	Tyr180Cys	1
<i>Rv3084</i>	<i>lipR</i>	128C>T	Pro43Leu	1
		467C>T	Ala156Val	13
<i>Rv3087</i>	-	1088T>C	Leu363Pro	1
		191C>T	Thr64Ile	2
		337C>G	Arg113Gly	3
		457G>A	Ala153Thr	1
		193C>T	Pro65Ser	1
		622_632delATC GAACGGGA	Ile208fs	1
		624_634delCGA ACGGGAGT	Gly209fs	1
<i>Rv3088</i>	<i>tgs4</i>	345G>C	Glu115Asp	1
		364A>G	Ile122Val	1
		647C>A	Ala216Glu	41
		821T>C	Met274Thr	1

Legenda: * = Stop; fs = Frameshift

Tabela 2 (cont.). Variação gênica encontrada nos 151 isolados com relação a genes relacionados ao metabolismo de AM.

<i>locus</i>	Nome do gene	Variação	Mudança de aa	n.
<i>Rv3089</i>	<i>fadD13</i>	206delG	Cys69fs	1
		55C>T	Gln19*	1
		560C>G	Thr187Ser	1
		899G>A	Gly300Asp	1
<i>Rv3229c</i>	<i>desA3</i>	925C>T	His309Tyr	1
<i>Rv3280</i>	<i>accD5</i>	616A>G	Ile206Val	6
		826G>A	Asp276Asn	1
<i>Rv3285</i>	<i>accA3</i>	104G>A	Gly35Asp	3
<i>Rv3372</i>	<i>otsB2</i>	103G>A	Glu35Leu	2
		640C>G	Pro214Ala	2
		328A>C	Ser110Arg	10
		635C>G	Thr212Ser	1
<i>Rv3375</i>	<i>amiD</i>	220G>T	Ala74Ser	4
		249dupT	Val84fs	1
		279G>C	Lys93Asn	1
		1168G>A	Ala390Thr	2
		1207C>A	Leu403Ile	1
<i>Rv3392c</i>	<i>cmaA1</i>	340C>T	Arg114Cys	2
		364delG	Gly122fs	1
		518A>G	His173Arg	2
<i>Rv3720</i>	-	197C>T	Ala66Val	1
		209A>G	His70Arg	104
<i>Rv3800c</i>	<i>pks13</i>	134C>T	Ser45Leu	2
		901C>A	Leu301Met	1
		1925C>T	Ala642Val	1
		2173A>G	Lys725Glu	4
		2641C>A	Pro881Thr	2
		2738T>C	Met913Thr	1
		4324A>G	Lys1442Glu	1
		4352A>C	Gln1451Pro	1
		4448T>C	Val1483Ala	2
		5063C>G	Ser1688Cys	1
<i>Rv3801c</i>	<i>fadD32</i>	882A>T	Glu294Asp	3

Legenda: * = Stop; fs = Frameshift

Tabela 2 (cont.). Variação gênica encontrada nos 151 isolados com relação a genes relacionados ao metabolismo de AM.

<i>locus</i>	Nome do gene	Variação	Mudança de aa	n.
<i>Rv3802c</i>	-	148G>T	Val50Phe	105
		460G>A	Val154Met	1
		776G>T	Arg259Leu	1
		997C>T	Pro333Ser	1
<i>Rv3803c</i>	<i>fbpD</i>	365C>T	Ala122Val	4
<i>Rv3804c</i>	<i>fbpA</i>	230C>G	Pro77Arg	2

Legend: * = Stop; fs = Frameshift

Tabela 3. Mutações intergênicas dos 151 isolados de *M. tuberculosis* com relação a genes relacionados ao metabolismo de AM.

<i>locus</i>	Nome do gene	Região intergênica	Variação	n.
<i>Rv0129c</i>	<i>fbpC</i>	<i>Rv0129c-Rv0130</i>	157663G>A	1
<i>Rv0194</i>	-	<i>Rv0193c-Rv0194</i>	226683C>T	3
		<i>Rv0194-Rv0195</i>	230619G>A	5
<i>Rv0242c</i>	<i>fabG4</i>	<i>Rv0241c-Rv0242c</i>	290660T>G	1
<i>Rv0469</i>	<i>umaA</i>	<i>Rv0468-Rv0469</i>	559857C>T	1
<i>Rv0470c</i>	<i>pcaA</i>	<i>Rv0470c-Rv0470A</i>	561852C>T	7
<i>Rv0519c</i>	-	<i>Rv0519c-Rv0520</i>	612097C>T	2
<i>Rv0645c</i>	<i>mmaA1</i>	<i>Rv0644c-Rv0645c</i>	739193C>T	3
<i>Rv1094</i>	<i>desA2</i>	<i>Rv1093-Rv1094</i>	1221912C>A	1
<i>Rv1141c</i>	<i>echA11</i>	<i>Rv1141c-Rv1142c</i>	1269123T>G	1
<i>Rv1348</i>	<i>irtA</i>	<i>Rvnt19-Rv1348</i>	1512865A>G	1
<i>Rv1483</i>	<i>fabG1</i>	<i>Rv1482c-Rv1483</i>	1673432T>C	1
<i>Rv1747</i>	-	<i>Rv1747-Rv1748</i>	1976371G>A	2
		<i>Rv1747-Rv1748</i>	1976476C>T	3
<i>Rv1819c</i>	<i>bacA</i>	<i>Rv1819c-Rv1820</i>	2064741C>T	1
		<i>Rv1818c-Rv1819c</i>	2062805C>G	30
<i>Rv1886c</i>	<i>fbpB</i>	<i>Rv1886c-Rv1887</i>	2135870T>C	142
<i>Rv2006</i>	<i>otsB1</i>	<i>Rv2005c-otsB1</i>	2251999A>G	147
<i>Rv2243</i>	<i>fabD</i>	<i>Rv2242-Rv2243</i>	2516567G>C	36

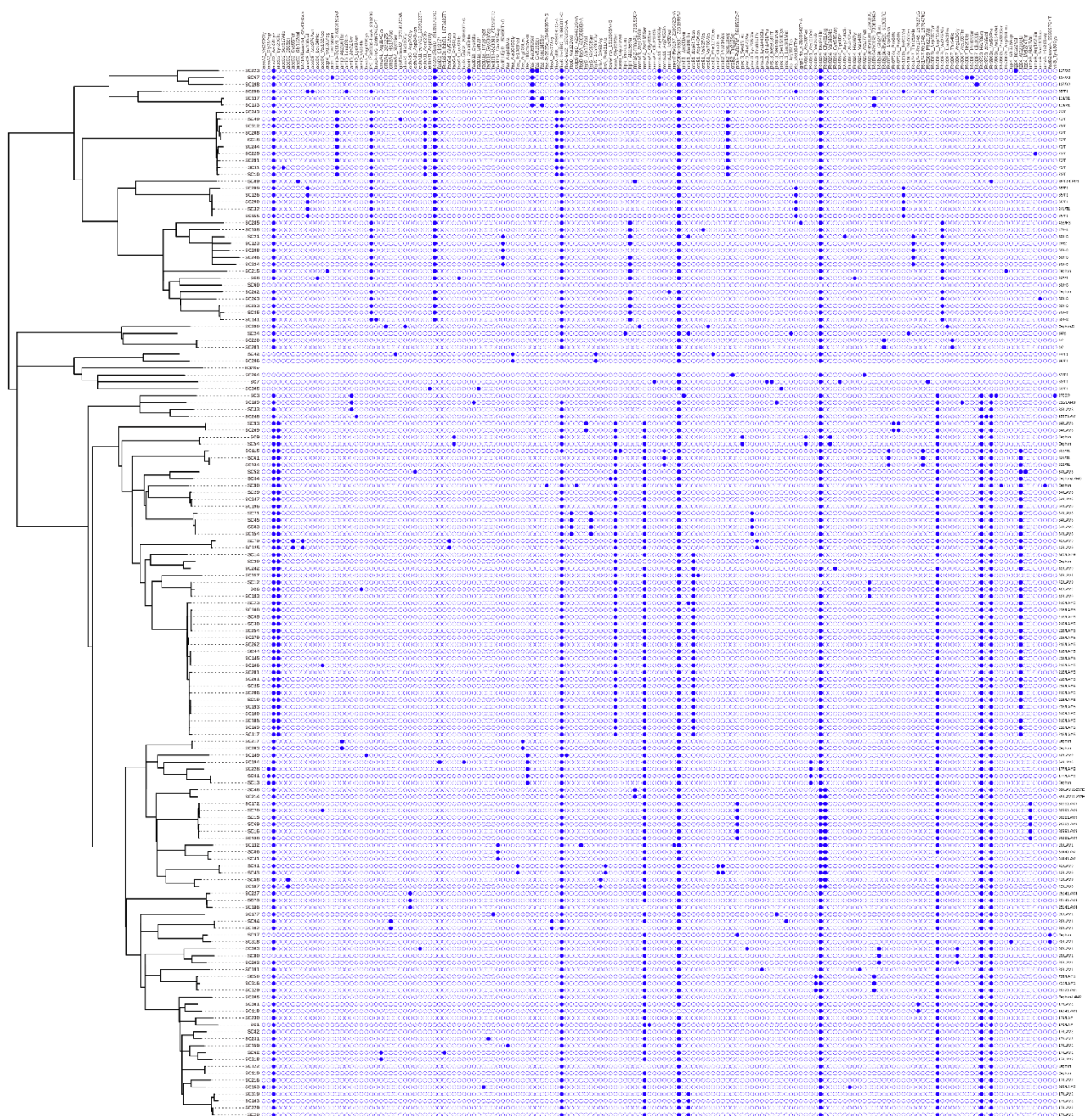
A análise filogenética realizada para os 151 isolados incluídos no estudo foi anotada com as mutações (SNPs e *indels*) associadas aos genes relacionados ao metabolismo dos AM encontradas e SIT/sublinhagem caracterizados por *Spoligotyping* (Figura 7). A análise mostra os isolados divididos em dois grandes grupos: o primeiro compreende os isolados das linhagens X, *Haarlem*, T (exceto os pertencentes aos SITs 53/T1 e 823/T1) e alguns isolados *Orphan/New* e *Unknow*; o segundo, isolados pertencentes a linhagem LAM, os SITs 53/T1 e 823/T1 e isolados

classificados como *Orphan/New*. Nesses dois grandes grupos, algumas estirpes apresentaram maior similaridade entre si. No primeiro grupo, foram observados subgrupos que apresentam alta similaridade: um subgrupo incluindo dez isolados pertencentes ao SIT 73/T; outro que englobava três isolados SIT 65/T1 e um isolado SIT 241/T1; e um terceiro, com três isolados do SIT 50/H3. No segundo grande grupo, também foram observados subgrupos que apresentavam grande similaridade: um subgrupo incluiu os 20 isolados pertencentes ao SIT 216/LAM5; outro, cinco isolados do SIT 3099/LAM9; um terceiro, incluindo quatro isolados do SIT 17/LAM2; formou-se um quarto subgrupo com dois isolados do SIT 729/LAM1 e um isolado do SIT 2512/LAM; também, um subgrupo com três isolados SIT 64/LAM6 e outro, com quatro isolados pertencentes a esse mesmo SIT; e um com três isolados SIT 823/T1. Todos os subgrupos de similaridade citados apresentaram uma ou nenhuma mutação de diferença entre as estirpes que os compunham.

As mutações encontradas com maior frequência foram *Rv2005c-otsB1* 2251999A>G (147/151), *Rv0194* Met74Thr (147/151), *accD2* Asn51Lys (143/151) e *fbpB-Rv1887* 2135870T>C (142/151). A mutação intergênica *Rv2005c-otsB1* 2251999A>G não apresentou relação com os SITs 1694/LAM2 (0/147; $p = 0,026$) e 2752/Unk (0/147; $p = 0,026$). A mutação *accD2* Asn51Lys (143/151) não possui relação com o SIT 53/T1 (0/143; $p < 0,001$). Já as outras mutações – *Rv0194* Met74Thr (147/151) e *fbpB-Rv1887* n.2135870T>C (142/151) – não apresentaram relação estatística com nenhum fator avaliado.

Três mutações encontradas com grande frequência entre os isolados avaliados, *Rv3057c* Asp112Ala (104/151), *Rv3720* His70Arg (104/151) e *Rv3802c* Val50Phe (105/151), estavam relacionadas com SITs pertencentes a linhagem LAM – 20/LAM1, 17/LAM2, 216/LAM5 e 64/LAM6 –, mas não com os SITs 50/H3, 73/T, 53/T1, 65/T1 e 137/X2. As três mutações ocorreram de forma concomitante em 104 estirpes.

Figura 7. Árvore filogenética de máxima verossimilhança para os 151 isolados de *M.tuberculosis* incluídos no estudo.



Esta árvore foi construída com base em 17.027 SNPs principais e é mostrada anotada com: SIT/sub-linhagem (a direita) e mutações em genes relacionados ao metabolismo de ácidos micólicos (na parte superior). Os círculos pintados na cor azul indicam as mutações que ocorreram em cada isolado. Legenda: LAM: Latin-American-Mediterranean; H: Haarlem. Fonte: a autora.

O SIT 20/LAM1, que representou 5,9% (9/151) das estirpes estudadas, apresentou relação com mutações dos genes *cmaA1* His173Arg ($p=0,003$), *fbpA* Pro77Arg ($p=0,003$), *Rv0519c* Gln271Leu ($p<0,001$), *Rv3057c* Asp112Ala ($p=0,024$), *Rv3087* Arg113Gly ($p<0,001$), *Rv3720* His70Arg ($p=0,031$) e *Rv3802c* Val50Phe ($p=0,034$) (Tabela 4). Onde todas as estirpes pertencentes a este SIT apresentaram mutações nos genes *Rv3057c* Asp112Ala, *Rv3720* His70Arg e *Rv3802c* Val50Phe, três destas, as mutações *Rv0519c* Gln271Leu e *Rv3087* Arg113Gly, e outras duas, mutações nos genes *cmaA1* His173Arg e *fbpA* Pro77Arg.

Tabela 4. Associação entre o SIT 20/LAM1 e mutações encontradas em genes relacionados ao metabolismo de AM.

Gene/Mutação	SIT 20/LAM1		<i>p</i> valor
	Sim (n=9)	Não (n=142)	
<i>cmaA1</i> His173Arg	Sim	2 (22,2%)	0,003
	Não	7 (77,8%)	
<i>fbpA</i> Pro77Arg	Sim	2 (22,2%)	0,003
	Não	7 (77,8%)	
<i>Rv0519c</i> Gln271Leu	Sim	3 (33,3%)	< 0,001
	Não	6 (66,7%)	
<i>Rv3057c</i> Asp112Ala	Sim	9 (100%)	0,024
	Não	0 (0%)	
<i>Rv3087</i> Arg113Gly	Sim	3 (33,3%)	< 0,001
	Não	6 (66,7%)	
<i>Rv3720</i> His70Arg	Sim	9 (100%)	0,031
	Não	0 (0%)	
<i>Rv3802c</i> Val50Phe	Sim	9 (100%)	0,034
	Não	0 (0%)	

O SIT encontrado com maior frequência foi o SIT 216/LAM5 (13,2%; 20/151). Todas as 20 estirpes apresentaram o mesmo padrão de mutação nos genes avaliados – 12 mutações distintas em 10 genes diferentes – estando associadas a mutações que ocorreram nos genes *accD2* Lys23Glu ($p<0,001$), *kasA* Gly269Ser ($p<0,001$), *mmaA4* Asn165Ser ($p<0,001$), *otsB1* Asp617Asn ($p<0,001$), *Rv3057c* Asp112Ala ($p<0,001$), *Rv3720* His70Arg ($p<0,001$), *Rv3802c* Val50Phe ($p<0,001$) e *tgS4* Ala216Glu ($p<0,001$) (Tabela 5). Este SIT não apresentou relação com mutações

encontradas nas regiões intergênicas *PE_PGRS33-bacA* 2062805C>G ($p=0,006$) e *Rv2242-fabD* 2516567G>C ($p=0,003$) (Tabela 5).

Tabela 5. Associação entre o SIT 216/LAM5 e mutações encontradas em genes relacionados ao metabolismo de AM.

Gene/Mutação	SIT 216/LAM5		<i>p</i> valor
	Sim (n=20)	Não (n=131)	
<i>accD2</i> Lys23Glu	Sim	20 (100%)	< 0,001
	Não	0 (0%)	
<i>kasA</i> Gly269Ser	Sim	20 (100%)	< 0,001
	Não	0 (0%)	
<i>mmaA4</i> Asn165Ser	Sim	20 (100%)	< 0,001
	Não	0 (0%)	
<i>otsB1</i> Asp617Asn	Sim	20 (100%)	< 0,001
	Não	0 (0%)	
<i>Rv3057c</i> Asp112Ala	Sim	20 (100%)	< 0,001
	Não	0 (0%)	
<i>Rv3720</i> His70Arg	Sim	20 (100%)	< 0,001
	Não	0 (0%)	
<i>Rv3802c</i> Val50Phe	Sim	20 (100%)	< 0,001
	Não	0 (0%)	
<i>tgs4</i> Ala216Glu	Sim	19 (95,0%)	< 0,001
	Não	1 (5,0%)	
<i>PE_PGRS33-bacA</i> 2062805C>G	Sim	0 (0%)	0,006
	Não	20 (100%)	
<i>Rv2242-fabD</i> 2516567G>C	Sim	0 (0%)	0,003
	Não	20 (100%)	

O SIT 64/LAM6 representou 7,3% (11/151) dos isolados, estando relacionado com variações nos genes *accD2* Lys23Glu ($p<0,001$), *fgd2* Ala122Val ($p=0,005$), *Rv0774c* Pro64fs ($p=0,005$), *fgd2* Gly323Ser, *kasA* Gly269Ser ($p<0,001$), *mmaA4* Asn165Ser ($p=0,006$), *pks13* Lys725Glu ($p<0,001$), *Rv0774c* Pro64fs ($p=0,005$), *Rv3057c* Asp112Ala ($p=0,010$), *Rv3720* His70Arg ($p=0,014$), *Rv3802c* Val50Phe ($p=0,016$) e *tgs4* Ala216Glu ($p<0,001$) (Tabela 6). Em dois dos 11 isolados foram observadas mutações nos genes *fgd2* Ala122Val e *Rv0774c* Pro64fs, as quais não foram observadas em nenhum outro isolado estudado; e outros quatro, nos genes

fgd2 Gly323Ser e *pks13* Lys725Glu, que foram observados exclusivamente nesses isolados.

Tabela 6. Associação entre o SIT 64/LAM6 e mutações encontradas em genes relacionados ao metabolismo de AM.

Gene/Mutação	SIT 64/LAM6		<i>p</i> valor
	Sim (n=11)	Não (n=140)	
<i>accD2</i> Lys23Glu	Sim	10 (90,9%)	< 0,001
	Não	1 (9,1%)	
<i>fgd2</i> Ala122Val	Sim	2 (18,2%)	0,005
	Não	9 (81,8%)	
<i>fgd2</i> Gly323Ser	Sim	4 (36,4%)	< 0,001
	Não	7 (63,6%)	
<i>kasA</i> Gly269Ser	Sim	10 (90,9%)	< 0,001
	Não	1 (9,1%)	
<i>mmaA4</i> Asn165Ser	Sim	11 (100%)	0,006
	Não	0 (0%)	
<i>pks13</i> Lys725Glu	Sim	4 (36,4%)	< 0,001
	Não	7 (63,6%)	
<i>Rv0774c</i> Pro64fs	Sim	2 (18,2%)	0,005
	Não	9 (81,8%)	
<i>Rv3057c</i> Asp112Ala	Sim	11 (100%)	0,010
	Não	0 (0%)	
<i>Rv3720</i> His70Arg	Sim	11 (100%)	0,014
	Não	0 (0%)	
<i>Rv3802c</i> Val50Phe	Sim	11 (100%)	0,016
	Não	0 (0%)	
<i>tgs4</i> Ala216Glu	Sim	8 (72,7%)	0,001
	Não	3 (27,3%)	

Os isolados pertencentes ao SIT 73/T representaram 6,6% (10/151) do total de isolados estudados. Esses isolados apresentaram um padrão de 12 mutações gênicas e intergênicas, sendo que as mutações *amiD-Rv3376* 3790075G>A ($p<0,001$), *fbpA-affB* 4266941G>A ($p<0,001$), *echA11* Asn220fs ($p<0,001$) e *otsB2* Ser110Arg ($p<0,001$) (Tabela 7) ocorreram exclusivamente nesses 10 isolados. Apresentaram, ainda, relação com as mutações *PE_PGRS33-bacA* 2062805C>G

($p < 0,001$) e *Rv2242-fabD* 2516567G>C ($p < 0,001$) (Tabela 7), as quais ocorreram, também, em isolados pertencentes as linhagens Haarlem, X, Unknwon e perfis órfãos/novos, mas não à linhagem LAM.

Tabela 7. Associação entre o SIT 73/T e mutações encontradas em genes relacionados ao metabolismo de AM.

Gene/Mutação		SIT 73/T		<i>p</i> valor
		Sim (n=10)	Não (n=141)	
<i>amiD-Rv3376</i> 3790075G>A	Sim	10 (100%)	0 (0%)	< 0,001
	Não	0 (0%)	141 (100%)	
<i>fbpA-afbB</i> 4266941G>A	Sim	10 (100%)	0 (0%)	< 0,001
	Não	0 (0%)	141 (100%)	
<i>echA11</i> Asn220fs	Sim	10 (100%)	0 (0%)	< 0,001
	Não	0 (0%)	141 (100%)	
<i>otsB2</i> Ser110Arg	Sim	10 (100%)	0 (0%)	< 0,001
	Não	0 (0%)	141 (100%)	
<i>PE_PGRS33-bacA</i> 2062805C>G	Sim	10 (%)	22 (15,6%)	< 0,001
	Não	0 (%)	119 (84,4%)	
<i>Rv2242-fabD</i> 2516567G>C	Sim	10 (%)	26 (18,4%)	< 0,001
	Não	0 (%)	115 (81,6%)	

O SIT 50/H3 (6,0%; 9/151) estava associado com as mutações *lipR* Ala156Val ($p < 0,001$) – ocorreu exclusivamente em isolados *Haarlem* e *unkwon* – e *Rv3057c* Val275Ala ($p < 0,001$), e em regiões intergênicas *PE_PGRS33-bacA* 2062805C>G ($p < 0,001$) e *Rv2242-fabD* 2516567G>C ($p < 0,001$) (Tabela 8). Apenas um dos nove isolados classificados com SIT 50/H3, não apresentou nenhuma dessas mutações.

Isolados do SIT 137/X2 (2,0%; 3/151) apresentaram associação com mutações nos genes *adhE1* Ile254Ser, *fabH* Gln182His ($p < 0,001$), *fas* Ala2699Ser ($p < 0,001$), *fas* Gly515Ser ($p = 0,020$), *mmpL11* Arg449Gly ($p < 0,001$), *Rv3087* 622_632delATCGAACGGGA Ile208fs ($p = 0,020$), *Rv3087* Pro65Ser ($p = 0,020$), *Rv2242-fabD* 2516567G>C ($p = 0,013$), não estando relacionados com as mutações *mmaA4* Asn165Ser, *Rv3057c* Asp112Ala, *Rv3720His*70Arg, *Rv3802c* Val50Phe (Tabela 9). A mutação *fabH* Gln182His foi encontrada exclusivamente no SIT 137/X2 e a mutação *fas* Ala2699Ser apresentou relação, também, com isolados SIT 119/X1 ($p = 0,001$), sendo encontrada quase que exclusivamente na linhagem X.

Tabela 8. Associação entre o SIT 50/H3 e mutações encontradas em genes relacionados ao metabolismo de AM.

Gene/Mutação		SIT 50/H		<i>p</i> valor
		Sim (n=9)	Não (n=142)	
<i>lipR</i> Ala156Val	Sim	7 (77,8%)	6 (4,2%)	< 0,001
	Não	2 (22,2%)	136 (95,8%)	
<i>Rv3057c</i> Val275Ala	Sim	8 (88,9%)	6 (4,2%)	< 0,001
	Não	1 (11,1%)	136 (95,8%)	
<i>PE_PGRS33-bacA</i> 2062805C>G	Sim	8 (88,9%)	24 (15,6%)	< 0,001
	Não	1 (11,1%)	118 (84,4%)	
<i>Rv2242-fabD</i> 2516567G>C	Sim	8 (88,9%)	28 (18,4%)	< 0,001
	Não	1 (11,1%)	114 (81,6%)	

A análise estatística demonstrou, ainda, associação entre o desfecho cujos indivíduos apresentaram cultura positiva após quatro meses e continuavam em tratamento após 12 meses e variações em diferentes genes e regiões intergênicas: *echA11* Asn220fs, *lipR* Pro43Leu, *otsB2* Ser110Arg, *rip* Arg351Trp, *Rv0194* Asp714Glu, *Rv1687c* Gly55Ser, *PE_PGRS33-bacA* 2062805C>G, *glyA1-desA2* 1221912C>A, *Rv2242-fabD* 2516567G>C e *fbpA-fftB* 4266941G>A. Mostrou, também, que este desfecho não está relacionado às mutações *mmaA4* Asn165Ser, *otsB1* Ala386Thr, *Rv3057c* Asp112Ala, *Rv3720* His70Arg e *Rv3802c* Val50Phe. Os valores de *p* são mostrados na Tabela 10.

Tabela 9. Associação entre o SIT 137/X2 e mutações encontradas em genes relacionados ao metabolismo de AM.

Gene/Mutação		SIT 137/X2		p valor
		Sim (n=3)	Não (n=148)	
<i>adhE1</i> Ile254Ser	Sim	1 (33,3%)	0 (0%)	0,020
	Não	2 (66,7%)	148 (100%)	
<i>fabH</i> Gln182His	Sim	3 (100%)	0 (0%)	< 0,001
	Não	0 (0%)	148 (100%)	
<i>fas</i> Ala2699Ser	Sim	3 (100%)	0 (0%)	< 0,001
	Não	0 (0%)	148 (100%)	
<i>fas</i> Gly515Ser	Sim	3 (100%)	3 (2,0%)	0,020
	Não	0 (0%)	145 (98,0%)	
<i>mmpL11</i> Arg449Gly	Sim	3 (100%)	0 (0%)	< 0,001
	Não	0 (0%)	148 (100%)	
<i>Rv3087</i> 622_632delATCGAACGG GA Ile208fs	Sim	1 (33,3%)	0 (0%)	0,020
	Não	2 (66,7%)	148 (100%)	
<i>Rv3087</i> Pro65Ser	Sim	1 (33,3%)	0 (0%)	0,020
	Não	2 (66,7%)	148 (100%)	
<i>Rv2242-fabD</i> 2516567G>C	Sim	3 (100%)	33 (22,3%)	0,013
	Não	0 (0%)	115 (77,7%)	
<i>mmaA4</i> Asn165Ser	Sim	0 (0%)	97 (65,5%)	0,044
	Não	3 (100%)	51 (34,5%)	
<i>Rv3057c</i> Asp112Ala	Sim	0 (0%)	101 (68,2%)	0,035
	Não	3 (100%)	47 (31,8%)	
<i>Rv3720</i> His70Arg	Sim	0 (0%)	104 (70,3%)	0,029
	Não	3 (100%)	44 (29,7%)	
<i>Rv3802c</i> Val50Phe	Sim	0 (0%)	105 (70,9%)	0,027
	Não	3 (100%)	43 (29,1%)	

Tabela 10. Associação entre desfecho desfavorável e mutações encontradas em genes relacionados ao metabolismo de AM.

Gene/Mutação		Desfecho		p valor
		Sim (n=4)	Não (n=147)	
<i>PE_PGRS33-bacA</i> 2062805C>G	Sim	3 (%)	28 (%)	0,027
	Não	1 (%)	119 (%)	
<i>glyA1-desA2</i> 1221912C>A	Sim	1 (%)	0 (%)	0,026
	Não	3 (%)	147 (%)	
<i>echA11</i> Asn220fs	Sim	2 (%)	8 (%)	0,022
	Não	2 (%)	139 (%)	
<i>Rv2242-fabD</i> 2516567G>C	Sim	3 (%)	33 (%)	0,042
	Não	1 (%)	114 (%)	
<i>fbpA-aftB</i> 4266941G>A	Sim	2 (%)	8 (%)	0,022
	Não	2 (%)	139 (%)	
<i>lipR</i> Pro43Leu	Sim	1 (%)	147 (%)	0,026
	Não	3 (%)	0 (%)	
<i>mmaA4</i> Asn165Ser	Sim	0 (%)	97 (%)	0,015
	Não	4 (%)	50(%)	
<i>otsB1</i> Ala386Thr	Sim	2 (%)	5 (%)	0,011
	Não	2 (%)	142 (%)	
<i>otsB2</i> Ser110Arg	Sim	2 (%)	8 (%)	0,022
	Não	2 (%)	139 (%)	
<i>rip</i> Arg351Trp	Sim	1 (%)	0 (%)	0,026
	Não	3 (%)	147 (%)	
<i>Rv0194</i> Asp714Glu	Sim	1 (%)	0 (%)	0,026
	Não	3 (%)	147 (%)	
<i>Rv1687c</i> Gly55Ser	Sim	1 (%)	0 (%)	0,026
	Não	3 (%)	147 (%)	
<i>Rv3057c</i> Asp112Ala	Sim	0 (%)	101 (%)	0,011
	Não	4 (%)	46 (%)	
<i>Rv3720</i> His70Arg	Sim	0 (%)	104 (%)	0,009
	Não	4 (%)	43 (%)	
<i>Rv3802c</i> Val50Phe	Sim	0 (%)	105 (%)	0,008
	Não	4 (%)	42 (%)	

6 DISCUSSÃO

Com a utilização de uma abordagem genômica, o presente estudo avaliou o perfil de mutações em genes envolvidos no metabolismo de AM em isolados de *M. tuberculosis* circulantes em Florianópolis e São José. Juntas, as cidades apresentam uma população de aproximadamente 700.000 habitantes (IBGE, 2019). Devido a importância do conhecimento do perfil molecular de estirpes de *M. tuberculosis* circulantes nessa região, este estudo vem complementar estudos de caracterização genotípica clássica (SCHEFFER, 2017) e, mais recentemente, o estudo de epidemiologia genômica sobre de *M. tuberculosis* na Grande Florianópolis (VERZA et al., 2020). Este é o primeiro estudo que avalia mutações em genes relacionados ao metabolismo de AM.

Embora *M. tuberculosis* exiba níveis extremamente baixos de diversidade genética (ACHTMAN, 2008), podemos observar que mesmo genes que são considerados essenciais para sua fisiologia podem estar sob seleção diversificada. O que pode acontecer com genes envolvidos no metabolismo de AM, uma vez que seu metabolismo é alvo de medicamentos utilizados no tratamento da TB (PEPPERELL et al., 2013; PORTEVIN et al., 2014). A utilização de abordagens baseadas em WGS possibilita a análise simultânea de genomas completos de várias estirpes, fornecendo uma quantidade de informações consideravelmente maior e mais precisas em comparação com os métodos tradicionais de genotipagem. O que permite capturar uma microevolução que, potencialmente, pode estar ocorrendo em outras regiões genômicas, que não as, altamente variáveis, utilizadas nas metodologias tradicionais (NIEMANN; SUPPLY, 2014; NIKOLAYEVSKYY et al., 2019).

Portevin e colaboradores (2014), buscando conhecer como o metabolismo de AM pode diferir entre as linhagens de *M. tuberculosis*, analisaram as sequências genômicas em 35 isolados clínicos do complexo *M. tuberculosis* englobando quatro linhagens filogenéticas principais (Linhagem 1, 2, 4 e 6) que, posteriormente, foram avaliadas junto a resultados de quantificação relativa de subtipos de AM. Nesse estudo foram encontradas variações significativas nos padrões de AM entre as linhagens, mostrando que os padrões de linhagens “antigas” contrastavam com os de linhagens “modernas”, e foram identificados polimorfismos de nucleotídeo único relevantes que puderam sustentar os padrões de AM específicos para as linhagens.

Em nosso estudo, os 151 isolados avaliados foram classificados como *Euro-American* da Linhagem 4. Dentre as linhagens principais, a Linhagem 4 é a que ocorre com frequência significativa em todos os continentes (DEMAY et al., 2012). Essa linhagem apresenta virulência aprimorada em macrófagos e modelos animais de infecção, observando-se grande variação entre as diferentes sublinhagens da Linhagem 4 (COSCOLLA; GAGNEUX, 2014, 2010). Estudos sugerem que a Linhagem 4 apresenta diversidade genética e fenotípica, o que pode determinar a epidemiologia de seus diferentes subtipos (COSCOLLA; GAGNEUX, 2014; STUCKI et al., 2016). LAM, T e Haarlem foram as famílias identificadas com maior frequência neste estudo, as quais também foram encontradas em outros estudos em Santa Catarina (NOGUEIRA et al., 2016; PRIM et al., 2015).

Oito mutações encontradas em isolados da Linhagem 4 por Portevin e colaboradores (2014), também estavam presentes nos isolados clínicos avaliados no presente estudo. Seis mutações - *accD2* Lys23Glu (46/151), *fas* Thr2595Asn (5/151), *kasA* Gly269Ser (46/151), *mmaA4* Asn165Ser (97/151), *Rv3057c* Asp112Ala (101/151) e *Rv3802c* Val50Phe (105/151) – foram encontradas com maior frequência em isolados da sublinhagem LAM. Essas mutações também estavam presentes na sublinhagem T1 e em isolados classificados como *Orphan*. Verza e colaboradores (2020) analisaram a distribuição do polimorfismo em *fbpC103* (marcador altamente específico para a família LAM) nas mesmas estirpes avaliadas neste estudo. A análise desse marcador confirmou a identificação de todos os isolados LAM identificados por *spoligotyping*, mas também classificou como LAM os três isolados que foram identificados por *spoligotyping* como SIT823/T1, os quais foram atribuídos à família T “ill-defined” de acordo com SITVIT2. E, quando observados na árvore filogenética (Figura 7), encontraram-se posicionados filogeneticamente como LAM. Além das mutações relacionadas a linhagem LAM, foram encontradas a mutação *fabH* Gln182His que apresentou associação com o SIT 137/X2, a qual foi encontrada apenas nesse SIT e a mutação *Rv3057c* Val275Ala que foi encontrada exclusivamente em isolados da linhagem Haarlem. Os resultados observados em nosso estudo corroboram com a diversidade substancial intralinhagem, no que se refere ao metabolismo lipídico, consistente com o elevado número de SNPs presentes em duas ou mais estirpes, mas não em toda linhagem, como observada no estudo de Portevin e colaboradores (2014).

Nosso estudo destacou tendências no perfil genômico relacionado ao metabolismo de AM, as quais foram compartilhadas por estirpes classificadas como pertencentes ao mesmo SIT e/ou sublinhagem. A análise filogenética mostrou haver diferença nas mutações apresentadas por estirpes classificadas como LAM em comparação com as sublinhagens T, Haarlem e X. Os isolados da sublinhagem LAM estavam relacionados à, principalmente, mutações em genes que estão mais relacionados à estruturação de AM. O gene *mmaA4*, que está relacionado a introdução de ramificação metil e grupo hidroxila adjacente na insaturação *cis* distal e que, quando deletado, inibiu a síntese de metoxi- e ceto-AM (ALAHARI et al., 2009; COXON et al., 2013), apresentou mutação encontrada em praticamente todos os isolados da linhagem LAM; esse gene foi relatado como sendo um determinante genético intrínseco de resistência compartilhado por diferentes antimicrobianos (isoniazida, etambutol, vancomicina e meropenem) (XU et al., 2017), o que poderia representar uma vantagem evolutiva para a sublinhagem LAM. O gene *kasA*, que produz enzima envolvida no alongamento inicial de AM por meio de uma reação de condensação (BHATT et al., 2007; KREMER et al., 2002; SLAYDEN; BARRY, 2002), quando apresentou a mutação Gly269Ser, mesma encontrada neste estudo, observou-se perda de estabilidade conformacional e alteração do comportamento dinâmico da proteína KasA (JAYARAMAN; RAJENDRA; RAMADAS, 2019). No estudo de Gande e colaboradores (2004), foi demonstrado que o gene *accD2* é fundamental para a biossíntese de AM, uma vez que fornece um intermediário carboxilado para a reação de condensação que é catalisada pela proteína produzida a partir do gene *pks13*. Essa condensação irá produzir α -alquil β -cetoácidos, precursores dos AM (GAVALDA et al., 2009). O gene *fbpA*, que codifica a proteína que catalisa a transferência de AM para produzir TMD (GOINS et al., 2018) e atua como proteína de ligação à fibronectina, responsável pela ligação ao macrófago humano durante a fase inicial de infecção (WILKINSON et al., 2001; ROMERO et al., 2010), assim como o *mmaA4*, também foi relatado como sendo um determinante genético intrínseco de resistência compartilhado pelos antimicrobianos isoniazida, etambutol e meropenem (XU et al., 2017). Em genes como o *fgd2*, que produz uma enzima desidrogenase que atua na oxidação de ácidos hidroximicólicos em ácidos cetomicólicos (PURWANTINI; MUKHOPADHYAY, 2013) e o *cmaA1*, relacionado com a cis-ciclopropanação na

posição distal dos α -micolatos (CHOUDHURY; PRIYAKUMAR; SASTRY, 2015), também foram encontradas mutações relacionadas à sublinhagem LAM.

O SIT encontrado com maior frequência neste estudo pertencia a sublinhagem LAM, o SIT 216/LAM5, que representou 13,3% de todos isolados. Esse SIT emergiu nos últimos anos na região estudada, tornando-se o mais frequente entre os isolados, indicando transmissão recente do bacilo. Em estudo realizado por Nogueira e colaboradores (2018), que avaliou isolados de todo o Estado nos anos de 2010 a 2012, o mesmo SIT representou 4,9% dos isolados e nenhum era proveniente da Grande Florianópolis. Todas as estirpes incluídas nesse SIT apresentaram o mesmo padrão de mutação nos genes avaliados, foram encontradas 12 mutações distintas em 10 genes diferentes, o que pode ter contribuído para a maior persistência dessa sublinhagem. Ressalta-se que, aproximadamente, 60% dos isolados pertencentes ao SIT 216/LAM5 apresentaram alta carga bacilar e foram associados a eles concentrações inibitórias mínimas mais altas para INH e RIF (SCHEFFER, 2017).

Foi possível observar mutações que ocorreram exclusivamente nos dez isolados classificados como SIT 73/T, sendo esse o SIT com maior número de indivíduos com baciloscopia positiva no quarto mês. Uma das mutações ocorreu no gene *otsB2* que é considerado essencial para o crescimento de *M. tuberculosis* e está relacionado com a formação de trealose, um constituinte estrutural importante da parede celular e que atua como carreador de AM durante a síntese da parede celular em *M. tuberculosis* (MURPHY et al., 2005; THANNA; SUCHECKA, 2016). O gene *lipR* apresentou mutação exclusiva nos isolados Haarlem e estava relacionado ao SIT 53/H3. Esse é um gene codificador de lipase de *M. tuberculosis*, que faz parte do operon *mymA* (Rv3083-Rv3089) que pode alterar o envelope do microrganismo no ambiente intracelular (COLE et al., 1998; KONG et al., 2007). Isolados do SIT 137/X2 apresentaram associação com a mutação detectada no gene *fabH*, o qual produz uma proteína que catalisa a primeira reação de condensação entre um acil-CoA e malonil-ACP que leva à formação da cadeia longa de AM (SACHDEVA; REYNOLDS, 2008), e no gene *fas*, o qual codifica uma enzima que catalisa a formação de ácidos graxos a partir de acetil-CoA, malonil-CoA e NADPH (COLE et al., 1998).

Tratamentos de TB mal sucedidos podem ocorrer devido a fatores de riscos independentes relacionados ao hospedeiro (COSTA-VIEGA; BRIZ; NUNES, 2017), mas também a fatores relacionados a micobactéria. Sambandan e colaboradores

(2013) demonstraram que mudanças na composição de AM da parede celular são de particular importância no contexto do tratamento da TB, uma vez que uma alteração na razão metoxi-AM para ceto-AM pode levar a uma suscetibilidade basal alterada a medicamentos anti-micobacterianos na ausência de mecanismos de resistência a medicamentos. Dentre os desfechos avaliados neste estudo, aquele no qual os indivíduos após quatro meses de tratamento ainda apresentavam cultura positiva para *M. tuberculosis* apresentou associação com mutações em genes relacionados ao metabolismo de AM. O gene *rip*, que regula a composição do envelope celular, crescimento e persistência *in vivo* de *M. tuberculosis* (MAKINOSHIMA; GLICKMAN, 2005), foi relatado como sendo um determinante genético intrínseco de resistência compartilhado pelos antimicrobianos rifampicina, vancomicina e meropenem (XU et al., 2017). Alguns dos genes foram considerados não essenciais para o crescimento *in vitro* da cepa H37Rv (GRIFFIN et al., 2011; DEJESUS et al., 2017) – *echA11*, parece estar ligado a oxidação de ácidos graxos (LEW et al., 2011); *lipR*, um gene codificador de lipase de *M. tuberculosis* (COLE et al., 1998); *Rv0194*, está envolvido no transporte ativo de medicamentos através da membrana e à resistência a múltiplos fármacos (DANILCHANCA et al., 2008); *Rv1687c*, parece estar envolvido no transporte ativo de substrato através da membrana, responsável pelo acoplamento de energia ao sistema de transporte (BRAIBANT; GILOT; CONTENT, 2000). O gene *otsB2*, considerado essencial para o crescimento de *M. tuberculosis*, está relacionado com a formação de trealose (MURPHY et al., 2005).

Um número grande de mutações intergênicas foram encontradas neste estudo e mostraram estar relacionadas a SIT/sublinhagens específicas. Pouco é estudado sobre essas mutações, inclusive SNPs intergênicos são frequentemente chamados de neutros evolutivos, porque, em média, seu efeito no fenótipo é menor, contudo, SNPs em regiões não codificantes podem ter importantes consequências funcionais (COSCOLLA; GAGNEUX, 2014).

Como a diversidade genética de *M. tuberculosis* é menos pronunciada do que em outros patógenos, o resultado variável do desfecho da infecção tem sido atribuído, principalmente, ao hospedeiro e a fatores ambientais. Contudo, sabe-se que a diversidade da cepa pode desempenhar um papel importante durante a infecção. Foi demonstrado que existem fenótipos metabólicos amplamente diferentes entre as linhagens do complexo *M. tuberculosis*. Estudos de correlação da variação genética

do complexo *M. tuberculosis* com o fenótipo foram bem sucedidos na identificação de mutações clinicamente prevalentes que conferem fenótipos fortes, como resistência aos medicamentos (HICKS et al., 2018). Destaca-se a importância de relacionar a variação genética a fenótipos mais sutis, como no estudo de Øyås e colaboradores (2020) que conseguiram prever os efeitos de SNPs em genes que codificam enzimas em fenótipos metabólicos e identificaram SNPs funcionais que se associam a vulnerabilidades metabólicas. Isso reforça a importância do estudo do perfil de mutações relacionadas ao metabolismo de AM, os quais poderão estar correlacionados a fenótipos mais sutis como os relacionados à adaptação ao hospedeiro, transmissibilidade e resistência basal, o que pode ser utilizado como uma possibilidade para a identificação de estratégias de tratamento mais seletivas.

7 CONCLUSÃO

O sequenciamento completo do genoma possibilitou identificar um repertório amplo de SNPs em genes relacionados ao metabolismo de AM em isolados de *M. tuberculosis* e descrever a variabilidade de mutações que ocorreram entre isolados de sublinhagens da Linhagem 4 circulantes na Grande Florianópolis, Santa Catarina.

Este estudo destacou tendências no perfil genômico relacionado ao metabolismo de AM, as quais foram compartilhadas por estirpes classificadas como pertencentes ao mesmo SIT e/ou sublinhagem. Foi possível observar diferença nos perfis de mutações apresentados por estirpes classificadas como LAM em comparação com as classificadas como T, Haarlem e X. Dentre as mutações que apresentaram associação estatística com isolados LAM, estavam mutações em genes que foram relatados como sendo determinantes genéticos intrínsecos de resistência à isoniazida e etambutol.

Com relação aos dados clínicos e epidemiológicos, as mutações avaliadas apresentaram associação significativa com o desfecho no qual os indivíduos após quatro meses de tratamento ainda apresentavam cultura positiva para *M. tuberculosis*. Um dos genes que apresentou relação com esse desfecho foi relatado como sendo um determinante genético intrínseco de resistência à rifampicina.

Este estudo forneceu informações sobre a relação de mutações em genes relacionados ao metabolismo de AM com desfechos de tratamento e as diferentes sublinhagens *Euro-American*. Demonstra uma diversidade substancial entre essas sublinhagens, no que se refere ao metabolismo de AM, o que pode estar relacionado a padrões fenotípicos específicos de AM.

8 PERSPECTIVAS

Como perspectiva deste estudo, está caracterizar fenotipicamente (qualitativa e quantitativa) os AM e correlacionar com os dados do sequenciamento completo do genoma, buscando prever o impacto funcional das mutações encontradas neste estudo.

REFERÊNCIAS

- ACHTMAN, M. Evolution, Population Structure, and Phylogeography of Genetically Monomorphic Bacterial Pathogens. **Annual Review of Microbiology**, v. 62, p. 53–70, 2008.
- ALAHARI, A.; ALIBAUD, L.; TRIVELLI, X.; GUPTA, R.; LAMICHHANE, G.; REYNOLDS, R. C.; BISHAI, W. R.; GUERARDEL, Y.; KREMER, L. Mycolic acid methyltransferase, MmaA4, is necessary for thiacetazone susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 1263-77, 2009.
- ALLIX, C.; SUPPLY, P.; FAUVILLE-DUFAUX, M. Utility of fast mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat genotyping in clinical mycobacteriological analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 6, p. 783-789, 2004.
- ARNOLD, C. Molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 12, p. 120-128, 2006.
- BALCELLS, M. E.; GARCÍA, P.; MEZA, P.; PEÑA, C.; CIFUENTES, M.; COUVIN, D.; RASTOGI, N. A First Insight on the Population Structure of Mycobacterium tuberculosis Complex as Studied by Spoligotyping and MIRU-VNTRs in Santiago, Chile. **Plos One**, 2015.
- BANERJEE, A.; DUBNAU, E.; QUEMARD, A.; BALASUBRAMANIAN, V.; UM, K. S.; WILSON, T.; COLLINS, D.; DE LISLE, G.; JACOBS JR, W. R. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 263, p. 227–230, 1994.
- BARKAN, D.; RAO, V.; SUKENICK, G. D.; GLICKMAN, M. S. Redundant Function of *cmaA2* and *mmaA2* in *Mycobacterium tuberculosis* cis Cyclopropanation of Oxygenated Mycolates. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 14, p. 3661–3668, 2010.
- BARNES, P. F.; CAVE, M. D. Molecular epidemiology of tuberculosis. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 12, p. 1149–1156, 2003.
- BARRERA, L. Chapter 3: The Basics of Clinical Bacteriology. In: PALOMINO, Juan Carlos; LEÃO, Sylvia Cardoso; RITACCO, Viviana (Ed.). Tuberculosis 2007: From basic science to patient care. Antuérpia, São Paulo, Buenos Aires, 2007.
- BARRY, C. E. 3RD; LEE, R. E.; MDLULI, K.; SAMPSON, A. E.; SCHROEDER, B. G.; SLAYDEN, R. A.; YUAN, Y. Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. **Progress in Lipid Research**, v. 37, p. 143–179, 1998.
- BATTAGLIOLI, T.; SOTO, A.; AGAPITO, J.; ACURIO, V.; VAN DER STUYFT, P. Manual liquid culture on simple Middlebrook 7H9 or MGIT for the diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. **Tropical Medicine & International Health**, v. 19, n. 12, p. 1500-3, 2014.

BEHJATI, S.; TARPEY, P. S. What is next generation sequencing? **Archives of Disease in Childhood - Education and Practice**, v. 98, p. 236–238, 2013.

BESRA, G. S.; SIEVERT, T.; LEE, R. E.; SLAYDEN, R. A.; BRENNAN, P. J.; TAKAYAMA, K. Identification of the apparent carrier in mycolic acid synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 26, p. 12735-9, 1994.

BHATT, A.; MOLLE, V.; BESRA, G. S.; JACOBS, W. R.; KREMER, L. The *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II condensing enzymes: their role in mycolic acid biosynthesis, acid-fastness, pathogenesis and in future drug development. **Molecular Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 1442-54, 2007.

BLOCH, K. Control mechanisms for fatty acid synthesis in *Mycobacterium smegmatis*. **Advances in Enzymology - and Related Areas of Molecular Biology**, v. 45, p. 1–84, 1977.

BLOOM, B. R.; ATUN, R.; COHEN, T.; DYE, C.; FRASER, H.; GOMEZ, G. B.; KNIGHT, G.; MURRAY, M.; NARDELL, E.; RUBIN, E.; SALOMON, J.; VASSALL, A.; VOLCHENKOV, G.; WHITE, R.; WILSON, D.; YADAV, P. Tuberculosis. In: HOLMES, K, K.; BERTOZZI, S.; BLOOM, B. R.; JHA, P.; editors. Major Infectious Diseases. 3rd ed. Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank. Chapter 11, 2017.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, 2014.

BORGDORFF, M. W.; VAN SOOLINGEN, D. The re-emergence of tuberculosis: what have we learnt from molecular epidemiology? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 10, p. 889–901, 2013.

BOS, K. I.; HARKINS, K. M.; HERBIG, A.; COSCOLLA, M.; WEBER, N.; COMAS, I.; FORREST, S. A.; BRYANT, J. M.; HARRIS, S. R.; SCHUENEMANN, V. J.; CAMPBELL, T. J.; MAJANDER, K.; WILBUR, A. K.; GUICHON, R. A.; STEADMAN, D. L. W.; COOK, D. C.; NIEMANN, S.; BEHR, M. A.; ZUMARRAGA, M.; BASTIDA, R.; HUSON, D.; NIESELT, K.; YOUNG, D.; JULIAN PARKHILL, J.; BUIKSTRA, J. E.; GAGNEUX, S.; STONE, A. C.; KRAUSE, J. Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. **Nature**, v. 514, n. 7523, p. 494-7, 2014.

BOYLES, T. H.; HUGHES, J.; COX, V.; BURTON, R.; MEINTJES, G.; MENDELSON, M. False-positive Xpert® MTB/RIF assays in previously treated patients: need for caution in interpreting results. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 18, n. 7, p. 876-8, 2014.

BRAIBANT, M.; GILOT, P.; CONTENT, J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 449-467, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico: Tuberculose 2020. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. 1.ed. Brasília, 2008. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_laboratorial_tubertuber t.pdf. Acesso em mai/2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília, DF, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. 1.ed. Brasília, 2011a. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/TB/mat_tec/manuais/MS11_Manual_Recom.pdf. Acesso em dez/2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Tratamento diretamente observado (TOD) da tuberculose na atenção básica. 1.ed. Brasília, 2011b. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/tratamento_diretamente_observado_tuber culose.pdf. Acesso em out/2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. 2ªed. Brasília, 2019.

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

BRENNAN, P. J.; NIKAIIDO, H. The envelope of mycobacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, p. 29-63, 1995.

BRUDEY, K.; DRISCOLL, J. R.; RIGOUTS, L.; PRODINGER, W. N.; GORI, A.; AL-HAJOI, S. A.; ALLIX, C.; ARISTIMUÑO, L.; ARORA, J.; BAUMANIS, V.; BINDER, L.; CAFRUNE, P.; CATALDI, A.; CHEONG, S.; DIEL, R.; ELLERMEIER, C.; EVANS, J. T.; FAUVILLE-DUFAUX, M.; FERDINAND, S.; de VIEDMA, D. G.; GARZELLI, C.; GAZZOLA, L.; GOMES, H. M.; GUTTIEREZ, M. C.; HAWKEY, P. M.; van HELDEN, P. D.; KADIVAL, G. V.; KREISWIRTH, B. N.; KREMER, K.; KUBIN, M.; KULKARNI, S. P.; LIENS, B.; LILLEBAEK, T.; LY, H. M.; MARTIN, C.; MARTIN, C.; MOKROUSOV, I.; NARVSKAĀ, O.; NGEOW, Y. F.; NAUMANN, L.; NIEMANN, S.; PARWATI, I.; RAHIM, Z.; RASOLOFORAZANAMPARANY, V.; RASOLONAVALONA, T.; ROSSETTI, M. L.; RÜSCH-GERDES, S.; SAJDUDA, A.; SAMPER, S.; SHEMYAKIN, I. G.; SINGH, U. B.; SOMOSKOVI, A.; SKUCE, R. A.; van SOOLINGEN, D.; STREICHER, E. M.; SUFFYS, P. N.; TORTOLI, E.; TRACEVSKA, T.; VINCENT, V.; VICTOR, T. C.; WARREN, R. W.; YAP, S. F.; ZAMAN, K.; PORTAELS, F.; RASTOGI, N.; SOLA, C. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. **BMC Microbiology**, v. 6, n. 23, 2006.

BRYNILDSRUD, O. B.; PEPPERELL, C. S.; SUFFYS, P.; GRANDJEAN, L.; MONTESERIN, J.; DEBECH, N.; BOHLIN, J.; ALFSNES, K.; PETTERSSON, J. O. H.; KIRKELEITE, I.; FANDINHO, F.; DA SILVA, M. A.; PERDIGAO, J.; PORTUGAL, I.; VIVEIROS, M.; CLARK, T.; CAWS, M.; DUNSTAN, S.; THAI, P. V. K.; LOPEZ, B.; RITACCO, V.; KITCHEN, A.; BROWN, T. S.; VAN SOOLINGEN, D.; O'NEILL, M. B.; HOLT, K. E.; FEIL, E. J.; MATHEMA, B.; BALLOUX, F.; ELDHOLM, V. Global expansion of *Mycobacterium tuberculosis* lineage 4 shaped by colonial migration and local adaptation. **Science Advances**, 4, n. 10, p. 1-12, 2018.

BURRIL, J. Tuberculosis: A radiologic review. **Radiographics**, Easton, v. 27, p. 1255-1273, 2007.

BUTLER, W. R.; GUTHERTZ, L. S. Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of *Mycobacterium* species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, p. 704–726, 2001.

CAMPBELL, J. R.; KROT, J.; ELWOOD, K.; COOK, V.; MARRA, F. A Systematic Review on TST and IGRA Tests Used for Diagnosis of LTBI in Immigrants. **Molecular Diagnosis & Therapy**, 2015.

CAMPOS, H. S. Etiopatologia da tuberculose e formas clínicas. *Pulmão*, v. 15, p. 29-35, 2006.

CANDIA, N.; LOPEZ, B.; ZOZIO, T.; CARRIVALE, M.; DIAZ, C.; RUSSOMANDO, G.; DE ROMERO, N. J.; JARA, J. C.; BARRERA, L.; RASTOGI, N.; RITACCO, V. First insight into *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity in Paraguay. **BMC Microbiology**, v. 7, n. 75, 2007.

CDC - Centers for disease control and prevention. Core Curriculum on Tuberculosis, Chapter 2: Transmission and Pathogenesis of Tuberculosis. Sixth edition, 2013. Disponível em: <http://www.cdc.gov/tb/education/corecurr/pdf/chapter2.pdf>. Acesso em out/2020.

CDC - Centers for disease control and prevention. Latent Tuberculosis Infection: A Guide for Primary Health Care Providers. 2014. Disponível em: <http://www.cdc.gov/tb/publications/ltbi/diagnosis.htm>. Acesso em mar/2020.

CEREZO, I.; JIMÉNEZ, Y.; HERNANDEZ, J.; ZOZIO, T.; MURCIA, M. I.; RASTOGI, N. A first insight on the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* complex as studied by spoligotyping and MIRU-VNTRs in Bogotá, Colombia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 4, p. 657-663, 2012.

CHAN, E. D.; ISEMAN, M. D. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a review. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, n. 6, p. 587-595, 2008.

CHEGOU, N. N.; HOEK, K. G. P.; KRIEL, M.; WARREN, R. M.; VICTOR, T. C.; WALZL, G. Tuberculosis assays: past, present and future. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 9, n. 4, p. 457–469, 2011.

CHENG, V. C. C.; YEW, W. W.; YUEN, K. Y. Molecular diagnostics in tuberculosis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 24, p. 711–720, 2005.

CHERIAN, A.; THOMAS, S. V. Central nervous system tuberculosis. **African Health Sciences**, v. 11, n. 1, 2011.

CHIEN, H. P.; YU, M. C.; WU, M. H.; LIN, T. P.; LUH, K. T. Comparison of the BACTEC MGIT 960 with Löwensteins-Jensen medium for recovery of mycobacteria from clinical specimens. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 4, n. 9, p. 866-870, 2000.

CHOUDHURY, c.; PRIYAKUMAR, u. d.; SASTRY, g. n. Dynamics Based Pharmacophore Models for Screening Potential Inhibitors of Mycobacterial Cyclopropane Synthase. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2015.

CINGOLANI, P.; PLATTS, A.; WANG LE, L.; COON, M.; NGUYEN, T.; WANG, L.; LAND, S. J.; LU, X.; RUDEN, D. M. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. **Fly**, v. 6, n. 2, 2012.

COLE, S. T.; BROSCHE, R.; PARKILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S. V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY III, C. E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; KROGH, A.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M. A.; RAJ NDREAM, M. A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, J.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J. E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, p. 537-544, 1998.

COLL, F.; MCNERNEY, R.; GUERRA-ASSUNÇÃO, J. A.; GLYNN, J. R.; PERDIGÃO, J.; VIVEIROS, M.; PORTUGAL, I.; PAIN, A.; MARTIN, N.; CLARK, T. G. A robust SNP barcode for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. **Nature Communications**, v. 5, n. 4812, 2014.

COMAS, I.; COSCOLLA, M.; LUO, T.; BORRELL, S.; HOLT, K. E.; KATO-MAEDA, M.; PARKHILL, J.; MALLA, B.; BERG, S.; THWAITES, G.; YEBOAH-MANU, D.; BOTHAMLEY, G.; MEI, J.; WEI, L.; BENTLEY, S.; HARRIS, S. R.; NIEMANN, S.; DIEL, R.; ASEFFA, A.; GAO, Q.; YOUNG, D.; GAGNEUX, S. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. **Nature Genetics**, v. 45, n. 10, p. 1176-1182, 2013.

COSCOLLA, M.; GAGNEUX, S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. **Seminars in Immunology**, v. 26, p. 431-444, 2014.

COSCOLLA, M.; GAGNEUX, S. Does *M. tuberculosis* genomic diversity explain disease diversity? **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 7, p. 43–59, 2010.

COSTA-VEIGA, A.; BRIZ, T.; NUNES, C. Unsuccessful treatment in pulmonary tuberculosis: factors and a consequent predictive model. **The European Journal of Public Health**, v. 28, n. 2, p. 352–358, 2017.

COUVIN, D.; DAVID, A.; ZOZIO, T.; RASTOGI, N. Macro-geographical specificities of the prevailing tuberculosis epidemic as seen through SITVIT2, an updated version of the *Mycobacterium tuberculosis* genotyping database. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 72, p. 31-43, 2019.

COXON, G. D.; CRAIG, D.; CORRALES, R. M.; VIALLA, E.; GANNOUN-ZAKI, L.; KREMER, L. Synthesis, Antitubercular Activity and Mechanism of Resistance of Highly Effective Thiacetazone Analogues. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

CRyPTIC Consortium and the 100,000 Genomes Project, ALLIX-BEGUEC, C.; ARANDJELOVIC, I.; BI, L.; BECKERT, P.; BONNET, M.; BRADLEY, P.; CABIBBE, A. M.; CANCINO-MUÑOZ, I.; CAULFIELD, M. J.; CHAIPRASERT, A.; CIRILLO, D. M.; CLIFTON, D. A.; COMAS, I.; CROOK, D. W.; DE FILIPPO, M. R.; DE NEELING, H.; DIEL, R.; DROBNIIEWSKI, F. A.; FAKSRI, K.; FARHAT, M. R.; FLEMING, J.; FOWLER, P.; FOWLER, T. A.; GAO, Q.; GARDY, J.; GASCOYNE-BINZI, D.; GIBERTONI-CRUZ, A. L.; GIL-BRUSOLA, A.; GOLUBCHIK, T.; GONZALO, X.; GRANDJEAN, L.; HE, G.; GUTHRIE, J. L.; HOOSDALLY, S.; HUNT, M.; IQBAL, Z.; ISMAIL, N.; JOHNSTON, J.; KHANZADA, F. M.; KHOR, C. C.; KOHL, T. A.; KONG, C.; LIPWORTH, S.; LIU, Q.; MAPHALALA, G.; MARTINEZ, E.; MATHYS, V.; MERKER, M.; MIOTTO, P.; MISTRY, N.; MOORE, D. A. J.; MURRAY, M.; NIEMANN, S.; OMAR, S. V.; ONG, R. T.; PETO, T. E. A.; POSEY, J. E.; PRAMMANANAN, T.; PYM, A.; RODRIGUES, C.; RODRIGUES, M.; RODWELL, T.; ROSSOLINI, G.; SÁNCHEZ PADILLA, E.; SCHITO, M.; SHEN, X.; SHENDURE, J.; SINTCHENKO, V.; SLOUTSKY, A.; SMITH, E. G.; SNYDER, M.; SOETAERT, K.; STARKS, A. M.; SUPPLY, P.; SURIYAPOL, P.; TAHSEEN, S.; TANG, P.; TEO, Y. Y.; THUONG, T. N. T.; THWAITES, G.; TORTOLI, E.; VAN SOOLINGEN, D.; WALKER, A. S.; WALKER, T. M.; WILCOX, M.; WILSON, D. J.; WYLLIE, D.; YANG, Y.; ZHANG, H.; ZHAO, Y.; ZHU, B. Prediction of susceptibility to first-line tuberculosis drugs by DNA sequencing. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 15, p. 1403-1415, 2018.

CUBILLOS-RUIZ, A.; MORALES, J.; ZAMBRANO, M. M. Analysis of the genetic variation in *Mycobacterium tuberculosis* strains by multiple genome alignments. **BMC research notes**, v. 1, p. 110, 2008.

DAFFÉ, M.; DRAPER, P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. **Advances in Microbial Physiology**, v. 39, p. 131–203, 1998.

DANILCHANKA, O.; MAILAENDER, C.; NIEDERWEIS, M. Identification of a Novel Multidrug Efflux Pump of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 7, p. 2503–2511, 2008.

DE KEYSER, E.; DE KEYSER, F.; DE BAETS, F. Tuberculin skin test versus interferon-gamma release assays for the diagnosis of tuberculosis infection. **Acta Clinica Belgica**, v. 69, n. 5, p. 358-66, 2014.

DEJESUS, M. A.; GERRICK, E. R.; XU, W.; PARK, S. W.; LONG, J. E.; BOUTTE, C. C.; RUBIN, E. J.; SCHNAPPINGER, D.; EHRT, S.; FORTUNE, S. M.; SASSETTI, C. M.; IOERGER, T. R. Comprehensive Essentiality Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Genome via Saturating Transposon Mutagenesis. **mBio**, v. 8, n. 1, 2017.

DEMAY, C.; LIENS, B.; THOMAS BURGUIÈRE, T.; VÉRONIQUE HILL, V.; DAVID COUVIN, D.; MILLET, J.; MOKROUSOV, I.; SOLA, C.; ZOZIO, T.; RASTOGI, N. SITVITWEB – A publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 755–766, 2012.

DESIKAN, P. Sputum smear microscopy in tuberculosis: Is it still relevant? **Indian Journal of Medical Research**, v.137, p. 442-444, 2013.

DRUSZCZYNSKA, M.; WAWROCKI, S.; SZEWCZYK, R.; RUDNICKA, W. Mycobacteria-derived biomarkers for tuberculosis diagnosis. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 146, p. 700-707, 2017.

DUBNAU, E.; CHAN, J.; RAYNAUD, C.; MOHAN, V. P.; LANÉELLE, M. A.; YU, K.; QUÉMARD, A.; SMITH, I.; DAFFÉ, M. Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. **Molecular Microbiology**, v. 36, p. 630–637, 2000.

ELDHOLM, V.; MONTESERIN, J.; RIEUX, A.; LOPEZ, B.; SOBKOWIAK, B.; RITACCO, V.; AND BALLOUXB, F. Four decades of transmission of a multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* outbreak strain. **Nature Communications**, v. 6, p. 7119, 2015.

EUZEBY, J. P. 2014a. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>. Acesso em out/2020.

FAY, A.; CZUDNOCHOWSKI, N.; ROCK, J. M.; JOHNSON, J. R.; KROGAN, N. J.; ROSENBERG, O.; GLICKMANA, M.S. Two Accessory Proteins Govern MmpL3 Mycolic Acid Transport in Mycobacteria. **mBio**, v. 10, n. 3, 2019.

FEUERRIEGEL, S.; CLAUDIO, U. K.; STEFAN, N. Phylogenetic polymorphisms in antibiotic resistance genes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 5, p. 1205–1210, 2014.

FILLIOL, I.; MOTIWALA, A. S.; CAVATORE, M.; QI, W.; HAZBÓN, M. H.; DEL VALLE, M. B.; FYFE, J.; GARCÍA-GARCÍA, L.; RASTOGI, N.; SOLA, C.; THIERRY ZOZIO, T.; GUERRERO, M. I.; LEÓN, C. I.; CRABTREE, J.; ANGIUOLI, S.; EISENACH, K. D.; DURMAZ, R.; JOLOBA, M. L.; RENDÓN, A.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; DE LEÓN, A. P.; CAVE, M. D.; FLEISCHMANN, R.; WHITTAM, T. S.; ALLAND, D. Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into Tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 2, p. 759–772. 2006.

FORD, C. B.; SHAH, R.R.; MAEDA, M. K.; GAGNEUX, S.; MURRAY, M. B.; COHEN, T.; JOHNSTON, J. C.; GARDY, J.; LIPSITCH, M.; FORTUNE, S. M. *Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis. **Nature Genetics**, v. 45, n. 7, p. 784–790, 2013.

FOULDS, J.; O'BRIEN, R. New tools for the diagnosis of tuberculosis: the perspective of developing countries. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 2, p. 778-783, 1998.

FOXMAN, B.; RILEY, L. Molecular epidemiology: focus on infection. **American Journal of Epidemiology**, 153, n. 12, p. 1135-1141, 2001.

GAGNEUX S.; DERIEMER, K.; VAN, T.; KATO-MAEDA, M.; DE JONG, B. C.; NARAYANAN, S.; NICOL, M.; NIEMANN, S.; KREMER, K.; GUTIERREZ, M. C.; HILTY, M.; HOPEWELL, P. C.; SMALL, P. M. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 2869–2873, 2006.

GAGNEUX, S.; PETER, M. S. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 5, p. 328–337, 2007.

GAGNEUX, S.; SMALL, P. M. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. **Lancet Infectious Diseases**, 7, n. 5, p. 328-337, 2007.

GALAGAN, J. E. Genomic insights into tuberculosis. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, n. 5, p. 307-320, 2014.

GANDE, R.; GIBSO, K. J. C.; BROWN, A. K.; KRUMBACH, K.; DOVER, L. G.; SAHM, H.; SHIOYAMA, S.; OIKAWA, T.; BESRA, G. S.; EGGELING, L. Acyl-CoA Carboxylases (accD2 and accD3), Together with a Unique Polyketide Synthase (Cg-pks), Are Key to Mycolic Acid Biosynthesis in Corynebacteriaceae Such as *Corynebacterium glutamicum* and *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 43, p. 44847–44857, 2004.

GARCÍA-ALCALDE, F.; OKONECHNIKOV, K.; CARBONELL, J.; CRUZ, L. M.; GÖTZ, S.; TARAZONA, S.; DOPAZO, J.; MEYER, T. F.; CONESA, A. Qualimap: evaluating next-generation sequencing alignment data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 20, p. 2678-9, 2012.

GAVALDA, S.; LÉGER, M.; van der REST, B.; STELLA, A.; BARDOU, F.; MONTROZIER, H.; CHALUT, C.; BURLET-SCHILTZ, O.; MARRAKCHI, H.; DAFFÉ, M.; QUEMARD, A. The Pks13/FadD32 Crosstalk for the Biosynthesis of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 29, p. 19255–19264, 2009.

GLICKMAN, M. S. The *mmaA2* gene of *Mycobacterium tuberculosis* encodes the distal cyclopropane synthase of the alpha-mycolic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 7844-9, 2003.

GLICKMAN, M. S.; COX, J. S.; JACOBS, W. R. A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Cell**, v. 5, p. 717–727, 2000.

GOINS, C. M.; DAJNOWICZ, S.; SMITH, M. D.; PARKS, J. M.; RONNING, D. R. Mycolyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* in covalent complex with tetrahydrolipstatin provides insights into antigen 85 catalysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 10, p. 3651-3662, 2018.

GOMES, H.M.; ELIAS, A.R.; OELEMANN, M.A.; PEREIRA, M.A.; MONTES, F.F.; MARSICO, A.G.; KRITSKI, A.L.; FILHO, L. A.; CALDAS, P.C.; POSSUELO, L.G.; CAFRUNE, P.; ROSSETTI, M.L.; LUCENA, N.; SAAD, M.H.; CAVALCANTI, H. R.; LEITE, C.Q.; DE BRITO, R.C.; LIMA, K.; LOPES, M.L.; SOUZA, M.; TRINDADE, R. C.; ZOZIO, T.; SOLA, C.; RASTOGI, N.; SUFFYS, P.N. Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from patients residents of 11 states of Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 649–656, 2012.

GOULDING, J. N.; STANLEY, J.; SAUDERS, N.; ARNOLD, C. Genome-sequence-based fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n.3, p. 1121-1126, 2000.

GOUY, M.; GUINDON, S.; GASCUEL, O. Sea view version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 2, p. 221–224, 2010.

GOYAL, M.; SAUNDERS, N. A.; van EMBDEN, J. D.; YOUNG, D. B.; SHAW, R. J. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 647-651, 1997.

GRIFFIN, J. E.; GAWRONSKI, J. D.; DEJESUS, M. A.; IOERGER, T. R.; AKERLEY, B. J.; SASSETTI, C. M. High-Resolution Phenotypic Profiling Defines Genes Essential for *Mycobacterial* Growth and Cholesterol Catabolism. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 9, 2011.

GROENEWALD, W.; BAIRD, M. S.; VERSCHOOR, J. A.; MINNIKIN, D. E.; CROFT, A. K. Differential spontaneous folding of mycolic acids from *Mycobacterium tuberculosis*. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 180, p. 15–22, 2014.

GRÖSCHEL, M. I.; WALKER, T. M.; van der WERF, T. S.; LANGE, C.; NIEMANN, S.; MERKER, M. Pathogen-based precision medicine for drug-resistant tuberculosis. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 10, 2018.

GRZEGORZEWICZ, A. E.; PHAM, H.; GUNDI, V. A.; SCHERMAN, M. S.; NORTH, E. J.; HESS, T.; JONES, V.; GRUPPO, V.; BORN, S. E.; KORDULÁKOVÁ, J.; CHAVADI, S. S.; MORISSEAU, C.; LENAERTS, A. J.; LEE, R. E.; MCNEIL, M. R.;

- JACKSON, M. Inhibition of mycolic acid transport across the *Mycobacterium tuberculosis* plasma membrane. **Nature Chemical Biology**, v. 8, p. 334–341, 2012.
- GUENIN-MACE, L.; SIMEONE, R.; DEMANGEL, C. Lipids of pathogenic Mycobacteria: contributions to virulence and host immune suppression. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 56, p. 255-268, 2009.
- GUTIERREZ, R. S.; SANTOS, B. R.; ESPINA, C. A. A.; AZAMBUJA, H. C. P.; SILVA, L. C. C. Tuberculose. In: SILVA, L. C. C. *Conduas em pneumologia*. Rio de Janeiro (RJ): Revinter, v.1, 2001.
- HETT, E.; RUBIN, E.J. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 1, p. 126-56, table of contents, 2008.
- HICKS, N. D.; YANG, J.; ZHANG, X.; ZHAO, B.; GRAD, Y. H.; LIU, L.; OU, X.; CHANG, Z.; XIA, H.; ZHOU, Y.; WANG, S.; DONG, J.; SUN, L.; ZHU, Y.; ZHAO, Y.; JIN, Q.; FORTUNE, S. M. Clinically prevalent mutations in *Mycobacterium tuberculosis* alter propionate metabolism and mediate multidrug tolerance. **Nature Microbiology**, v. 3, p. 1032-1042, 2018.
- HOFFMANN, C.; LEIS, A.; NIEDERWEIS, M.; PLITZKO, J.M.; ENGELHARDT, H. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 10, p. 3963–3967, 2008.
- IBGE. Cidades. Panorama. <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/panorama>. 2019.
- JACKSON, M.; RAYNAUD, C.; LANÉELLE, M. A.; GUILHOT, C.; LAURENT-WINTER, C.; ENSERGUEIX, D.; GICQUEL, B.; DAFFÉ, M. Inactivation of the antigen 85C gene profoundly affects the mycolate content and alters the permeability of the *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. **Molecular Microbiology**, v. 31, n. 5, p. 1573-87, 1999.
- JAGIELSKI, T.; VAN INGEN, J.; RASTOGI, N.; DZIADEK, J.; MAZUR, P. K.; BIELECKI, J. Current methods in the molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–21, 2014.
- JHINGAN, G. D.; KUMARI, S.; JAMWAL, S. V.; KALAM, H.; ARORA, D.; JAIN, N.; KUMAAR, L. K.; SAMAL, A.; RAO, K. V. S.; KUMAR, D.; NANDICOORI, V. K. Comparative proteomic analyses of avirulent, virulent and clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* identifies strain-specific Patterns. **The Journal of Biological Chemistry**, 2016.
- JONSSON, J.; HOFFNER, S.; BERGGREN, I.; BRUCHFELD, J.; GHEBREMICHAEL, S.; PENNHAG, A.; GROENHEIT, R. Comparison between RFLP and MIRU-VNTR Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Stockholm 2009 to 2011. **Plos One**, v. 9, n. 4. 2014.

KAMERBEEK, J.; SCHOOLS, L.; KOLK, A.; van AGTERVELD, M.; van SOOLINGEN, D.; KUIJPER, S.; BUNSCHOTEN, A.; MOLHUIZEN, H.; SHAW, R.; GOYAL, M.; van EMBDEN, J. D. A. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n.4, p. 907-914, 1997.

KANDUMA, E.; McHUGH, T. D.; GILLESPIE, S. H. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 781–791, 2003.

KIRZINGER, M. W.; STAVRINIDES, J. Host specificity determinants as a genetic continuum. **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 88-93, 2012.

KONG, Y.; CAVE, M. D.; ZHANG, L.; FOXMAN, B.; MARRS, C. F.; BATES, J. H.; YANG, Z. H. Association between *Mycobacterium tuberculosis* Beijing/W lineage strain infection and extrathoracic tuberculosis: Insights from epidemiologic and clinical characterization of the three principal genetic groups of *M. tuberculosis* clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 409-14, 2007.

KOSER, C. U.; ELLINGTON, M. J.; CARTWRIGHT, E. J. P.; GILLESPIE, S. H.; BROWN, N. M.; FARRINGTON, M.; HOLDEN, M. T. G.; DOUGAN, G.; BENTLEY, S. D.; PARKHILL, J.; PEACOCK, S. J. Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 8, 2012.

KOWALSKI, K.; TRZEPIŃSKI, P.; DRUSZCZYŃSKA, M.; BORATYŃSKI, J. Mycolic acids – biological role and potential application in *Mycobacterium* detection and differentiation. **Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej**, n. 68, p. 350-358, 2014.

KOZAREWA, I.; TURNER, D. J. High-Throughput Next Generation Sequencing. **Methods in Molecular Biology**, v. 733, 2011.

KREMER, L.; MAUGHAN, W. N.; WILSON, R. A.; DOVER, L. G.; BESRA, G. S. The *M. tuberculosis* antigen 85 complex and mycolyltransferase activity. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 233-7, 2002.

KREMER, L.; NAMPOOTHIRI, K. M.; LESJEAN, S.; DOVER, L. G.; GRAHAM, S.; BETTS, J.; BRENNAN, P. J.; MINNIKIN, D. E.; LOCHT, C.; BESRA, G. S. Biochemical characterization of acyl carrier protein (AcpM) and malonylCoA:AcpM transacylase (mtFabD), two major components of *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase II. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 30, p. 27967–74, 2001.
LEÃO, S. C.; PORTALES, F. In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. Chapter 1: History. *Tuberculosis 2007: From basic Science to patient care*. 1^a ed. 2007.

LEW, J. M.; KAPOPOULOU, A.; JONES, L. M.; COLE, S. T. TubercuList e 10 years after. **Tuberculosis**, v. 91, p. 1-7, 2011.

- LI, H.; HANDSAKER, B.; WYSOKER, A.; FENNEL, T.; RUAN, J.; HOMER, N.; MARTH, G.; ABECASIS, G.; DURBIN, R.; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics**, v. 25, n. 16, p. 2078-9, 2009.
- LIRA, L. A. S.; SANTOS, F. C. F.; CARVALHO, M. S. Z.; MONTENEGRO, R. A.; LIMA, J. F. C.; SCHINDLER, H. C.; MONTENEGRO, L. M. L. Evaluation of a IS6110-Taqman real-time PCR assay to detect *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples of patients with pulmonary TB. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, p. 1103-1108, 2012.
- LUCA, S.; MIHAESCU, T. History of BCG Vaccine. **Maedica (Bucur)**, v. 8, n. 1, p. 53-8, 2013.
- LYON, S. M.; ROSSMAN, M. D. Pulmonary Tuberculosis. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 1, 2017.
- MAKAROVA, K. S.; HAFT, D. H.; BARRANGOU, R.; BROUNS, S. J.; CHARPENTIER, E.; HORVATH, P.; MOINEAU, S.; MOJICA, F. J.; WOLF, Y. I.; YAKUNIN, A. F.; VAN DER OOST, J.; KOONIN, E. V. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 467-77, 2011.
- MAKINOSHIMA, H.; GLICKMAN, M. S. Regulation of *M. tuberculosis* cell envelope composition and virulence by Regulated Intramembrane Proteolysis. **Nature**, v. 436, n. 7049, 406-409, 2005.
- MARRAKCHI, H.; DUCASSE, S.; LABESSE, G.; MONTROZIER, H.; MARGEAT, E.; EMORINE, L.; CHARPENTIER, X.; DAFFÉ, M.; QUÉMARD, A. K. MabA (FabG1), a *Mycobacterium tuberculosis* protein involved in the long-chain fatty acid elongation system FAS-II. **Microbiology (Reading)**, v. 148, p. 951-960, 2002.
- MARRAKCHI, H.; LANÉELLE, M-A.; DAFFÉ, M. Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond. **Chemistry & Biology**, v. 21, 2014.
- MATHEMA, B.; KUREPINA, N. E.; BIFANI, P. J.; KREISWIRTH, B. N. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. **Clinical Microbiology Reviews**, 19, n. 4, p. 658-685, 2006.
- MAZARS, E.; LESJEAN, S.; BANULS, A. L.; GILBERT, M.; VINCENT, V.; GICQUEL, B.; TIBAYRENC, M.; LOCHT, C.; SUPPLY, P. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 98, n. 4, p. 1901-1906, 2001.
- MEDEIROS, T. F.; NOGUEIRA, C. L.; PRIM, R. I.; SCHEFFER, M. C.; ALVES, E. V.; ROVARIS, D. B.; ZOZIO, T.; RASTOGI, N.; BAZZO, M. L. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains from prison populations in Santa Catarina, Southern Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, 58, p. 34-39, 2018.

MEEHAN, C. J.; GOIG, G. A.; KOHL, T. A.; VERBOVEN, L.; DIPPENAAR, A.; EZEWUDO, M.; FARHAT, M. R.; GUTHRIE, J. L.; LAUKENS, K.; MIOTTO, P.; OFORI-ANYINAM, B.; DREYER, V.; SUPPLY, P.; SURESH, A.; UTPATEL, C.; VAN SOOLINGEN, D.; ZHOU, Y.; ASHTON, P. M.; BRITES, D.; CABIBBE, A. M.; DE JONG, B. C.; DE VOS, M.; MENARDO, F.; GAGNEUX, S.; GAO, Q.; HEUPINK, T. H.; LIU, Q.; LOISEAU, C.; RIGOUTS, L.; RODWELL, T. C.; TAGLIANI, E.; WALKER, T. M.; WARREN, R. M.; ZHAO, Y.; ZIGNOL, M.; SCHITO, M.; GARDY, J.; CIRILLO, D. M.; NIEMANN, S.; COMAS, I.; VAN RIE, A. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*: current standards and open issues. **Nature Reviews Microbiology**, 17, n. 9, p. 533-545, 2019.

MEHTA, P. K.; RAJ, A. SINGH, N. KHULLER, G. K. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 66, p. 20-36, 2012.

MERKER, M.; KOHL, T. A.; NIEMANN, S.; SUPPLY, P. The Evolution of Strain Typing in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 1019, p. 43-78, 2017.

MIKHEECHEVA, N. E.; ZAYCHIKOVA, M. V.; MELERZANOV, A. V.; DANILENKO, V. N. A Nonsynonymous SNP Catalog of *Mycobacterium tuberculosis* Virulence Genes and Its Use for Detecting New Potentially Virulent Sublineages. **Genome Biology and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 887-899, 2017.

MIKUSOV, K.; SLAYDEN, R. A.; BESRA, G. S.; Brennan, P. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 2484-89, 1995.

MINNIKIN, D. E.; KREMER, L.; DOVER, L. G.; BESRA, G. S. The methyl-branched fortifications of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chemistry & Biology*, v. 9, p. 545-553, 2002.

MLOTSHWA, M.; ABRAHAM, N.; BEERY, M.; WILLIAMS, S.; SMIT, S.; UYS, M.; REDDY, C.; MEDINA-MARINO, A. Risk factors for tuberculosis smear non-conversion in Eden district, Western Cape, South Africa, 2007-2013: a retrospective cohort study. *BMC Infectious Diseases*, v. 16, n. 1, 2016.

MONSTRÖM, P.; GORDON, M.; SOLA, C, RIDELL, M.; RASTOGI, N. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 8, n. 11, p. 694-704, 2002.

MURPHY, H. N.; STEWART, G. R.; MISCHENKO, V. V.; APT, A. S.; HARRIS, R.; MCALISTER, M. S. B.; DRISCOLL, P. C.; YOUNG, D. B.; ROBERTSON, B. D. The OtsAB Pathway Is Essential for Trehalose Biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 15, p. 14524-14529, 2005.

MURRAY, M.; ALLAND, D. Methodological problems in the molecular epidemiology of tuberculosis. **American Journal of Epidemiology**, v. 155, n. 6, p. 565-71, 2002.

NATHANSON, E.; LAMBREGTS-VAN WEEZENBEEK, C.; RICH, M. L.; GUPTA, R.; BAYONA, J.; BLONDAL, K.; CAMINERO, J. A.; CEGIELSKI, J. P.; DANILOVITS, M.; ESPINAL, M. A.; HOLLO, V.; JARAMILLO, E.; LEIMANE, V.; MITNICK, C. D.;

MUKHERJEE, J. S.; NUNN, P.; PASECHNIKOV, A.; TUPASI, T.; WELLS, C.; RAVIGLIONE, M. C. Multidrug-resistant tuberculosis management in resource-limited settings. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 1389-1397, 2006.

NIEMANN, S.; SUPPLY, P. Diversity and Evolution of *Mycobacterium tuberculosis* - Moving to Whole-Genome Based Approaches. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, 2014.

NIKOLAYEVSKYY, V.; NIEMANN, S.; ANTHONY, R.; VAN SOOLINGEN, D.; TAGLIANI, E.; KODMON, C.; VAN DER WERF, M. J.; CIRILLO, D. M. Role and value of whole genome sequencing in studying tuberculosis transmission. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, p. 1377-1382, 2019.

NOGUEIRA, C. L.; PRIM, R. I.; SENNA, S. G.; ROVARIS, D. B.; MAURICI, R.; ROSSETTI, M. L.; COUVIN, D.; RASTOGI, N.; BAZZO, M. L. First insight into the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Santa Catarina, southern Brazil. **Tuberculosis**, v. 97, p. 57-64, 2016.

ØYÅS, O.; BORRELLC, S.; TRAUNERC, A.; ZIMMERMANNE, M.; FELDMANN, J.; LIPHARDTA, T.; GAGNEUXC, S.; STELLINGA, J.; SAUERE, U.; ZAMPIERIE, M. Model-based integration of genomics and metabolomics reveals SNP functionality in *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS**, v. 117, n. 15, p. 8494–8502, 2020.

PANDOLFI, J. R.; MALASPINA, A. C.; SANTOS, A. C. B.; SUFFYS, P. N.; OELLEMANN, M. A. C.; VALENTINI, S.R.; LEITE, C. Q. F. Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 28, p. 251-257, 2007.

PARSONS, L.; SOMOSKÖVI, A.; GUTIERREZ, C.; LEE, E.; PARAMASIVAN, C.N.; ABIMIKU, A.; SPECTOR, S.; ROSCIGNO, G.; NKENGASONG, J. Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource-poor countries: challenges and opportunities. **Clinical Microbiology Reviews**, v.24, n.2, p. 314-350, 2011.

PAWEŁCZYK, J.; KREMER, L. The Molecular Genetics of Mycolic Acid Biosynthesis. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 4, 2014.

PEPPERELL, C. S.; CASTO, A. M.; KITCHEN, A.; JULIE M. GRANKA, J. M.; CORNEJO, O. E.; HOLMES, E. C.; BIRREN, B.; GALAGAN, J.; FELDMAN, M. W. The Role of Selection in Shaping Diversity of Natural *M. tuberculosis* Populations. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 8, 2013.

PETERS, J. S.; CALDER, B.; GONNELLI, G.; DEGROEVE, S.; RAJAONARIFARA, E.; MULDER, N.; SOARES, N. C.; MARTENS, L.; BLACKBURN, J. M. Identification of Quantitative Proteomic Differences between *Mycobacterium tuberculosis* Lineages with Altered Virulence. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, n. 813, 2016.

PEYRON, P.; VAUBOURGEIX, J.; POQUET, Y.; LEVILLAIN, F.; BOTANCH, C.; BARDOU, F.; DAFFÉ, M.; EMILE, J. F.; MARCHOU, B.; CARDONA, P. J.; DE CHASTELLIER, C.; ALTARE, F. Foamy macrophages from tuberculous patients'

granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *PLoS Pathogens*, v. 4, n. 11, 2008.

PEZZELLA, A. T. History of Pulmonary Tuberculosis. *Thoracic Surgery Clinics*, v. 29, n. 1, p. 1-17, 2019.

PHILIPS, J. A.; ERNST, J.D. Tuberculosis Pathogenesis and Immunity. **Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease**, v. 7, p. 353–384, 2012.

PORTEVIN, D.; DE SOUSA-D'AURIA, C.; HOUSSIN, C.; GRIMALDI, C.; CHAMI, M.; DAFTE, M.; GUILHOT, C. A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 1, p. 314–319, 2004.

PORTEVIN, D.; SUKUMAR, S.; COSCOLLA, M.; SHUI, G.; LI, B.; GUAN, X. L.; BENDT, A. K.; YOUNG, D.; GAGNEUX, S.; WENK, M. R. Lipidomics and genomics of *Mycobacterium tuberculosis* reveal lineage-specific trends in mycolic acid biosynthesis. **MicrobiologyOpen**, v. 3, n. 6, p. 823–835, 2014.

PRIM, R. I.; SCHÖRNER, M. A.; SENNA, S. G.; NOGUEIRA, C. L.; FIGUEIREDO, A. C.; OLIVEIRA, J. G.; ROVARIS, D. B.; BAZZO, M. L. Molecular profiling of drug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in the state of Santa Catarina, southern Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 5, p. 618-23, 2015.

PROZOROV, A. A.; DANILENKO, V. N. Mycobacteria of the tuberculosis complex: genomics, molecular epidemiology, and evolution trends. **Biology Bulletin Reviews**, v. 1, n. 6, p. 483–495, 2011.

PURWANTINI, E.; MUKHOPADHYAY, B. *Rv0132c* of *Mycobacterium tuberculosis* Encodes a Coenzyme F420-Dependent Hydroxymycolic Acid Dehydrogenase. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.

RAMAN, K.; RAJAGOPALAN, P.; CHANDRA, N. Flux balance analysis of mycolic acid pathway: targets for anti-tubercular drugs. **PLOS Computational Biology**, v. 1, n.5, 2005.

RAMAN, K.; RAJAGOPALAN, P.; CHANDRA, N. Hallmarks of mycolic acid biosynthesis: a comparative genomics study. **Proteins**, v. 69, n. 2, p. 358-68, 2007.

RAO, V.; GAO, F.; CHEN, B.; JACOBS, W. R.; GLICKMAN, M. S. Trans-cyclopropanation of mycolic acids on trehalose dimycolate suppresses *Mycobacterium tuberculosis* induced inflammation and virulence. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p. 1660–1667, 2006.

REVEZ, J.; ESPINOSA, L.; ALBIGER, B.; LEITMEYER, K. C.; STRUELENS, M. J.; ENMF National Microbiology Focal Points and Experts Group. Survey on the use of whole-genome sequencing for infectious diseases surveillance: rapid expansion of European National Capacities, 2015-2016. **Frontiers in Public Health**, v. 5, n. 347, 2017.

RIVERA-BETANCOURT, O. E.; KARLS, R.; GROSSE-SIESTRUP, B.; HELMS, S.; QUINN, F.; DLUHY, R. A. Identification of mycobacteria based on spectroscopic analyses of mycolic acid profiles. **Analyst**, v. 138, p. 6774- 6785, 2013.

ROMERO, I. C.; MEHAFFY, C.; BURCHMORE, R. J.; DOBOS-ELDER, K.; BRENNAN, P.; WALKER, J. Identification of promoter-binding proteins of the *fbp A* and *C* genes in *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 90, n. 1, p. 25-30, 2010.

ROSEMBERG, J.; TARANTINO, A. B. Tuberculose. In: TARANTINO, A. B. Doenças pulmonares. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 294-380, 2002.

ROSSETTI, M. L. R.; SPERHACKE, R. D. Tuberculose. In: ROSSETTI, M. L.; SILVA, C. M. D.; RODRIGUES, J. J. S. Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SACCO, E.; COVARRUBIAS, A. S.; O'HARE, H. M.; CARROLL, P.; EYNARD, N.; JONES, T.A.; PARISH, T.; DAFFÉ, M.; BÄCKBRO, K.; QUÉMARD, A. The missing piece of the type II fatty acid synthase system from *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 37, p. 14628–14633, 2007.

SACHDEVA, S.; REYNOLDS, K. A. *Mycobacterium tuberculosis* β -Ketoacyl Acyl Carrier Protein Synthase III (mtFabH) Assay: Principles and Method. **Methods in Molecular Medicine**, v. 142, 2008.

SAMBANDAN, D.; DAO, D. N.; WEINRICK, B. C.; VILCHÈZE, C.; GURCHA, S. S.; OJHA, A.; KREMER, L.; BESRA, G. S.; HATFULL, GRAHAM F.; JACOBS JR, W. R. Keto-Mycolic Acid-Dependent Pellicle Formation Confers Tolerance to Drug-Sensitive *Mycobacterium tuberculosis*. **MBio**, v. 4, n. 3, 2013.

SANI, M.; HOUBEN, E.N.; GEURTSSEN, J.; PIERSON, J.; DE PUNDER, K.; VAN ZON, M.; WEVER, B.; PIERSMA, S.R.; JIMÉNEZ, C.R.; DAFEEÉ, M.; et al. Direct visualization by cryo-EM of the mycobacterial capsular layer: a labile structure containing ESX-1-secreted proteins. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 3, 2010.

SANTOS, L. C.; KIPNIS, A. P. J.; KIPNIS, A. Métodos aplicados à epidemiologia molecular do *Mycobacterium tuberculosis*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n.1, p. 1-15, 2007.

SCHAEFFER, M. L.; AGNIHOTRI, G.; VOLKER, C.; KALLENDER, H.; BRENNAN, P. J.; LONSDALE, J. T. Purification and biochemical characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthases KasA and KasB. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 50, p. 47029-37, 2001.

SCHEFFER, M. C. Influência de fatores de risco do paciente e de características de *Mycobacterium tuberculosis* no desfecho dos casos novos de tuberculose pulmonar tratados com esquema básico: uma coorte prospectiva de dois anos na grande Florianópolis/SC. 2017. 208p. Tese (Doutorado em Farmácia) – Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

SCHURCH, A. C.; VAN SOOLINGEN, D. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: from phage typing to whole-genome sequencing. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 4, p. 602–609, 2012.

SLAMA, N.; JAMET, S.; FRIGUI, W.; PAWLIK, A.; BOTTAI, D.; LAVAL, F.; CONSTANT, P.; LEMASSU, A.; CAM, K.; DAFFÉ, M.; BROSCH, R.; EYNARD, N.; QUÉMARD, A. The changes in mycolic acid structures caused by *hadC* mutation have a dramatic effect on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Microbiology**, v. 99, p. 794–807, 2016.

SLAYDEN, R. A.; BARRY, C. E. 3rd. The role of *KasA* and *KasB* in the biosynthesis of meromycolic acids and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 82, n. 4-5, p. 149-60, 2002.

SONG, S. H.; PARK, K. U.; LEE, J. H.; KIM, E. C.; KIM, J. Q.; SONG, J. Electrospray ionization-tandem mass spectrometry analysis of the mycolic acid profiles for the identification of common clinical isolates of mycobacterial species. **Journal of Microbiological Methods**, v. 77, 165–177, 2009.

SOTGIU, G.; NAHID, P.; LODDENKEMPER, R.; ABUBAKAR, I.; MIRAVITLLES, M.; MIGLIORI, G. B. The ERS-endorsed official ATS/CDC/IDSA clinical practice guidelines on treatment of drug-susceptible tuberculosis. **The European Respiratory Journal**, v. 48, p. 963–971, 2016.

STUCKI, D.; BRITES, D.; JELJELI, L. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Lineage 4 comprises globally distributed and geographically restricted sublineages. **Nature Genetics**, v. 48, n. 12, p. 1535–1543, 2016.

SUPPLY, P.; ALLIX, C.; LESJEAN, S.; CARDOSO-OELEMANN, M.; RÜSCHGERDES, S.; WILLERY, E.; SAVINE, E.; DE HAAS, P.; VAN DEUTEKOM, H.; RORING, S.; BIFANI, P.; KUREPINA, N.; KREISWIRTH, B.; SOLA, C.; RASTOGI, N.; VATIN, V.; GUTIERREZ, M. C.; FAUVILLE, M.; NIEMANN, S.; SKUCE, R.; KREMER, K.; LOCHT, C.; VAN SOOLINGEN, D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, 44, n. 12, p. 4498-4510, 2006.

SUPPLY, P.; MAZARS, E.; LSEJEAN, S.; VINCENT, V.; GICQUEL, B.; LOCHT, C. Variable human minissatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 762-71, 2000.

TAKAHASHI, T.; TAMURA, M.; TAKASU, T. The PCR-Based Diagnosis of Central Nervous System Tuberculosis: Up to Date. **Tuberculosis Research and Treatment**, 2012.

TAKAYAMA, K.; KILBURN, J. O. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, p. 1493-1499, 1989.

- TAKAYAMA, K.; WANG, C.; BESRA, G. S. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical Microbiology Reviews**, n. 18, p. 81–101, 2005.
- TARASOV, A.; VILELLA, A. J.; EDWIN CUPPEN, E.; NIJMAN, I. J.; PRINS, P. Sambamba: fast processing of NGS alignment formats. **Bioinformatics**, v. 31, n. 12 p. 2032-4, 2015.
- TELENTI, A.; PHILIPP, W.; SREEVATSAN, S.; BERNASCONI, C.; STOCKBAUER, K. E.; WIELES, B.; MUSSE, J. M.; JACOBS Jr., W. R. The emb operon, a unique gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. **Nature Medicine**, v. 3, p. 567–570, 1997.
- ten BOKUM, A. M.; MOVAHEDZADEH, F.; FRITA, R.; BANCROFT, G. J.; STOKER, N. G. The case for hypervirulence through gene deletion in *Mycobacterium tuberculosis*. **Trends in microbiology**, v. 16, p. 436-441, 2008.
- THANNA, S.; SUCHECKA, S. J. Targeting the trehalose utilization pathways of *Mycobacterium*. **MedChemComm**, v. 7, n. 1, p. 69–85, 2016.
- TORTOLLI, E.; PALOMINO, J. C. In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. Chapter 14: New Diagnostic Methods. *Tuberculosis 2007 – From basic science to patient care*. 1^a ed. 2007.
- TRIVEDI, O. A.; ARORA, P.; SRIDHARAN, V.; TICKOO, R.; MOHANTY, D.; GOKHALE, R. S. Enzymic activation and transfer of fatty acids as acyl-adenylates in mycobacteria. **Nature**, v. 428, n. 6981, p. 441-445, 2004.
- TSAI, Y. T.; SALZMAN, V.; CABRUJA, M.; GAGO, G.; GRAMAJO, H. Role of long-chain acyl-CoAs in the regulation of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria. **Open Biology**, v. 7, n. 7, 2017.
- UNISSA, A. N.; HANNA, L. E. Molecular mechanisms of action, resistance, detection to the first-line anti tuberculosis drugs: Rifampicin and pyrazinamide in the post whole genome sequencing era. **Tuberculosis**, v. 105, p. 96-107, 2017.
- UPLEKAR, M.; WEIL, D.; LONNROTH, K.; JARAMILLO, E.; LIENHARDT, C.; DIAS, H. M.; FALZON, D.; FLOYD, K.; GARGIONI, G.; GETAHUN, H.; GILPIN, C.; GLAZIOU, P.; GRZEMSKA, M.; MIRZAYEV, F.; NAKATANI, H.; RAVIGLIONE, M. (for WHO's Global TB Programme). WHO's new End TB Strategy. **Lancet**, v. 385, p. 1799–1801, 2015.
- van SOOLINGEN, D.; DE HASS, P. E. W.; HERMANS, P. W. M.; van EMBDEN, J. D. A. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods in Enzymology**, v. 235, p. 196-204, 1994.
- van SOOLINGEN, D.; HERMANS, P. W.; de HAAS, P. E.; SOLL, D. R.; van EMBDEN, J. D. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 1987-95, 1991.

VARELA, C.; RITTMANN, D.; SINGH, A.; KRUMBACH, K.; BHATT, K.; EGGELING, L.; BESRA, G. S.; BHATT, A. MmpL genes are associated with mycolic acid metabolism in mycobacteria and corynebacteria. **Chemistry & Biology**, v. 19, n. 4, p. 498-506, 2012.

VERSCHOOR, J. A.; BAIRD, M. S.; GROOTEN, J. Towards understanding the functional diversity of cell wall mycolic acids of *Mycobacterium tuberculosis*. **Progress in Lipid Research**, v. 51, p. 325–339, 2012.

VERZA, M.; SCHEFFER, M. C.; SALVATO, R. S.; SCHORNER, M. A.; BARAZZETTI, F. H.; MACHADO, H. M.; MEDEIROS, T. F.; ROVARIS, D. B.; PORTUGAL, I.; VIVEIROS, M.; PERDIGÃO, J.; KRITSKI, A.; BAZZO, M. L. Genomic epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Santa Catarina, Southern Brazil. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020.

VILCHÈZE, C.; KREMER, L. Acid-Fast Positive and Acid-Fast Negative *Mycobacterium tuberculosis*: The Koch Paradox. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 2, 2017.

WALKER, T. M.; KOHL, T. A.; OMAR, S. V.; HEDGE, J.; DEL OJO ELIAS, C.; BRADLEY, P.; ZAMIN IQBAL, Z.; FEUERRIEGEL, S.; NIEHAUS, K. E.; WILSON, D. J.; CLIFTON, D. A.; KAPATAI, G.; IP, C. L. C.; BOWDEN, R.; DROBNIEWSKI, F. A.; ALLIX-BÉGUEC, C.; GAUDIN, C.; PARKHILL, J.; DIEL, R.; SUPPLY, P.; CROOK, D. W.; SMITH, E. G.; WALKER, A. S.; ISMAIL, N.; NIEMANN, S.; PETO, T. E. A.; Modernizing Medical Microbiology (MMM) Informatics Group. Whole genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 10, p. 1193-1202, 2015.

WAMPANDE, E. M.; MUPERE, E.; DEBANNE, S. M.; ASIIMWE, B. B.; NSEREKO, M.; MAYANJA, H.; EISENACH, K.; KAPLAN, G.; BOOM, H. W.; GAGNEUX, S.; JOLOBA, M. L. Long-term dominance of *Mycobacterium tuberculosis* Uganda family in peri-urban Kampala-Uganda is not associated with cavitory disease. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 484, 2013.

WATANABE, M.; AOYAGI, Y.; MITOME, H.; FUJITA, T.; NAOKI, H.; RIDELL, M.; MINNIKIN, D. E. Location of functional groups in mycobacterial meromycolate chains; therecognition of new structural principles in mycolic acids. **Microbiology**, v. 148, p. 1881– 1902, 2002.

WATANABE, M.; AOYAGI, Y.; RIDELL, M.; MINNIKIN, D. E. Separation and characterization of individual mycolic acids in representative mycobacteria. **Microbiology**, v. 147, p. 1825–1837, 2001.

WATANABE, S.; MATSUMURA, K.; IWAI, H.; FUNATOGAWA, K.; HAISHIMA, Y.; FUKUI, C.; OKUMURA, K.; KATO-MIYAZAWA, M.; HASHIMOTO, M.; TERAMOTO, K.; KIRIKAE, F.; MIYOSHI-AKIYAMA, T.; KIRIKAE, T. A mutation in the decoding 1 region of 16S rRNA attenuates the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**, 2016.

WHO – World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2019. Geneva: World Health Organization, 2019.

WHO – World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2020. Geneva: World Health Organization, 2020.

WHO – World Health Organization. The Stop TB Strategy, 2006.

WHO – World Health Organization. Use of tuberculosis interferon-gamma release assays (IGRAs) in low- and middle-income countries: Policy Statement, 2011.

WILKINSON, R. J.; DESJARDIN, L. E.; ISLAM, N.; GIBSON, B. M.; KANOST, R. A.; WILKINSON, K. A.; POELMAN, D.; EISENACH, D.; TOOSI, Z. An increase in expression of a *Mycobacterium tuberculosis* mycolyl transferase gene (fbpB) occurs early after infection of human monocytes. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 813-21, 2001.

WILSON, M. L. Recent advances in the laboratory detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and drug resistance. **Medical Microbiology**, v.52, n.11, p. 1350-1355, 2011.

WINDER, F. G.; COLLINS, P. B. Inhibition by isoniazid of synthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of General Microbiology**, v. 63, p. 41–48, 1970.

WOLUCKA, B. A.; MCNEIL, M. R.; DE HOFFMANN, E.; CHOJNACKI, T.; BRENNAN, P. J. Recognition of the lipid intermediate for arabinogalactan/arabinomannan biosynthesis and its relation to the mode of action of ethambutol on mycobacteria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 23328–35, 1994.

XU, W.; DEJESUS, M. A.; RÜCKER, N.; ENGELHART, C. A.; WRIGHT, M. G.; HEALY, C.; LIN, K.; WANG, R.; PARK, S. W.; IOERGER, T. R.; SCHNAPPINGER, D.; SABINE EHRTA, S. Chemical Genetic Interaction Profiling Reveals Determinants of Intrinsic Antibiotic Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 12, 2017.

YASSIN, A. A. F. Detection and characterization of mycolic acids and their use in taxonomy and classification. **Methods in microbiology**, v. 38, p. 207–237, 2011.

YEBOAH-MANU, D.; DANSO, E.; AMPAH, K.; ASANTE-POKU, A.; NAKOBU, Z.; PLUSCHKE, G. Isolation of *Mycobacterium ulcerans* from swab and fine-needle-aspiration specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1997-9, 2011.

YUAN, Y.; BARRY 3rd, C. E. A common mechanism for the biosynthesis of methoxy and cyclopropyl mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 23, p. 12828-33, 1996.

YUAN, Y.; ZHU, Y.; CRANE, D. D.; BARRY, C. E. The effect of oxygenated mycolic acid composition on cell wall function and macrophage growth in *-Mycobacterium*

tuberculosis. **Molecular Microbiology**, v. 29, p. 1449–1458, 1998.

ZHANG, Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 529-564, 2005.

ZIGNOL, M.; CABIBBE, A. M.; DEAN, A. S.; GLAZIOU, P.; ALIKHANOVA, N.; AMA, C.; ANDRES, S.; BARBOVA, A.; BORBE-REYES, A.; CHIN, D. P.; CIRILLO, D. M.; COLVIN, C.; DADU, A.; DREYER, A.; DRIESEN, M.; GILPIN, C.; HASAN, R.; HASAN, Z.; SVEN HOFFNER, S.; HUSSAIN, A.; ISMAIL, N.; KAMAL S. M. M.; KHANZADA, F. M.; MICHAEL KIMERLING, M.; KOHL, T. A.; MANSJÖ, M.; MIOTTO, P.; MUKADI, Y. D.; MVUSI, L.; STEFAN NIEMANN, S.; OMAR, S. V.; RIGOUTS, L.; SCHITO, M.; SELA, I.; SEYFADDINOVA, M.; SKENDERS, G.; SKRAHINA, A.; TAHSEEN, S.; WELLS, W. A.; ZHURILO, A.; WEYER, K.; FLOYD, K.; RAVIGLIONE, M. C. Genetic sequencing for surveillance of drug resistance in tuberculosis in highly endemic countries: a multi-country population-based surveillance study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, p. 675–683, 2018.