

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde
Doutorado

ROSEANE LUSTOSA DE SANTANA LIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA
DESFERRIOXAMINA *in silico* e *in vitro* CONTRA
Mycobacterium abscessus subsp. *massiliense***

São Luís - MA

2026

ROSEANE LUSTOSA DE SANTANA LIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA
DESFERRIOXAMINA *in silico* e *in vitro* CONTRA
Mycobacterium abscessus subsp. *massiliense***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Maranhão como pré-requisito para obtenção do título
de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Martins de Sousa

Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho

São Luís - MA

2026

Lustosa de Santana Lira, Roseane.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA
DESFERRIOXAMINA in sílico e in vitro CONTRA Mycobacterium
abscessus subsp. massiliense / Roseane Lustosa de Santana
Lira. - 2026.

135 f.

Coorientador(a) 1: Rafael Cardoso Carvalho.

Orientador(a): Eduardo Martins de Sousa.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís - Ma, 2026.

1. Mycobacterium Abscessus. 2. Mycobacterium
Abscessus Subsp. Massiliense. 3. Desferrioxamina. 4.
Resistência Antimicrobiana. I. Cardoso Carvalho, Rafael.
II. Martins de Sousa, Eduardo. III. Título.

ROSEANE LUSTOSA DE SANTANA LIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA DESFERRIOXAMINA *in*
sílico e in vitro CONTRA *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão,
como requisito para obtenção do título de Doutora em
Ciências da Saúde.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Martins de Sousa (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

4º Examinador

AGRADECIMENTOS

Com o coração repleto de gratidão, dedico este espaço a todos aqueles que, de diversas formas, tornaram a jornada do doutorado não apenas possível, mas significativamente mais rica e leve.

Primeiramente, a Deus, pela força inabalável, pela fé que me guiou nos momentos de incerteza e por cada bênção que iluminou meu caminho.

À minha amada família, alicerce de tudo o que sou. Em especial, ao meu marido, pela paciência infinita, pelo amor incondicional, pelo apoio constante e por cada incentivo nos dias mais desafiadores. À minha filha, a inspiração diária, a alegria que me impulsionou e a certeza de que todo esforço vale a pena. Vocês são o meu porto seguro.

Ao Professor Doutor Eduardo de Martins de Sousa, meu orientador, agradeço imensamente pela confiança, pela sabedoria, pela orientação perspicaz e pela dedicação exemplar. Sua expertise e seu estímulo foram fundamentais para a concretização deste trabalho.

Aos amigos e pessoas próximas, que com sua amizade, carinho e palavras de encorajamento, tornaram os momentos de estudo mais leves e os desafios mais superáveis. A cada um de vocês, meu muito obrigado.

Agradeço também a todos os colegas do Laboratório NIBA, pelo ambiente colaborativo e pelo suporte mútuo. Em especial, à minha amiga Carmen, cujo conhecimento e generosidade foram fundamentais e indispensáveis para a concretização deste momento.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão às seguintes instituições pelo apoio fundamental concedido durante o desenvolvimento da minha tese de doutorado: Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro e fomento à pesquisa, que foram essenciais para a concretização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA), pelo investimento contínuo na ciência e tecnologia no estado do Maranhão, que tornou possível a execução desta pesquisa. À Universidade Ceuma (CEUMA), pela estrutura, suporte e ambiente acadêmico que propiciaram o desenvolvimento do meu projeto de doutorado. À Universidade Federal de Goiás (UFG), pela contribuição significativa a conclusão dessa pesquisa e a Universidade Federal do Maranhão – UFMA, pela excelência acadêmica que contribuíram para a minha formação e para a qualidade desta tese.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES.....	vi
LISTA DE QUADROS	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO	14
2.1 Micobactérias não tuberculosas (MNTs).....	14
2.2 Complexo <i>Mycobacterium abscessus</i>	15
2.3 Esquemas terapêuticos atuais e limitações.....	19
2.4 Ferro na biologia micobacteriana	20
2.5 Desferrioxamina	22
2.6 Sinergismo antimicrobiano com Desferrioxamina	26
2.7 Análises <i>in silico</i> de mecanismos adjuvantes da DFO	29
2.8 Escassez de adjuvantes quelantes específicos para <i>M. abscessus</i>	31
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral.....	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
4 METODOLOGIA.....	34
4.1 Microrganismo e Condições de Cultivo.....	34
4.2 Seleção dos Compostos para Análises Computacionais	34
4.3 Preparação do Inóculo Bacteriano.....	34
4.4 Ensaio de Citotoxicidade e Viabilidade celular em Macrófagos murinos RAW 264.7	35
4.5 Determinação da Atividade Hemolítica.....	35
4.6 Quantificação da Produção de Óxido Nítrico (NO)	36
4.7 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	36
4.8 Avaliação de Sinergismo (Método Checkerboard)	37
4.9 Formação de Biofilme e Produção de Vesículas Extracelulares.....	38
4.10 Infecção e Sobrevivência Intracelular em Macrófagos murinos RAW 264.7.....	39

4.11 Análise da Expressão Gênica de Citocinas	40
4.12 Docking Molecular	42
4.13 Análise ADME e Predição de Propriedades Toxicológicas (<i>in silico</i>).....	43
4.14 Predição de Atividades Biológicas (<i>in silico</i>)	44
4.15 Análise Estatística	45
5 RESULTADOS.....	46
5.1 Capítulo I - Bibliometric Review on New Possibilities of Antimycobacterial Agents: Exploring Siderophore Desferrioxamine's Applications as an Antimicrobial Agent	46
5.2 Capítulo II – <i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> : Biofilm Formation, Host Immune Response, and Therapeutic Strategies.....	65
5.3 Capítulo III – A Desferrioxamina Potencializa as Respostas Antimicrobianas e Imunomodulatórias contra <i>Mycobacterium abscessus</i> : Evidências Integradas <i>In Silico</i> e <i>In Vitro</i>	86
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	11
7 CONCLUSÃO.....	13
REFERÊNCIAS	15
APÊNDICE A – USO DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL.....	33

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

⁶⁸ Ga-DFO-B	Desferrioxamina-B radiomarcada com gálio-68
ACFS	Escarro artificial de fibrose cística
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLA	Claritromicina
DFO	Desferrioxamina
DFO-B	Desferrioxamina-B
DFX	Deferasirox
DTPA	Solução de DTPA
erm(41)	Gene erm(41)
ESX-3	Sistema de secreção do tipo VII ESX-3
ESX-4	Sistema de secreção do tipo VII ESX-4
EsxT, EsxU	Efetores EsxT e EsxU
FC	Fibrose cística
FeCl ₃	Solução de cloreto férrico
FICI	Índice Fracionário de Inibição
GPLs	Glicopeptídeos lipídicos
HDT	Host-Directed Therapy (terapia dirigida ao hospedeiro)
HIF-1 α	Fator 1- α induzível por hipóxia
hMDMs	Derivados de monócitos humanos primários
IFN- γ	Interferon-gama
IL-6	Interleucina-6
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-10	Interleucina-10
LIC	Concentração de ferro no fígado
LL-37	Peptídeo antimicrobiano LL-37
LPS	Lipopolissacarídeo
<i>M. abscessus</i>	<i>Mycobacterium abscessus</i>
Mab	<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>

CMAB	Complexo <i>Mycobacterium abscessus</i>
Mabs	<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>
MmpL4a, MmpL4b	Proteínas MmpL4a e MmpL4b
MmpS5-MmpL5	Bomba de efluxo MmpS5-MmpL5
MNT	Micobactéria não tuberculosa
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NO	Óxido nítrico
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
R (variante)	Rugosa (Rough)
RAW 264.7	Linhagem de macrófagos murinos
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
S (variante)	Suave (Smooth/Lisa)
SRB	Sulforrodamina B
TDM	Trealose dimicolato
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador beta
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TTP	Tempo para positividade

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Critérios de Lipinski para Semelhança com Fármacos.	44
Quadro 2. Classificação de DL por Classe de Toxicidade (ProTox-II).	44
Quadro 3. Alvos moleculares de <i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> utilizados para docking com a DFO.....	43
Quadro 4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).	36
Quadro 5. Critérios de Interpretação FICI.....	38
Quadro 6. Sequências de primers utilizados.....	41
Quadro 7. Passo a Passo para o cálculo da expressão relativa – Método $2^{-\Delta\Delta C_t}$	42

RESUMO

A infecção por *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* (Mabs) representa uma ameaça crescente à saúde pública, especialmente para indivíduos imunocomprometidos. Novas estratégias terapêuticas que combatam a resistência da bactéria e destruam a estrutura do biofilme são urgentemente necessárias. A desferrioxamina (DFO), um quelante de ferro utilizado no tratamento de sobrecarga fêrrica, tem demonstrado potencial antimicrobiano devido à sua capacidade de limitar a disponibilidade de ferro, um elemento essencial para a sobrevivência de microrganismos. Esse estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana da desferrioxamina *in silico* e *in vitro* contra Mabs. Foram avaliados *in silico* para testes de predição de atividade farmacológica (Pass online), disponibilidade oral e farmacocinética (SwissADME e PROTOX), toxicidade (WaytoDrug) e a caracterização das interações moleculares da desferrioxamina com alvos enzimáticos específicos. Para a análise *in vitro*, foi realizado ensaios moleculares (PCR), análise da atividade antimicrobiana, investigação quanto a formação de biofilme contra Mabs. Os resultados demonstram que a avaliação *in silico* (PASS Online) apresentou alta probabilidade de antagonismo de ferro pela DFO ($P_a = 0,911$), sugerindo potencial inibição do crescimento bacteriano. A análise farmacocinética preditiva (SwissADME) indicou alta ligação plasmática (>90%) e baixa absorção intestinal da DFO, fatores que podem restringir sua biodisponibilidade sistêmica, moderada toxicidade, com efeitos mutagênicos e nefrotóxico. Docking molecular revelou interações promissoras da DFO com proteínas essenciais de Mabs, sugerindo efeito inibitório. Nos ensaios *in vitro* com células RAW 264.7, a DFO não apresentou citotoxicidade significativa. A DFO inibiu de maneira significativa a produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7 infectados por *M. abscessus*. Os resultados da concentração inibitória mínima da DFO, reforçam o potencial terapêutico da DFO e justificam a investigação de sua atividade antimicrobiana. A DFO demonstra um efeito dose-dependente na regulação da expressão de citocinas, em concentrações baixas (0,5 x CIM), a DFO reduz citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6. Diante dos achados, conclui-se que a DFO apresenta potencial como agente antimicrobiano adjuvante contra *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*, especialmente por sua capacidade de sequestrar ferro e comprometer a sobrevivência bacteriana.

Palavras chaves: *Mycobacterium abscessus*; *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*; Desferrioxamina; Resistência Antimicrobiana

ABSTRACT

Infections caused by *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* (Mabs) pose a growing public health threat, particularly for immunocompromised individuals. Consequently, novel therapeutic strategies are urgently needed to combat bacterial resistance and dismantle biofilm structures. Desferrioxamine (DFO), an iron chelator commonly used in the treatment of iron overload, has shown antimicrobial potential due to its ability to limit iron availability, an essential element for microbial survival. This study aimed to evaluate the antimicrobial activity of desferrioxamine *in silico* and *in vitro* against Mabs. *In silico* analyses were performed to predict pharmacological activity (PASS online), oral availability and pharmacokinetics (SwissADME and PROTOX), toxicity (WaytoDrug), and to characterize the molecular interactions of desferrioxamine with specific enzymatic targets. For the *in vitro* analysis, molecular assays (PCR), antimicrobial activity assessments, and biofilm formation investigations against Mabs were conducted. The results demonstrate that *in silico* evaluation (PASS Online) predicted a high probability of iron antagonism by DFO ($P_a = 0.911$), suggesting potential inhibition of bacterial growth. Predictive pharmacokinetic analysis (SwissADME) indicated high plasma protein binding (>90%) and low intestinal absorption of DFO, factors that may restrict its systemic bioavailability. Moderate toxicity was observed, with mutagenic and nephrotoxic effects. Molecular docking revealed promising interactions of DFO with essential Mabs proteins, suggesting an inhibitory effect. In *in vitro* assays with RAW 264.7 cells, DFO showed no significant cytotoxicity. DFO significantly inhibited nitric oxide production by *M. abscessus*-infected RAW 264.7 macrophages. The minimum inhibitory concentration results for DFO reinforce its therapeutic potential and warrant further investigation into its antimicrobial activity. DFO demonstrates a dose-dependent effect on cytokine expression regulation; at low concentrations (0.5 x MIC), DFO reduces pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-6. Given these findings, it is concluded that DFO has potential as an adjuvant antimicrobial agent against *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*, particularly due to its ability to sequester iron and compromise bacterial survival.

Keywords: *Mycobacterium abscessus*; *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*; Desferrioxamine; Antimicrobial Resistance

1 INTRODUÇÃO

Mycobacterium abscessus (*M. abscessus*), uma micobactéria não tuberculosa (MNT) caracterizada por seu rápido crescimento, vem emergindo como um patógeno oportunista de importância clínica crescente (Victoria *et al.*, 2021; Abdelaal *et al.*, 2022). Observa-se um aumento expressivo em sua prevalência, notadamente em infecções pulmonares, nas quais figura entre as MNT mais frequentes, com um amplo espectro de doenças, desde infecções pulmonares como pneumonia até osteomielite vertebral e infecções de tecidos moles (Degiacomi *et al.*, 2019; Senhaji-Kacha; Esteban; Garcia-Quintanilla, 2021). A capacidade do *Mycobacterium abscessus* de causar doença manifesta-se com maior intensidade em indivíduos portadores de doenças pulmonares preexistentes, como a fibrose cística, e em pacientes imunocomprometidos, evidenciando sua habilidade em explorar a suscetibilidade do hospedeiro (Abdelaal *et al.*, 2022; Ferrell *et al.*, 2022).

A *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* (Mabs), subespécie do complexo *Mycobacterium abscessus* (CMAB), é capaz de sobreviver em ambientes hostis e carentes de nutrientes, onde outros microrganismos concorrentes não sobreviveriam (Lima Viana *et al.*, 2018; Moraes-Neto *et al.*, 2022), graças à sua parede celular rica em lipídios que resulta em superfície hidrofóbica, facilitando a formação de biofilme, crescimento rápido e aderência às superfícies (Kolpen *et al.*, 2020; Dokic *et al.*, 2021).

A capacidade de *M. abscessus* de sobreviver no ambiente humano apresenta um grande problema, pois a persistência e disseminação de espécies de MNT em ambientes de saúde estão rapidamente se tornando uma ameaça significativa à saúde humana, especialmente por sua resistência antimicrobiana extremamente alta contra os antibióticos atuais (Born *et al.*, 2023; Cao *et al.*, 2024). A resistência bacteriana intrínseca e adquirida torna esta espécie um dos patógenos mais desafiadores, com tratamentos que duram de meses a anos, associados a potencial toxicidade antibiótica e alto número de falhas (Byrd; Chan, 2022; Conyers; Saunders, 2024). Mabs pode infectar e multiplicar-se dentro de células fagocíticas, escapando dos mecanismos de defesa do hospedeiro e resultando em infecção bem-sucedida (Lima Viana *et al.*, 2018).

Um mecanismo utilizado por esse bacilo para se multiplicar dentro dos macrófagos é a indução da heme-oxigenase-1 (HO-1), que reduz os efeitos do estresse oxidativo tóxico produzido pela célula, armazenando o ferro livre nas ferritinas e evitando a formação de radicais

livres pela reação de Fenton (Pereira *et al.*, 2023). Assim, os mecanismos de regulação do nível de ferro extracelular são cruciais para que os bacilos sobrevivam dentro dos macrófagos, o que destaca a importância da homeostase do ferro na patogênese micobacteriana (Phelan *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2023).

A desferrioxamina (DFO) forma complexos predominantemente com ferro férrico e íons trivalentes de alumínio, com constantes de formação de 10^{31} e 10^{25} , respectivamente, e afinidade menor para íons divalentes como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} (Codd *et al.*, 2018; Ding *et al.*, 2021). A quelação ocorre em base molar 1:1, de modo que 1 g de DFO pode ligar-se a 85 mg de ferro férrico ou 41 mg de Al^{3+} . Assim, a DFO captura o ferro livre no plasma e nas células, originando o complexo ferrioxamina, excretado predominantemente na urina (Codd *et al.*, 2018; Novartis Pharma Stein, 2018; Ding *et al.*, 2021). O ferro pode ser quelado da ferritina e hemossiderina, mas lentamente em concentrações clínicas, e a DFO não remove ferro da transferrina ou hemoglobina (Savastano *et al.*, 2019; Petrik *et al.*, 2021).

Estudos prévios demonstraram que a DFO pode suportar a função de derivados de monócitos humanos primários (hMDMs) infectados com *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), aumentando o metabolismo glicolítico e apoiando a função imune inata de maneira dependente do fator $1-\alpha$ induzível por hipóxia (HIF- 1α) (Chandrasekaran *et al.*, 2017; Araújo *et al.*, 2020; Cahill *et al.*, 2021). Consequentemente, a capacidade da DFO de aumentar a glicólise e a função imunológica inata tem potencial como terapia dirigida ao hospedeiro (*host-directed therapy* – HDT), em combinação com antimicrobianos atuais para *M. tuberculosis* (Holbein *et al.*, 2021; Lanzafame; Vento, 2021).

Verificar se a DFO poderá suportar a atividade antibacteriana e imunomoduladora em infecções por Mabs associada aos antimicrobianos de primeira linha sugere que quelantes de ferro podem ser uma terapia adjuvante eficaz em combinação com antimicrobianos atuais para infecções por Mabs. Nesse cenário, o presente trabalho se insere na interseção entre a necessidade de novas estratégias para o manejo de Mabs e o racional biológico para sugerir a DFO como potencial agente antimicrobiano adjuvante. Hipotetiza-se que a DFO, por sua capacidade de sequestrar ferro e modular a resposta imune, apresente atividade antimicrobiana *in silico* e *in vitro* contra *Mycobacterium abscessus* (*M. abscessus* subsp. *massiliense*), inclusive em modelos de biofilme e em associação com antibióticos de primeira linha.

Esta tese apresenta-se no formato de artigo, cuja organização está contida nos capítulos *Introdução* (que problematiza, apresenta esta pesquisa, além de fixar as hipóteses de estudo),

Referencial Teórico (que fundamenta as pesquisas até aqui desenvolvidas, bem como a lacuna de conhecimento a ser preenchida), *Objetivos* (Geral e Específicos) e *Resultados* divididos em três artigos:

Capítulo I – Bibliometric Review on New Possibilities of Antimycobacterial Agents: Exploring Siderophore Desferrioxamine's Applications as an Antimicrobial Agent (publicado em *Pharmaceuticals*, A1, FI 4.3);

Capítulo II – *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*: Biofilm Formation, Host Immune Response, and Therapeutic Strategies (publicado em *Microorganisms*, A1, FI 4.1);

Capítulo III – A Desferrioxamina Potencializa as Respostas Antimicrobianas e Imunomodulatórias contra *Mycobacterium abscessus*: Evidências Integradas *In Silico* e *In Vitro* (a ser publicado em *International Journal of Molecular Sciences*, A1, FI 4.9).

Ao final deste trabalho, no capítulo de Considerações Finais, apresentam-se principais resultados e o alcance dos objetivos propostos por esta tese, abordando limitações encontradas e apontando direções para estudos futuros.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Micobactérias não tuberculosas (MNTs)

As *Mycobacterium* não tuberculosas (MNT) incluem todas as espécies de bactérias do gênero *Mycobacterium* exceto *M. tuberculosis* (complexo de tuberculose) e *M. leprae* (Ministério da Saúde, 2021) e são bactérias ambientais ubíquas (solo, água doce, salobra e potável) que emergem como patógenos oportunistas em hospedeiros predispostos (Lanni *et al.*, 2022; Conyers; Saunders, 2024). Clássicas classificações (Runyon) dividem-nas em micobactérias de crescimento lento (formam colônias em >7 dias) e rápido (<7 dias), sendo as de crescimento rápido frequentemente associadas a infecções pós-operatórias e tegumentares (Runyon, 1959). As espécies mais comuns em doenças pulmonares humanas incluem o *M. avium* (MAC) e *M. kansasii* (crescimento lento) e *M. abscessus* (crescimento rápido) (Carneiro *et al.*, 2018). Recentemente, estudos moleculares refinaram a taxonomia, com o CMAB sendo subdividido em três subespécies (subsp. *abscessus*, *massiliense* e *bolletii*) com diferenças clínicas e de resistência (Tortoli *et al.*, 2016; Adekambi *et al.*, 2017).

MNT ocorrem em ambientes domésticos e de saúde, como a *M. avium* em sistemas de água potável e *M. abscessus* em vapor de nebulizadores e plásticos hospitalares. Essas bactérias geralmente não causam doença em pessoas saudáveis, mas são capazes de infectar pulmões e tecidos moles em condições favoráveis (Primm; Lucero; Falkinham, 2004). Infecções por MNT incluem doenças pulmonares crônicas, linfadenite, infecções cutâneas e disseminadas. A manifestação clínica varia de colonização assintomática a doença grave semelhante à tuberculose (To *et al.*, 2020; Ministério da Saúde, 2021).

A incidência global de infecções por MNT vem aumentando nas últimas décadas, especialmente em países desenvolvidos onde a tuberculose tem declinado (To *et al.*, 2020). A revisão sistemática sobre as tendências globais de infecções pulmonares por MNT revelou um aumento geral na incidência e prevalência dessas infecções e doenças ao longo do tempo. A taxa anual de mudança para infecções foi de 4,0% por 100.000 pessoas/ano, enquanto para doenças causadas por MNT foi de 4,1% por 100.000 pessoas/ano (Dahl *et al.*, 2022). Esse crescimento é atribuído ao aumento a fatores como maior expectativa de vida, aumento de doenças crônicas, intensificação de terapias imunossupressoras, melhorias nos métodos de diagnóstico e maior conscientização sobre essas micobactérias (Dahl *et al.*, 2022).

Doenças por MNT afetam principalmente pulmões, pele e tecidos moles. São mais frequentes em pessoas imunocomprometidas ou com condições pulmonares subjacentes (Abdelaal *et al.*, 2022; Ferrell *et al.*, 2022). Dados clínicos e demográficos indicam aumento de casos pulmonares de MNT em diversas regiões, sobretudo Ásia e América do Norte (To *et al.*, 2020).

Estudos mostram *M. abscessus* como uma das MNT mais resistentes e agressivas, especialmente em pacientes com fibrose cística (CF), alcançando 40,9% do pacientes (Sotiropoulou *et al.*, 2025). Pacientes com fibrose cística (CF), bronquiectasias, Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), silicoses ou em uso de imunossupressores (corticosteroides, anti-TNF, HIV/AIDS) apresentam risco elevado de infecções por MNT (To *et al.*, 2020). Na CF, as vias aéreas danificadas e muco viscoso favorecem colonização por MNT, na qual, dados sugerem que *M. avium* complex (MAC) e *M. abscessus* são responsáveis por ~75% e 25% das infecções por MNT, respectivamente, sendo a infecção por *M. abscessus* associada a declínio pulmonar rápido (Shteinberg *et al.*, 2018). Em estados imunossuprimidos, como HIV com CD4<50 ou usuários de antagonistas de TNF, a suscetibilidade aumenta, com MAC, promovendo doença disseminada em HIV, e *M. abscessus* resultando em infecção pulmonar refratária (Shteinberg *et al.*, 2018). A base fisiopatológica comum é que a limitação das defesas pulmonares locais e sistêmicas permite que MNT, que não infectam indivíduos normais, sejam patogênicas (Lima Viana *et al.*, 2018).

Em estudos populacionais recentes, CMAB foi identificada como fator independente de pior prognóstico, analisaram centenas de pacientes com MNT e mostraram que infecção reduziu significativamente a taxa de sucesso terapêutico e aumentou risco de morte em comparação com outras MNT (Odds Ratio de desfecho desfavorável ~1,16; $p<0,01$) (Valverde *et al.*, 2025). Complicadores como comorbidades e coinfeção por HIV ou *M. tuberculosis* também elevam as taxas de falha. Além disso, pacientes infectados têm deterioração acelerada do volume respiratório e são contraindicados a transplante pulmonar devido lesão pulmonar progressiva resultante de CMAB (Yoshida *et al.*, 2024). Dessa forma, a combinação de resistência antimicrobiana intrínseca e desvios imunopatológicos faz das infecções por *M. abscessus* uma das condições infecciosas mais difíceis de controlar (Tunesi *et al.*, 2024).

2.2 Complexo *Mycobacterium abscessus*

O CMAB compreende as subespécies *M. abscessus* subsp. *abscessus*, subsp. *massiliense* (apelido: *massiliense*) e subsp. *bolletii*. Essa reclassificação foi formalizada por Tortoli *et al.* (2016) e Adekambi *et al.* (2017) com base em análises genômicas e fenotípicas, distinguindo-as principalmente pela presença/ausência do gene *erm(41)*, que confere resistência eritromicínica.

M. abscessus subsp. *massiliense* (Mabs) atrai especial atenção clínica porque tipicamente possui *erm(41)* truncado, tornando-o sensível a macrolídeos (diferentemente de *abscessus* e *bolletii*), o que favorece melhores taxas de cura em certos pacientes (Hunt-Serracin *et al.*, 2019; Senhaji-Kacha; Esteban; Garcia-Quintanilla, 2021). Em termos de prevalência, em diversas regiões (China, Europa) Mabs representa ~10–40% dos isolados do complexo, frequentemente em fibrose cística (FC) e infecções cirúrgicas (Adekambi *et al.*, 2017).

A interação de *M. abscessus* com o sistema imunológico do hospedeiro é fortemente influenciada pela morfologia da colônia (lisa ou rugosa) que está ligada à expressão de glicopeptidolipídios (GPLs) na superfície celular (Degiacomi *et al.*, 2019; Byrd; Chan, 2022; Conyers; Saunders, 2024).

O fenótipos de colônia tipo liso (*smooth*), produz glicopeptídeos lipídicos (GPL) em sua parede e tende a formar biofilmes extracelulares, facilitando colonização de vias aéreas alteradas, mas é relativamente hipovirulento e a forma rugosa (*rough*) (sem GPL) tende a se agrupar em longas cordas celulares (*cording*), levando ao crescimento intracelular e à apoptose do macrófago (Conyers; Saunders, 2024; Degiacomi *et al.*, 2019), é pró-inflamatória e invasiva, destruindo macrófagos e tecidos (Byrd; Chan, 2022). Em modelagem por peixe-zebra, a forma rugosa mostrou alta virulência no estudo de Kam *et al.* (2022), que utilizou um modelo de infecção crônica em zebrafish adultos para investigar a patogênese do *M. abscessus* entre as variantes de colônia rugosa (R) e lisa (S), revelando que a variante lisa (S) teve maior proliferação ao longo de 28 dias, enquanto a (R) manteve carga estável e provocou resposta inflamatória mais intensa. A rugosa gerou granulomas necróticos rapidamente via sinalização de TNF e recrutamento de T reguladoras (Tregs), que limitaram o crescimento bacteriano. Já a lisa foi controlada pela imunidade inata dependente de TNF, com formação de granulomas tardia e menor resposta de células T.

As estirpes (R) demonstraram formar aglomerados (*cording*) que dificultam a fagocitose e podem ser resistentes à degradação lisossomal, levando ao crescimento intracelular e à apoptose do macrófago (Degiacomi *et al.*, 2019; Conyers; Saunders, 2024). Após a

apoptose, as bactérias (R) podem ser libertadas e formar grandes cordões extracelulares que resistem à fagocitose e causam inflamação excessiva e formação de abscessos. As estirpes (S) também podem resistir à degradação intracelular, possivelmente limitando a acidificação do fagossoma e comprometendo a integridade da membrana do fagossoma, o que pode facilitar a fuga para o citosol, onde evitam a morte induzida por autofagia (Roux *et al.*, 2016).

Durante a infecção, o *M. abscessus* tipo S pode sofrer alterações morfológicas e genéticas que levam à transição para o fenótipo R, o que permite que o MAB-R se espalhe mais eficientemente entre as células hospedeiras, criando um nicho favorável para sua sobrevivência (Kim *et al.*, 2019).

Essa adaptabilidade permite ao microrganismo sobreviver em pulmões com mucosidade anormal sem invadir tecidos saudáveis fáceis (tais hospedeiros resistem bem à infecção aguda) (Byrd; Chan, 2022). *M. abscessus* também expressa fatores como a proteína antigênica MmpL10 (ligante de fibronectina), *eis2* (acetiltransferase que modula respostas inflamatórias) e secreta enzimas neutrofílicas (lipases, proteases) que desviam o hospedeiro. Assim, pode modular o ambiente pulmonar ao induzir inflamação crônica (TNF, IL-8), mas evita eliminação eficaz ao formar biofilmes e produzir moléculas anti-fagocíticas (Byrd; Chan, 2022).

As cepas de CMABS formam biofilmes tanto em ambientes naturais quanto em condições de cultivo laboratorial (Faria; Joao; Jordao, 2015; Xiang *et al.*, 2014; Chakraborty; Kumar, 2019; Chakraborty *et al.*, 2021; Dokic *et al.*, 2021). No entanto, somente estudos recentes realizados em tecidos pulmonares de pacientes com FC e em tecidos não infectados forneceram evidências que corroboram a hipótese de que o crescimento de biofilme extracelular de CMABS também ocorre durante infecções pulmonares em humanos (Qvist *et al.*, 2015; Fennelly *et al.*, 2016; Høiby, 2017).

Os biofilmes consistem em microcolônias de bacilos imersas em matriz de polímeros extracelulares (DNA, glicoconjugados e lipídeos), que, sob condições de muco de FC apresentam glicanos de manose/glicose e fosfolipídeos como matriz chave, formam aglomerados 3D que suportam bactérias em vários estados metabólicos, protegendo *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* (Mab) de antibióticos e do sistema imune, facilitando persistência e infecção crônica (Belardinelli *et al.*, 2021).

Além disso, fatores genéticos e ambientais, como deficiência de ferro, mutações em genicas, podem aumentar ou diminuir a produção de EVs, as quais contêm lipoproteínas e

glicolípídeos que modulam a resposta imune do hospedeiro (Salgueiro *et al.*, 2024). Na forma intracelular, *M. abscessus* resiste a macrófagos evitando a fusão fagolisossomal, interferindo em citocinas pró-inflamatórias e retardando a apoptose (Bar-Oz; Meir; Barkan, 2022). Essa combinação de biofilme extracelular e habilidade de “hibernação” intracelular torna *M. abscessus* um patógeno extremamente difícil de erradicar.

As EVs são pequenas bolhas de membrana liberadas ativamente pelo patógeno que contêm lipídeos de parede, glicolípídeos, lipoproteínas e enzimas secretadas (Salgueiro *et al.*, 2024). Por analogia com *M. tuberculosis*, sabe-se as EVs que podem modular o hospedeiro, carregando antígenos que estimulam ou subvertem a resposta imunológica, por exemplo, induzindo IL-10 e TGF- β ou inibindo TNF, favorecendo a imuno-evasão (Cheng; Schorey, 2019). Também dispersam fatores de virulência para tecidos distantes e participam da estrutura do biofilme, anexando-se à matriz e reforçando a resistência coletiva (Flores, 2018; Salgueiro *et al.*, 2024). Dessa forma, representam potenciais alvos terapêuticos para interromper a virulência de *M. abscessus* (Vermeire *et al.*, 2024).

M. abscessus é notoriamente resistente a múltiplas classes de antibióticos devido a sua parede lipídica impermeável (ricas em ácidos micólicos) que confere menor penetração de drogas hidrofílicas (Singh *et al.*, 2017; Jacobo-Delgado *et al.*, 2023). Além disso, codifica numerosas bombas de efluxo (transportadores ABC, MmpL) e enzimas modificadoras de fármacos, como a *erm(41)* (unidade 23S rRNA metiltransferase), que torna muitos isolados resistentes a macrolídeos inducivelmente (Hilpert *et al.*, 2023); a *aac(2')*, *aph(3')*-acetiltransferases em MNT podem inativar aminoglicosídeos; beta-lactamases de classe A/B degradam cefalosporinas e carbapenemas (Nguyen *et al.*, 2024). Adicionalmente, a alta plasticidade genética é um fator crítico que favorece a adaptação e o surgimento de resistência adquirida (Nguyen *et al.*, 2024; Nguyen *et al.*, 2025).

A parede celular de micobactérias contém aproximadamente 60% de seu peso seco é constituído por lipídios (ácidos micólicos, glicolípídeos, lipoarabinomanana). Ácidos micólicos formam uma camada hidrofóbica espessa que impede a difusão passiva de muitos antibióticos hidrofílicos (Jacobo-Delgado *et al.*, 2023). Singh *et al.* (2017) destacam que tal estrutura em forma de concha protege o bacilo não só contra antibióticos, mas também contra danos oxidativos e complemento. Em *M. abscessus*, essa barreira lipídica, junto com menos porinas comparada a bactérias Gram-negativas, torna difícil a entrada de moléculas como beta-lactâmicos e fluoroquinolonas e dessa forma, a impermeabilidade combinada com bombas de

efluxo maximiza a resistência intrínseca (Jacobo-Delgado *et al.*, 2023).

2.3 Esquemas terapêuticos atuais e limitações

Devido à multirresistência, o tratamento de *M. abscessus* exige combinações de múltiplos antibióticos por longo período. As diretrizes (ATS/IDSA) recomendam regimens baseados em macrolídeo (claritromicina ou azitromicina), frequentemente em combinação com aminoglicosídeo (amikacina IV) e outros agentes (p.ex. cefoxitina, imipenem, tigeciclina), ajustados conforme testes de suscetibilidade (Novosad *et al.*, 2016). Em prática clínica, Novosad *et al.* (2016), um dos poucos estudos a avaliarem os efeitos desses antibióticos, mostraram que o regime mais usado foi amikacina IV + um segundo antibiótico IV (imipenem ou tigeciclina) + um macrolídeo oral e dependendo do caso, podem ser usados injetáveis (amikacina, imipenem, cefoxitina) e orais (claritromicina, minociclina, linezolida, ciprofloxacino). Em doença pulmonar cavitária, recomenda-se considerar ressecção cirúrgica de lesão após quimioterapia inicial. Para *M. abscessus* subsp. *massiliense*, a sensibilidade a claritromicina torna o prognóstico relativamente melhor, mas ainda é necessário tratamento intensivo.

Amikacina (aminoglicosídeo) e claritromicina (macrolídeo) são pilares no tratamento de *M. abscessus*. Amikacina IV é altamente bacteriostática e, combinada a outros, melhora taxas de conversão microbiológica; foi usada em ~65% dos casos no estudo de Novosad *et al.* (2016). Claritromicina/azitromicina são eficazes contra isolados sem resistência ao macrolídeo (especialmente subsp. *massiliense*), sendo usadas em ~70% dos pacientes estudados. Essas drogas atacam diferentes alvos (proteossoma ribossômico e síntese proteica), tornando-as complementares. Entretanto, a dependência de amikacina e claritromicina se explica pela escassez de outras opções seguras e ativas contra *M. abscessus* (Novosad *et al.*, 2016).

Amikacina causa nefrotoxicidade e ototoxicidade, especialmente em administração prolongada e a claritromicina provoca efeitos gastrointestinais, arritmias e pode induzir resistência e ainda, muitos isolados já têm resistência intrínseca via mutações espontâneas. O que é descrito por Novosad *et al.* (2016), que observaram que 82% dos pacientes precisaram trocar regime terapêutico devido a esses efeitos adversos ou falta de eficácia. A duração longa (≥ 12 meses) aumenta a taxa de abandono e complicações e mesmo com uso otimizado, as taxas de cura permanecem baixas ($< 50\%$), e recidiva é comum.

Estudos apontam que o regulador de estresse oxidativo *whiB7* em *M. abscessus* controla a expressão de múltiplos genes de resistência, como demonstrado por Pryjma *et al.* (2017), o *whiB7* é ativado por claritromicina e, por sua vez, regula genes que conferem resistência a amikacina, acriflavina e tigeciclina. Assim, administrar claritromicina pode desencadear antagonismo contra amikacina via indução de *whiB7*. Além disso, a expressão de *whiB7* e outros reguladores de tensão (como *sigH*) pode levar a tolerância não específica a antibióticos e isso ocorre porque esses reguladores são ativados por sinais de estresse ambiental, incluindo a exposição a antibióticos, e induzem a expressão de genes que conferem resistência a uma ampla gama de medicamentos (Burian *et al.*, 2012). Portanto, alguns regimes de dupla terapia para *M. abscessus* podem apresentar efeitos antagônicos não evidentes sem estudos moleculares aprofundados.

Em MTNs e, em especial, o CMAB, as estratégias com drogas repotenciadas como bedaquilina e clofazimina têm sido investigadas pela atividade contra cepas clínicas e pelo potencial antibiofilme, embora a utilidade de clofazimina isoladamente seja variável (Kania *et al.*, 2025; Yao *et al.*, 2025). Abordagens não farmacológicas, como a terapia fágica, também ganharam destaque como adjuvantes, sobretudo em casos refratários e intracelulares (Schmalstig *et al.*, 2024).

Estudos clínicos e experimentais sustentam o interesse em imunomoduladores, como o interferon- γ , e em fármacos capazes de reforçar a resposta imune antimicobacteriana, incluindo a vitamina D, que atua sobre a atividade microbicida de macrófagos e a produção de peptídeos antimicrobianos em modelos de micobactéria (Teixeira *et al.*, 2018; Jolliffe *et al.*, 2025). A pesquisa de novas moléculas, como inibidores de biofilme, moduladores de resistência e inibidores de vias relacionadas à captação de ferro, é crítica para ampliar o arsenal terapêutico e reduzir doses e toxicidade global (Kania *et al.*, 2025; Stelitano *et al.*, 2025). Outra estratégia promissora é a quelação de ferro associada a antibióticos, pois a restrição de ferro prejudica a sobrevivência micobacteriana e pode favorecer a depuração bacteriana; em modelos de micobactérias, a deferoxamina mostrou efeito adjuvante ao restaurar a capacidade de eliminação intracelular e a maturação fagolisossomal (Kotey *et al.*, 2023).

2.4 Ferro na biologia micobacteriana

Micobactérias usam ferro em enzimas vitais como ribonucleotídeo redutase (síntese

de DNA), citocromos (respiração), catalases-peroxidases e desidrogenases (metabolismo energético) (Rodriguez; Smith, 2003; Ratledge, 2004). Sem ferro, as bacilárias não conseguem sintetizar ácidos nucleicos nem manter respiração oxidativa eficiente, paralisando o crescimento (De Oliveira *et al.*, 2019; Pereira *et al.*, 2023). Além disso, o ferro influencia diretamente a virulência, na qual muitos fatores de patogenicidade micobacteriana (por exemplo, produção de lipídios de parede) dependem de ferro para ativação enzimática (Ferrell *et al.*, 2022). Portanto, a aquisição de ferro é crítica para infecções por *M. abscessus*, já que limitar o ferro no ambiente inibe a multiplicação e expressão de fatores de virulência, como sideróforos carboximicobactinas/micobactinas e ferritinas reguladas por IdeR, que são induzidas durante infecção em macrófagos (De Oliveira *et al.*, 2019; Pereira *et al.*, 2023).

Em micobactérias, a homeostase do ferro é rigidamente regulada por proteínas reguladoras como IdeR (em *M. tuberculosis*) atuam como repressores/dessensores de genes de captação de ferro conforme o metal está abundante ou escasso (Sritharan, 2016). *M. abscessus* presumidamente possui sistema análogo (genes homólogos do sistema IdeR). Quando o ferro extracelular é abundante, IdeR reprime sideróforos para evitar toxicidade por ferro livre; quando escasso, ativa genes de sideróforos e transporte para captar ferro disponível (Pandey; Rodriguez, 2014). Além disso, micobactérias armazenam ferro em proteínas semelhantes à ferritina (Bfr) para evitar dano oxidativo por ferro livre (Pereira *et al.*, 2023).

M. abscessus adquire ferro principalmente por sideróforos, moléculas de alta afinidade por Fe(III), conforme estudos recentes que identificaram um sideróforo peculiar (tipo micobactina) denominado MBT Ab (*Mycobactin A. abscessus*), secretado via sistema ESX-3 (Bythrow *et al.*, 2022; Foreman; Kolodkin-Gal; Barkan, 2022). Esse sideróforo recolhe ferro do hospedeiro e o reimporta para o bacilo, com o sistema ESX-3 sendo essencial para sua exportação e utilização (Bythrow *et al.*, 2022). Mutantes de *M. abscessus* deficientes na biossíntese de MBT Ab (*mbtE*) ou no sistema ESX-3 mostram crescimento comprometido em baixos níveis de ferro, demonstrando que esse mecanismo é vital para sobrevivência e virulência do germe (Bythrow *et al.*, 2022; Foreman; Kolodkin-Gal; Barkan, 2022). Outro sistema possível é a captação de heme via transportadores (como Mhu/MmpL11), implicados na aquisição de ferro heme-dependente (Dubois *et al.*, 2019). A importância biológica desses sistemas se reflete no fato de que, sem eles, *M. abscessus* não sobreviveria nos sítios de infecção, onde o hospedeiro restringe ferritina e transferrina via imunidade nutricional (Bythrow *et al.*, 2022).

A limitação de ferro força *M. abscessus* a reprogramar seu metabolismo central. Enzimas do ciclo de Krebs e da cadeia respiratória contêm grupos ferro-enzima (Fe-S), assim, com pouco ferro ativo, essas vias desaceleram (Foreman; Kolodkin-Gal; Barkan, 2022; Pereira *et al.*, 2023). Isso leva à redução de crescimento e entrada em estados lentos ou dormância, o que protege o bacilo de antibióticos bactericidas, que requerem divisão ativa e, em paralelo, a deficiência de ferro diminui a produção de NADH e ATP, limitando a energia bacteriana (Foreman; Kolodkin-Gal; Barkan, 2022). Essa combinação de baixo crescimento e alterações metabólicas confere vantagem adaptativa: o microrganismo sobreviverá em condições hostis (células mortas) até que o ferro esteja disponível (Ferrell *et al.*, 2022).

2.5 Desferrioxamina

2.5.1 Origem, farmacologia, uso clínico e segurança

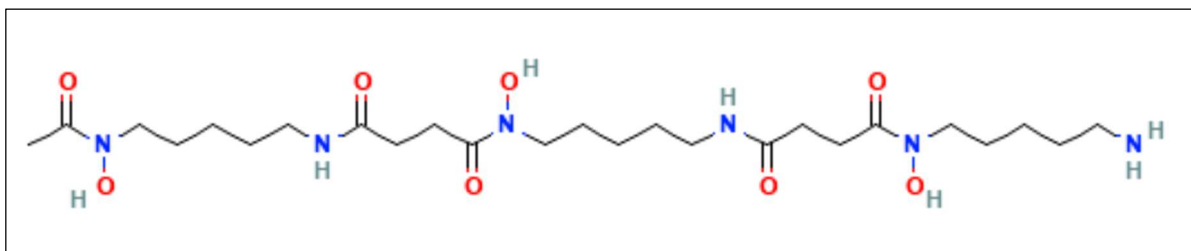
A desferrioxamina B (DFO, ou deferoxamina) é um sideróforo natural de *Streptomyces pilosus*, desenvolvido como fármaco quelante de ferro. Comercializada como Desferal®, é aprovada para tratar sobrecarga de ferro por transfusões (talassemia, anemia sideroblástica) e intoxicação aguda de ferro, ligando fortemente Fe(III) formando um complexo solúvel (ferroxamina) excretável pela urina (Velasquez; Wray, 2023). É administrada por via parenteral (IV ou SC infusão prolongada) devido à baixa biodisponibilidade oral. Em pacientes crônicos, DFO é bem tolerada em doses escalonadas (até ~50 mg/kg/dia), mas requer monitorização. Off-label, já foi testada em intoxicação por alumínio (diálise) e doenças infecciosas em pequena escala (Velasquez; Wray, 2023).

DFO é um tri-hidroxiato que se liga quase exclusivamente a com constante de afinidade de $\sim 10^{31} \text{ M}^{-1}$ (Codd *et al.*, 2018; Ding *et al.*, 2021). Ela forma um complexo hexadentado (1:1) com o ferro, retirando ferro livre das proteínas do hospedeiro (ferritina/lábile pool) e de sideróforos bacterianos (Codd *et al.*, 2018; Novartis Pharma Stein, 2018; Ding *et al.*, 2021). No nível molecular, DFO sequestra ferro criando um déficit local para o microrganismo; por exemplo, se *M. abscessus* excreta um sideróforo, DFO pode capturar esse ferro e tornar indisponível, interrompendo a cascata de captação (Savastano *et al.*, 2019; Petrik *et al.*, 2021). Em células humanas, DFO desfaz a ligação ferro-transferrina, reduzindo o ferro acessível. Assim, o mecanismo geral é a privação de ferro, valendo-se da afinidade maior de DFO por

Fe^{3+} que a de muitos ligantes biológicos (Pawlaczyk; Schroeder, 2021).

A fórmula molecular da desferrioxamina B é $\text{C}_{25}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{O}_8$ (Katif *et al.*, 2021). A estrutura da DFO inclui grupos hidroxamato e um grupo amina terminal (Savastano *et al.*, 2019) (Figura 1).

Figura 1 – Estrutura química da molécula da desferrioxamina.



Fonte: PubChem chemistry database (National Institutes of Health, 2025).

A DFO é administrada parenteralmente devido à quase nula absorção oral, sendo injetado por infusões prolongadas (normalmente via subcutânea por 8-12 h/dia) e sua meia-vida é curta (20-30 min intravenoso), exigindo alto volume e frequência de doses para manter efeito quelante (Velasquez; Wray, 2023).

A DFO é considerada adjuvante em algumas infecções, especialmente as fúngicas, como mucormicose, onde paradoxalmente piora o quadro por fornecer ferro ao fungo *Rhizopus*, mas em outras infecções bacterianas pode ter efeito oposto (Velasquez; Wray, 2023). Estudos sobre tuberculose indicam que a quelação de ferro pode potencializar fármacos tuberculostáticos. *In vitro*, a combinação de DFO com bedaquilina reduziu a carga de *M. tuberculosis* em macrófagos (Phelan *et al.*, 2018). Em infecções virais e parasitárias (leishimaniose), a privação de ferro como estratégia terapêutica tem sido explorada (Banerjee, S.; Datta, 2023). No contexto de micobactérias, a DFO não é direcionada ao patógeno, mas ao ferro, podendo atuar indiretamente em qualquer infecção bacteriana dependente de ferro (Nairz; Weiss, 2020).

DFO é geralmente bem tolerada, mas os efeitos adversos incluem lesão retiniana (retinopatia) e auditiva (neuropatia auditiva), relacionadas à dose acumulada, retardo de crescimento em crianças, distúrbios ósseos (acúmulo de alumínio), e risco elevado de infecções atípicas, especialmente fungos (mucormicose) e bactérias siderofílicas como *Yersinia enterocolitica* e *Vibrio vulnificus* (Hamilton *et al.*, 2016; Velasquez; Wray, 2023). A maioria das reações é leve a moderada e transitória, embora a urina possa apresentar coloração avermelhada (Codd *et al.*, 2018; Novartis Pharma Stein, 2018). A DFO, ao fornecer ferro ao

patógeno (ferrioxamina), pode agravar infecções por esses organismos. Portanto, a quelação prolongada por DFO deve ser acompanhada de monitorização oftalmológica e auditiva periódica (Flora; Pachauri, 2010).

Em relação ao perfil de segurança, a desferrioxamina não é classificada como uma molécula tipicamente hemolítica, mas ao contrário, há trabalhos mostrando efeito protetor em eritrócitos sob estresse oxidativo (Santos *et al.*, 2009; Hermann, 2011). A literatura sugere um perfil biológico compatível com modulação redox e imunometabólica, sem evidência de atividade hemolítica (Santos *et al.*, 2009; Phelan *et al.*, 2020).

Em células imunes, essa modulação pode envolver a via do óxido nítrico, uma vez que o NO participa da defesa antimicrobiana e do balanço inflamatório do macrófago (O'Neill; Artyomov, 2019; Palmieri; Gow, 2026). Em modelos infecciosos e inflamatórios, a privação de ferro por quelantes pode alterar a produção de espécies reativas de nitrogênio e o balanço redox, o que ajuda a explicar por que DFO pode modular a atividade microbica sem depender apenas de citotoxicidade direta (O'Neill; Artyomov, 2019; Phelan *et al.*, 2020).

A citotoxicidade da DFO depende fortemente da forma de entrega, da dose e do modelo celular; em formulações otimizadas, a toxicidade pode ser significativamente reduzida (Xu *et al.*, 2020). Em estudos com macrófagos humanos, a DFO foi associada a alterações metabólicas e imunometabólicas sem indicação de dano celular grosseiro nas condições avaliadas, sustentando a ideia de efeito biológico não citotóxica (Phelan *et al.*, 2020).

2.5.2 Propriedades quelantes e mecanismo de sequestro de ferro

Embora DFO não seja bactericida direto, reduz a disponibilidade de ferro essencial para o patógeno, inibindo o crescimento bacteriano. Há evidências de que DFO e análogos podem travar crescimento de *M. tuberculosis in vitro*, exigindo concentração mais alta e de outras bactérias, como *Pseudomonas* e ainda pode sensibilizar o microrganismo a outros antimicrobianos: como demonstrado em TB, DFO aumenta o metabolismo glicolítico de macrófagos e resposta inflamatória, o que pode ajudar a eliminar bacilos (Phelan *et al.*, 2018).

DFO, como um quelante hexadentado de alta afinidade, forma complexos estáveis predominantemente com Fe^{3+} (constante de formação $K_f = 10^{31}$) e Al^{3+} ($K_f = 10^{25}$), com capacidade de ligar ~8,5 mg de ferro férrico por 100 mg de DFO (Novartis Pharma Stein, 2018). Sua principal função é remover o excesso de ferro livre ou alumínio do organismo, deslocando-

os da ferritina e hemossiderina, mas não da transferrina ou hemoglobina, assim, a DFO se liga ao excesso de ferro ou alumínio, formando os complexos ferrioxaminas e aluminioxamina, respectivamente (Fisher *et al.*, 2013).

Estudos com complexos de metal mostram que a DFO possui múltiplas unidades quelantes (Savastano *et al.*, 2019). Ao se complexar com íons metálicos como Fe^{3+} ou Zr^{4+} , os grupos quelantes da DFO se dispõem ao redor do centro metálico. No caso do Fe^{3+} , as três unidades quelantes geralmente se organizam como uma hélice ao redor do íon hexa-coordenado (Savastano *et al.*, 2019; Katif *et al.*, 2021). Com o Zr^{4+} , o centro metálico pode ser octa-coordenado, com a esfera de coordenação saturada pelos grupos quelantes da DFO e, por exemplo, o átomo de nitrogênio do grupo amina terminal e uma molécula de água, ou duas moléculas de água (Savastano *et al.*, 2019).

No organismo, DFO difunde livremente no líquido intersticial e alcança tecidos ricos em ferro (fígado, coração, bazo) devido à sua distribuição extracelular ampla (Vichinsky *et al.*, 2007). Embora existam análogos orais (deferassirox, deferiprona), eles diferem estruturalmente (deferassirox: ácido tridentado; deferiprona: hidroxipiridona bidentada) e não são diretamente intercambiáveis em estudos antimicrobianos, pois possuem perfis de afinidade e toxicidade distintos (Xia *et al.*, 2013). Portanto, o uso de DFO como coadjuvante infeccioso enfrenta desafios logísticos, como administração complexa e possíveis níveis inadequados em locais de infecção crônica devido à meia-vida curta e baixa penetração tecidual (Neufeld, 2006; Mukherjee *et al.*, 2025).

2.5.3 Atividade antibiofilme

O biofilme confere resistência não genética a antimicrobianos, na qual a matriz extracelular impede a penetração de antibióticos, criando gradientes de concentração, como bacilos mais internos recebem doses subletais, permitindo sobrevivência e seleção de tolerantes (Babrak *et al.*, 2015). Além disso, microrganismos em biofilme tendem a estados metabolicamente latentes, tornando antibióticos que matam bactérias em crescimento ativa pouco eficazes e, imunologicamente, o biofilme oculta antígenos de detecção celular e resiste a fagocitose, possibilitando presença prolongada do patógeno (Ferris, 2017). Belardinelli *et al.* (2021) apontam que os biofilmes de *M. abscessus* são um dos principais motivos pelos quais

infecções pulmonares por esse microrganismo são de difícil cura com antibióticos convencionais.

Estudo de Wille *et al.* (2022) demonstrou que DFO isolada apresentou atividade antibiofilme contra *M. abscessus*, com formação de biofilme significativamente inibida em condição de privação de ferro, sugerindo que DFO potencializa indiretamente a ação de macrolídeos em biofilmes. Dessa forma, DFO é considerado um candidato de terapia combinada, visando reduzir a ferrilaxia bacteriana enquanto os antibióticos convencionais atacam.

2.5.4 Atividade imunomoduladora

A DFO pode ter efeito imunomodulador benéfico, como descrito no estudo de Phelan *et al.* (2020), que mostrou que DFO aumentou a produção de IL-1 β em macrófagos humanos infectados por *M. tuberculosis*, via estabilização de HIF-1 α . A IL-1 β é crucial para eliminar micobactéria, então esse achado sugere que DFO estimula respostas pró-inflamatórias eficazes. Ademais, DFO promoveu metabolismo glicolítico em células infectadas, sem citotoxicidade detectável. Isso sugere que DFO pode reforçar a atividade antimicrobiana de macrófagos sem matar as células hospedeiras. Se esse efeito se aplica a *M. abscessus*, DFO poderia melhorar a eficácia microbicida dos macrófagos pulmonares em infecções por este patógeno, reduzindo simultaneamente a sobrecarga inflamatória crônica graças à estabilização metabólica (HIF-1 α dependente), uma vez que, em tuberculose, estratégias HDT (*host-directed therapy*) propõem aumentar ações macrofágicas antimicrobianas ou modular citocinas-chave (Flynn; Chan, 2001). No contexto de *M. abscessus*, a imunomodulação pode significar estimular macrófagos a produzir mais espécies reativas ou citocinas protetoras, sem exacerbar uma inflamação destrutiva.

2.6 Sinergismo antimicrobiano com Desferrioxamina

A sinergia antimicrobiana ocorre quando a ação combinada de dois ou mais agentes, como medicamentos, peptídeos antimicrobianos ou quelantes, produz um efeito biologicamente maior que a soma de seus efeitos isolados (Taheri-Araghi, 2024). Essa potenciação pode resultar no aumento da permeabilidade da membrana bacteriana, facilitando entrada do segundo

agente, na inibição de bombas de efluxo que causariam resistência, bloqueio de vias metabólicas complementares, na desestabilização de estruturas de virulência como biofilmes e na modulação da resposta imunológica do hospedeiro (Gonçalves *et al.*, 2025). Em *M. abscessus* multirresistente, a estratégia de combinações sinérgicas permite contornar resistência intrínseca via redução de concentrações bactericidas necessárias (Lopeman *et al.*, 2020).

O teste *checkerboard* é o método padrão *in vitro* para avaliar interações antimicrobianas e baseia-se em matrizes bidimensionais de diluições seriadas de dois agentes testados simultaneamente, vantajoso devido a simplicidade e reprodutibilidade, embora seja estático e não capture dinâmica temporal de interações (Brennan-Krohn; Kirby, 2019). Em cada poço, duas séries de concentrações, uma crescente de cada agente, são ensaiadas, permitindo determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) combinada para cada ponto onde não há crescimento bacteriano visível, assim o Índice Fracionário de Inibição (FICI) é então calculado (Brennan-Krohn; Kirby, 2019). Os critérios interpretativos padronizados são $FICI \leq 0,5$, indicando sinergia, $0,5 < FICI \leq 4,0$, indicando aditividade/indiferença, e $FICI > 4,0$ (antagonismo) (Odds, 2003).

Estudos clínicos de DFO e antibióticos estão em andamento, mas dados específicos em *M. abscessus* ainda são escassos (Wille, 2022). A claritromicina e amicacina emergem como promissores nessa interação, com sinergias demonstradas em pesquisa com peptídeos antimicrobianos, os quais exercem ação sobre membranas bacterianas, com mecanismos que também envolvem competição por ferro ou modulação imunológica do hospedeiro, e cuja interação promove redução de FICI (Mhlongo *et al.*, 2023).

Estudos recentes indicam que a claritromicina, isoladamente, em *M. abscessus*, podem aumentar a secreção de EVS e o tráfego proteico, contribuindo para resistência ao fármaco (Vermeire *et al.*, 2024). Os resultados dos estudos de Flores (2018) revelaram que, apesar de serem alternativas terapêuticas para micobactérias de crescimento rápido (MCR), *M. abscessus* mostrou resistência à claritromicina e ainda, a inibição da formação de biofilmes e sua erradicação não foram completamente atingidas. No entanto, a resistência adquirida a claritromicina pode estar relacionada à mutações pontuais que acarretam substituição da adenina na posição 2058 ou na posição 2059 na região do gene *rrl* que codifica o domínio peptidil transferase do rRNA 23S (Carneiro, 2016).

Adicionalmente, a resposta ao fármaco pode depender da formulação utilizada, na qual a claritromicina nanoencapsulada demonstrou superioridade na inibição da formação de

biofilmes e na destruição da matriz microbiana em comparação à forma cristalina/livre, em todas as concentrações testadas e para as três cepas de MCR avaliadas (Flores, 2018).

As diretrizes oficiais de prática clínica da ATS/ERS/ESCMID/IDSA (American Thoracic Society / European Respiratory Society / European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases / Infectious Diseases Society of America) para infecções por *M. abscessus* recomendam, diante dos efeitos benéficos versus riscos de resistência, iniciar o tratamento com um regime multidrogas que inclua macrolídeos, abrangendo no mínimo três fármacos com eficácia comprovada *in vitro* (Daley *et al.*, 2020).

Estudos indicam que a claritromicina pode ter sua atividade expandida quando combinada com outras drogas, como rifabutina (Aziz; Go; Dick, 2020). Similarmente, a combinação DFO + claritromicina, que é bacteriostática e liga-se à subunidade 50S ribossômica, inibindo síntese proteica em *M. abscessus* com sensibilidade macrolídica (Kanatani; Guglielmo, 1994; Flores, 2018), é teoricamente sinérgica porque atua via mecanismos complementares, enquanto a DFO restringe ferro (limitando síntese de enzimas vitais), a claritromicina bloqueia síntese proteica. Dessa forma, a Desferrioxamina tem potencial para modular a produção de EVs e a resistência à antibióticos (Temel; Aksoyalp, 2024).

Em relação a amicacina, que é um aminoglicosídeo, bactericida e causa dano letal direto via inibição da tradução proteica e indução de dano ao DNA e pode manter atividade contra cepas resistentes à tobramicina e à gentamicina devido à menor inativação pelas enzimas bacterianas acetilase, adenilase e fosforilase (Sizar; Rahman; Sundareshan, 2023).

A amicacina, sozinha ou em combinação com outros antibióticos, é usada para tratar uma variedade de infecções graves causadas por bactérias Gram-negativas aeróbicas, bem como micobactérias e *Nocardia* (Ramirez; Tolmasky, 2017), atuando de forma bactericida ao se ligar à subunidade 30S do ribossomo bacteriano, causando erros na tradução de proteínas e, consequentemente, danos à membrana citoplasmática e morte celular (Ramirez; Tolmasky, 2017).

O estudo recente de Erinmez e Zer (2024), que investigam os efeitos *in vitro* do DFO na suscetibilidade a antibióticos de bactérias Gram-negativas, com foco na potencialidade de sinergia e mecanismos de ação, reforçam a hipótese de que a privação de ferro pode aumentar a eficácia de antibióticos como a amicacina, mas mostram que o efeito depende das características específicas da bactéria. Em *M. abscessus*, DFO + amicacina pode produzir

sinergismo promovendo a privação de ferro e reduzindo o estado metabólico bacteriano, tornando o bacilo menos capaz de reparar dano, enquanto amicacina causa dano direto letal, resultante de sinergismo bacteriostático + bactericida.

A importância da amicacina (aminoglicosídeo) e claritromicina (macrolídeo) no manejo da infecção reside no fato de que a Amicacina é altamente bacteriostática e, combinada a outros, melhora taxas de conversão microbiológica e claritromicina são eficazes contra isolados sem resistência ao macrolídeo (Novosad *et al.*, 2016), atacando diferentes alvos, tornando-as complementares, mas seu uso exige atenção aos efeitos colaterais e à possibilidade de resistência induzida (Kim *et al.*, 2015).

O uso de adjuvantes como DFO oferece valor clínico por abordar a homeostase de ferro, não coberto por antibióticos, potencialmente reverter resistência ao reduzir metabolismo bacteriano, inibir biofilmes e virulência, permitir redução de doses de antibióticos convencionais, reduzindo toxicidade (Wille, 2022). Adicionalmente, o uso bem-sucedido de relebactam + imipenem + amoxicilina contra *M. abscessus* MDR, eliminou 100% de isolados clínicos pela ação sinérgica dos inibidores de beta-lactamase (Lopeman *et al.*, 2020).

Outra vantagem reside na redução de doses viabilizada pela terapia sinérgica. Quando DFO combinado com claritromicina ou amicacina exibe sinergia ($FICI \leq 0,5$), as CIM efetivas podem diminuir 2 a 10 vezes em comparação aos fármacos isolados (Taheri-Araghi, 2024). Essa abordagem permite diminuir a dose de amicacina, mitigando nefro e ototoxicidade, reduzir a claritromicina, diminuindo riscos de arritmias, interações via citocromo P450 e intolerância gastrointestinal, e empregar DFO, com perfil de segurança estabilizado em uso crônico para talassemia, cujos efeitos adversos (retinopatia, neuropatia auditiva) são monitoráveis e reversíveis (Neufeld, 2006; Cappellini, 2008). Adicionalmente, pesquisas em andamento indicam que terapias combinadas contra *M. abscessus* podem reduzir a duração total de tratamento, reduzindo abandono terapêutico (Jong *et al.*, 2025).

2.7 Análises *in silico* de mecanismos adjuvantes da DFO

Estudos *in silico* de *docking* auxiliam a descobrir novos fármacos ao simular rapidamente a interação entre compostos candidatos e alvos proteicos moleculares (Villoutreix *et al.*, 2008; Vakser, 2014). Essa abordagem economiza tempo e custo, permitindo priorizar compostos antes de ensaios experimentais a partir de ferramentas computacionais

particularmente úteis na triagem virtual de bibliotecas químicas contra alvos-chave de micobactérias, e têm sido validadas historicamente em tuberculose para guiar modificações de drogas (Kitchen *et al.*, 2004).

O *docking* molecular determina interações energéticas favoráveis entre ligante e alvos de interesse, prevendo posições e orientações que maximizam ligações de hidrogênio, hidrofóbicas e complementariedade estrutural (Ferreira, 2013). Os estudos *in silico* de *docking* são essenciais para explorar a interação da desferrioxamina com alvos proteicos de *M. abscessus*, permitindo inferir afinidades e mecanismos no contexto de privação de ferro, resistência e virulência (Abbas *et al.*, 2025). Essa abordagem integra-se à descoberta de fármacos contra micobactérias não tuberculosas, considerando a atividade antibiofilme e antimicrobiana da desferrioxamina já demonstrada *in vitro* (Wille, 2022).

Estudos *in silico* reduzem drasticamente o número de moléculas a serem sintetizadas e testadas experimentalmente, graças à alta preditividade dos métodos computacionais na previsão de interações ligante-alvo (Ferreira, 2013). No contexto de *M. abscessus*, eles aceleram a identificação de inibidores para alvos como InhA, essenciais para biossíntese de ácidos micólicos e superação de resistência (Abbas *et al.*, 2025).

Dentre os alvos de interesse de análise de interações energéticas favoráveis, a Eis2 atua como enzima modificadora de aminoglicosídeos, conferindo resistência, como descrito em estudos cristalográficos de alta resolução, nos quais dados *in vivo* sugerem que a deleção de *eis2* aumenta significativamente a atividade antibacteriana da amicacina no tratamento de infecções por CMAB (Lorè *et al.*, 2022). Outro alvo é a InhA, enoil-ACP redutase, que é essencial para biossíntese de ácidos micólicos, com *docking* recente identificando hits potentes via triagem virtual (Abbas *et al.*, 2025). Fumarase, por sua vez, participa do ciclo de Krebs, enoil-CoA hidratase/isomerase da β -oxidação de lipídios, TrxB2 na redução de tioredoxina contra estresse oxidativo, e F-ATP sintase na fosforilação oxidativa essencial (Ruth *et al.*, 2019; Fong *et al.*, 2026).

Esses alvos ligam o metabolismo energético (fumarase, F-ATP sintase, enoil-CoA hidratase na β -oxidação) à virulência, como troca para ácidos graxos intracelular e formação de biofilme ferro-dependente (Dubois *et al.*, 2019). Eis2 e TrxB2 promovem resistência a aminoglicosídeos e estresse oxidativo, respectivamente, enquanto InhA afeta parede celular e persistência (Dubois *et al.*, 2019; Lorè *et al.*, 2022). A DFO, sequestrando ferro, potencializa

inibição desses processos ferro-dependentes, reduzindo sobrevivência e inflamação (Wille, 2022).

Ressalta-se que o *docking* tem limitações, uma vez que emprega proteínas em uma conformação estática, ignorando flexibilidade dinâmica do alvo, e geralmente simplifica a solubilidade e entropia do ligante (Abbas *et al.*, 2025), assim a validação experimental, como ensaios bioquímicos, citotoxicidade e *in vivo*, é imperativa.

Outro método de análise *in silico* trata-se do serviço PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances), ferramenta capaz de prevê o espectro de atividades biológicas de um composto com base em sua estrutura química, fundamentando-se no princípio de que a atividade biológica é determinada pela estrutura molecular (Parasuraman, 2011), avaliando compostos quanto à probabilidade de atividade biológica (Pa) e probabilidade de inatividade (Pi), gerando um espectro predito de ações farmacológicas com base em estrutura molecular (Filimonov *et al.*, 2014).

Ferramentas como PASS e análises de expressão diferencial podem sugerir perfis biológicos compatíveis com atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e anti-virulência, embora devam ser interpretadas como preditivas e não definitivas (Abdul-Hammed *et al.*, 2024).

De forma geral, as predições *in silico* alinham-se à modulação gênica observada em privação de ferro, onde genes de ferritinas (mycma_0076 e mycma_0077) são downregulados em Mabs, reduzindo armazenamento de ferro e ativando uptake via desregulação do regulador IdeR (Oliveira *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2023).

2.8 Escassez de adjuvantes quelantes específicos para *M. abscessus*

Apesar do interesse crescente em terapias anti-virulência, ainda há escassez de adjuvantes quelantes especificamente estudados para *M. abscessus* (Victoria *et al.*, 2021; Mori *et al.*, 2023), assim grande parte do conhecimento disponível deriva de outros patógenos ou de micobactérias relacionadas, o que evidencia uma lacuna de investigação translacional.

Nesse cenário, a DFO destaca-se por reunir atributos importantes, a base farmacológica conhecida, plausibilidade biológica relacionada ao ferro e evidências preliminares de antibiofilme em micobactérias de crescimento rápido (Wille, 2022; Mori *et al.*, 2023).

Adicionalmente, o potencial translacional da DFO está na possibilidade de compor regimes adjuvantes voltados à redução de ferro disponível, ao enfraquecimento de biofilme e à amplificação do efeito de antimicrobianos convencionais, como a amicacina (Victoria *et al.*, 2021; Wille, 2022). Em contextos de infecção por *M. abscessus*, isso pode significar menor carga bacteriana, maior chance de controle da doença e potencial redução de recaídas.

Além disso, o fato de a DFO já possuir uso clínico em outras indicações facilita, ao menos em tese, análises para estratégias como efeito adjuvante e aceleração translacional, embora ainda sejam necessários estudos farmacocinéticos, toxicológicos e *in vivo* específicos para a micobacteriose por *M. abscessus*. Assim, as investigações se inserem em uma agenda de inovação terapêutica baseada em alvos metabólicos, anti-virulência e otimização de combinações antimicrobianas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade biológica e antimicrobiana da desferrioxamina *in silico* e *in vitro* contra *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*.

3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o perfil de citotoxicidade e viabilidade celular da desferrioxamina (DFO), *in vitro*;
- b) Avaliar o potencial hemolítico da DFO em eritrócitos humanos, *in vitro*;
- c) Avaliar o efeito da DFO na produção de óxido nítrico (NO), *in vitro*;
- d) Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Bactericida Mínima (CBM) da DFO contra Mabs, *in vitro*;
- e) Avaliar o sinergismo *in vitro* da desferrioxamina com amicacina e claritromicina contra Mabs;
- f) Avaliar o sinergismo *in vitro* da desferrioxamina com amicacina e claritromicina contra Mabs;
- g) Avaliar a atividade antimicrobiana intracelular da DFO em macrófagos murinos RAW 264.7 infectados, *in vitro*;
- h) Avaliar o efeito da deferoxamina (DFO) na expressão gênica de citocinas, *in vitro*;
- i) Investigar biodisponibilidade oral, farmacocinética e toxicidade predita da desferrioxamina, *in silico*;
- j) Prever espectro de atividades biológicas da desferrioxamina, *in silico*;
- k) Caracterizar interações moleculares (*docking*) da desferrioxamina com alvos de Mabs.

4 METODOLOGIA

4.1 Microrganismo e Condições de Cultivo

Mycobacterium abscessus subsp. *massiliense* (BCCIPTSP Go01) foi utilizada em todas as análises *in vitro* e *in silico*. As culturas bacterianas foram mantidas em meio Middlebrook 7H9 suplementado com 10% OADC e 0,05% de Tween 80, incubadas a 37 °C sob condições aeróbias (Cao *et al.*, 2024; Kaur *et al.*, 2024).

A utilização do isolado clínico foi autorizada mediante assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido, conforme aprovado pelo CAAE: 21357413.4.0000.5084.

Foram utilizadas ferramentas de inteligência artificial sem interferência na interpretação dos dados ou conclusões. O conteúdo foi integralmente revisado, com total responsabilidade pela originalidade e integridade acadêmica, com prompts devidamente anotados (Apêndice A).

4.2 Seleção dos Compostos para Análises Computacionais

As estruturas químicas da desferrioxamina (DFO; CID: 2973), amicacina (AMK; CID: 377768) e claritromicina (CLA; CID: 84029) foram obtidas do banco de dados PubChem (National Center for Biotechnology Information). As estruturas foram utilizadas nas análises *in silico*.

4.3 Preparação do Inóculo Bacteriano

Uma colônia isolada de Mabs foi suspensa em PBS contendo 0,05% Tween 80 em tubos contendo esferas de vidro estéreis e homogeneizada por vórtex até completa dispersão. A turbidez foi ajustada visualmente à escala 0,5 de McFarland ($\sim 1 \times 10^8$ UFC/mL) e confirmada por leitura espectrofotométrica a 625 nm (absorbância = 0,105). Após repouso por 30 min, 50 µL da suspensão foram diluídos em 9,95 mL de caldo Mueller–Hinton, obtendo-se uma concentração final de 1×10^4 UFC/mL (Moraes-Neto *et al.*, 2022).

4.4 Ensaio de Citotoxicidade e Viabilidade celular em Macrófagos murinos RAW 264.7

A citotoxicidade da DFO foi avaliada em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 utilizando o método do MTT [brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol- Δ il)-2,5-difeniltetrazólio]. As células (1×10^5 células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços, cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) e suplementadas com 10% de soro fetal bovino e tratadas com diferentes concentrações de DFO (12,5–400 μ M). A incubação foi realizada por 24 h a 37 °C em atmosfera de 5% CO₂, sem agitação. Como controle negativo, utilizou-se apenas o meio de cultura, enquanto o Triton X-100 (0,05%) serviu como controle positivo. A viabilidade celular foi quantificada por meio da leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm (Sousa *et al.*, 2010). Todos os experimentos foram realizados em triplicata técnica de cada uma das três réplicas biológicas independentes.

4.5 Determinação da Atividade Hemolítica

Eritrócitos humanos foram obtidos a partir de concentrados de hemácias provenientes de bolsas de sangue (preservadas em CPDA-1) cedidas pelo Hemocentro do Maranhão. O uso do material biológico foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Ceuma (Parecer N° 1.570.437). As hemácias foram lavadas três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4) por centrifugação (2000 rpm, 10 min, 4 °C) antes de serem ressuspensas para os ensaios de hemólise. As hemácias foram isoladas e incubadas com DFO (12,5–400 μ M) por 60 min a 37 °C. Foram utilizados como controles de 0% e 100% de lise o tampão PBS e o Triton X-100 (0,05%), respectivamente. A liberação de hemoglobina foi quantificada por leitura espectrofotométrica a 540nm.

A atividade hemolítica foi expressa em relação ao Triton X-100 e calculada usando a seguinte fórmula (1):

$$\% \text{ hemólise} = \frac{(As - Ab) \times 100}{Ac - Ab} \quad (1)$$

Onde Ab é a absorbância do controle (branco sem extrato), As é a absorbância na presença do extrato e Ac é a absorbância na presença de Triton X-100 (Moraes-Neto *et al.*, 2022).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata técnica de cada uma das três réplicas biológicas.

4.6 Quantificação da Produção de Óxido Nítrico (NO)

A produção de NO foi determinada pela quantificação de nitrito acumulado no sobrenadante das culturas através da reação de Griess. Macrófagos murinos RAW 264.7 foram infectados e ativados com lipopolissacarídeo LPS (1 µg/mL) e simultaneamente tratados com DFO (12,5–400 µM). Após o período de tratamento, alíquotas do sobrenadante foram incubadas com o reagente de Griess e a absorbância foi medida a 540nm. Para garantir que a redução nos níveis de NO não fosse decorrente de morte celular, a viabilidade dos macrófagos nestas condições foi confirmada pelo ensaio de Sulforrodamina B (SRB), que quantifica o conteúdo proteico celular total (Lee *et al.*, 2017).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata técnica de cada uma das três réplicas biológicas.

4.7 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo Mueller–Hinton (Himedia, Mumbai, India) em placas de 96 poços. Foram testadas concentrações seriadas de DFO (10–4,87 µg/mL), AMK (128–0,06 µg/mL) e CLA (32–0,015 µg/mL) considerando CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CBM (Concentração Bactericida Mínima), conforme Quadro 4.

Quadro 1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).

Etapa / Parâmetro	Descrição e Procedimento	Observações / Critérios de Leitura
Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	A CIM corresponde à menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano visível.	Detectada pela ausência de mudança de cor após adição de resazurina a 0,01% (azul → rosa com crescimento).
Leitura da CIM	Realizada após 5 dias de incubação, seguida de reação com resazurina 0,01% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e nova incubação de 24 h.	Interpretação visual conforme protocolo padronizado.
Determinação da	A CBM foi determinada por subcultivo das	Incubação por 5 dias a 37 °C; leitura

Concentração Bactericida Mínima (CBM)	alíquotas sem crescimento visível em ágar Middlebrook 7H11.	baseada no crescimento dos controles.
Critério de CBM	Menor concentração de DFO, AMK ou CLA que impediu o crescimento micobacteriano ($\geq 99,9\%$ de morte celular).	Equivale a redução $\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL; segue padrões CLSI/EUCAST.

Considerou-se a fórmulas de Cálculo de Morte Bacteriana (2):

$$\% \text{ morte} = \frac{\text{UFC}_{\text{inicial}} - \text{UFC}_{\text{final}}}{\text{UFC}_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (2)$$

Os dados foram expressos em log, conforme fórmula (3):

$$\text{Log}^{10} \text{redução} = \log_{10}(\text{UFC}_{\text{inicial}}) - \log_{10} \text{UFC}_{\text{final}} \quad (3)$$

Todos os experimentos foram realizados em triplicata técnica de cada uma das três réplicas biológicas.

4.8 Avaliação de Sinergismo (Método Checkerboard)

O potencial sinérgico entre desferrioxamina, amicacina e claritromicina contra *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* foi avaliado pelo método de microdiluição em caldo no formato checkerboard, conforme protocolos adaptados para micobactérias. A cepa foi cultivada em Middlebrook 7H9 suplementado com OADC e 0,05% de Tween 80, ajustada a $\sim 1 \times 10^5$ UFC/mL, e inoculada em placas de 96 poços contendo combinações seriadas dos antimicrobianos ($0,25 \times$ a $4 \times$ MIC). As placas foram incubadas a 37 °C por 3–5 dias, sendo o crescimento bacteriano avaliado por inspeção visual (Takei *et al.*, 2020). Todos os experimentos foram realizados em triplicata técnica de cada uma das três réplicas biológicas.

A concentração inibitória mínima (CIM) para cada combinação foi determinada como a menor concentração onde não se observava turvação visível. Para cada combinação testada, foi calculado o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI) (Takei *et al.*, 2020), conforme a fórmula (4):

$$\text{FICI} = \frac{A}{\text{MIC}_A} + \frac{B}{\text{MIC}_B} \quad (4)$$

Onde A é a concentração do composto A na combinação ($\mu\text{g/mL}$), MIC_A é MIC do composto A testado isoladamente ($\mu\text{g/mL}$), B é concentração do composto B na combinação ($\mu\text{g/mL}$) e MIC_B é MIC do composto B testado isoladamente ($\mu\text{g/mL}$).

A interpretação dos resultados foi baseada nos critérios presentes no Quadro 5.

Quadro 2. Critérios de Interpretação FICI.

Valor de FICI	Interpretação	Significado Clínico
$\leq 0,5$	Sinergismo	Efeito combinado > soma dos efeitos individuais
$0,5 < \text{FICI} \leq 1,0$	Efeito aditivo	Efeito combinado $\approx$ soma dos efeitos
$1,0 < \text{FICI} \leq 4,0$	Indiferença	Sem interação significativa
$> 4,0$	Antagonismo	Efeito combinado < esperado

Todos os ensaios foram realizados em triplicata independente, e os valores finais de FICI foram expressos como média dos experimentos.

4.9 Formação de Biofilme e Produção de Vesículas Extracelulares

A inibição da formação de biofilme por Mabs tratada com DFO, AMK ou CLA ($0,5\times$, $1\times$ e $2\times$ CIM) foi avaliada pelo método de cristal violeta em placas de 96 poços de fundo chato (poliestireno). As culturas foram mantidas em caldo Middlebrook 7H9 (Himedia, Mumbai, India) suplementado com OADC e sem a adição de Tween 80, a 37°C por 5–7 dias em condições estáticas para permitir a adesão bacteriana (Faboro; Daniel, 2024).

Após a incubação, o conteúdo planctônico foi removido e os poços foram lavados três vezes com $200\mu\text{L}$ de PBS (pH 7,4) para a eliminação de células não aderidas. O biofilme remanescente foi fixado com $200\mu\text{L}$ de metanol (grau analítico) por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram coradas com $200\mu\text{L}$ de cristal violeta a 0,1% por 15 minutos em temperatura ambiente. Após nova lavagem em água destilada para remover o excesso de corante, a biomassa foi solubilizada em $200\mu\text{L}$ de etanol a 95% por 30 minutos. A densidade óptica (DO) foi mensurada a 570nm em leitor de microplacas. Os experimentos foram realizados em três réplicas biológicas independentes ($n = 3$), com cada amostra testada em triplicata técnica.

As vesículas extracelulares (EVs) foram isoladas de culturas de Mabs tratadas em larga escala em meio Middlebrook 7H9 (Himedia, Mumbai, India). O sobrenadante livre de células

foi obtido por centrifugação seriada ($3.000\times g$ e $15.000\times g$). As EVs foram coletadas por ultracentrifugação a $100.000\times g$ por 2 h a 4°C , utilizando uma ultracentrífuga Optima L-90K e rotor de ângulo fixo Type 70 Ti (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Após lavagem em PBS, as EVs foram quantificadas pelo método do ácido bicinconínico (BCA) a 562 nm, com os resultados normalizados pelo número de unidades formadoras de colônias (UFC) da cultura original (Vermeire *et al.*, 2024). Os experimentos foram realizados em três experimentos biológicos independentes ($n = 3$), com análises realizadas em triplicata técnica para garantir a precisão dos dados.

4.10 Infecção e Sobrevivência Intracelular em Macrófagos murinos RAW 264.7

Macrófagos murinos RAW 264.7 foram infectados com Mabs em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 10:1, representando a proporção de 10 bactérias para cada célula hospedeira. Esta proporção foi selecionada para assegurar uma eficiência de infecção de aproximadamente 100% das células, minimizando a interferência de macrófagos não infectados no resultado final, ao mesmo tempo em que previne a morte celular precoce por sobrecarga bacteriana (Athman *et al.*, 2015; Takei *et al.*, 2020).

MOIs inferiores a 5:1 podem comprometer a homogeneidade da infecção, permitindo que macrófagos não infectados interfiram nos resultados experimentais. Por outro lado, MOIs superiores a 20:1 tendem a induzir morte celular precoce em razão da sobrecarga bacteriana, comprometendo a avaliação da resposta celular ao longo do tempo. Dessa forma, a escolha da MOI 10:1 representou um equilíbrio adequado entre eficiência de infecção e viabilidade celular.

Após eliminação das bactérias extracelulares com gentamicina $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ (por 1 hora), as células foram tratadas com DFO, AMK ou CLA nas concentrações de $0,5\times$, $1\times$ e $2\times$ CIM. A carga bacteriana intracelular foi avaliada nos tempos 0, 4, 8, 12 e 24 h após lise celular com uma solução de Triton X-100 a 0,1% em água destilada estéril para a liberação das micobactérias intracelulares. As células foram então lavadas duas vezes com $500\text{ }\mu\text{L}$ de PBS estéril para a eliminação de bactérias extracelulares residuais. Em seguida, adicionaram-se $200\text{ }\mu\text{L}$ de água destilada estéril para promover a lise celular por choque hipotônico, com incubação à temperatura ambiente por 10 minutos. O lisado obtido foi transferido para um tubo contendo $1,8\text{ mL}$ de caldo Mueller-Hinton e homogeneizado em vortex por 30 segundos, assegurando a liberação completa das bactérias intracelulares sem comprometer sua viabilidade.

A quantificação das bactérias liberadas foi realizada por plaqueamento em meio sólido. Foram preparadas diluições seriadas do lisado, variando de 10^{-1} a 10^{-8} em PBS estéril, e 100 μL de cada diluição foram inoculados na superfície de placas de ágar contendo meio Middlebrook 7H10 ou 7H11 suplementado com OADC. As placas foram incubadas a 37°C , sob atmosfera de 5% de CO_2 , por um período de três a cinco dias. Após a incubação, apenas as placas contendo entre 30 e 300 colônias foram consideradas para a contagem, permitindo uma quantificação estatisticamente confiável. O número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) foi determinado pela fórmula (5):

$$\text{UFC/mL} = (\text{número de colônias} \times \text{fator de diluição}) / \text{volume inoculado (mL)}$$

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{número de colônias} \times \text{fator de diluição}}{\text{volume inoculado (mL)}} \quad (5)$$

Os resultados foram expressos em $\log_{10}$ UFC/mL (Lanni *et al.*, 2022; Moraes-Neto *et al.*, 2022), conforme fórmula (6):

$$\text{Log}^{10}\text{redução} = \log_{10}(\text{UFC}_{t=0}) - \log_{10}\text{UFC}_{t=24h} \quad (6)$$

Todos os experimentos foram realizados em triplicata técnica de cada uma das três réplicas biológicas.

4.11 Análise da Expressão Gênica de Citocinas

Macrófagos RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) foram cultivados em RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% penicilina/estreptomicina, mantidos a 37°C e 5% CO_2 . As células foram infectadas com *Mycobacterium abscessus* (MOI 10:1) e tratadas por 24 h com desferrioxamina ($0,5\times$, $1\times$ e $2\times$ CIM: 4,875–19,5 $\mu\text{g/mL}$), amicacina (1 $\mu\text{g/mL}$) e claritromicina (0,007 $\mu\text{g/mL}$). A manutenção desta MOI é crítica para garantir que a modulação da expressão gênica reflita uma resposta celular homogênea ao patógeno [80]. O RNA total foi extraído com o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) e quantificado pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A pureza e integridade do RNA foram asseguradas por meio das razões de absorbância A_{260}/A_{280} e

A₂₆₀/A₂₃₀, considerando-se apenas amostras com valores entre 1,8 e 2,2 para normalização subsequente. Após a quantificação, o RNA foi tratado com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para eliminação de DNA genômico. A síntese de cDNA foi realizada com o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Livak; Schmittgen, 2001; Cheng *et al.*, 2020).

A reação de qPCR (Polimerase quantitativa em tempo real) foi conduzida usando SYBR Green PCR Master Mix no sistema QuantStudio 3 (Applied Biosystems), avaliando-se os genes: TNF- α (Fator de Necrose Tumoral alfa), IL-1 β (Interleucina-1 beta), IL-6 (Interleucina-6), IL-10 (Interleucina-10), IFN- γ (Interferon-gama) e TGF- β (Fator de Crescimento Transformador beta). As sequências dos iniciadores (*primers*) utilizados estão detalhadas no Quadro 3 (Sousa *et al.*, 2010).

Quadro 3. Sequências de primers utilizados.

Gene	Direção	Sequência (5' → 3')	Comprimento (pb)
TNF- α	Forward	GCCCAGGCAGTCAGATCATC	20
TNF- α	Reverse	CGCCACCATGAGCACTGAAAG	21
IL-1 β	Forward	CTGAGGTGCTGATGTACCAG	20
IL-1 β	Reverse	TAGATAGGCAGACAGCACGA	20
IL-6	Forward	TGACAAAGCCAGAGTCCTTC	20
IL-6	Reverse	CTACATTTGCCGAAGAGCCCC	21
IL-10	Forward	GGGAAGCTGAGAACCAAGAC	20
IL-10	Reverse	CAGTGAGGCGTACAGCCGTAG	21
IFN- γ	Forward	TGAATGACTGGAGTGCCAAG	20
IFN- γ	Reverse	CGACAGCAGCGACTCCTTTT	20
TGF- β	Forward	ACCCTGGATACCAACTATTG	20
TGF- β	Reverse	CGGGACTGATCCTAGTGTATT	21
β -actina	Forward	TGACAGGATGCAGAAGGAGA	20
β -actina	Reverse	TGCTGATCCACATCTGCTGGA	21

A eficiência de amplificação para todos os *primers* foi determinada por curvas de calibração, situando-se entre 95% e 105%.

O gene β -actina foi selecionado como gene de referência por se tratar de um gene constitutivo, cuja expressão ocorre em níveis estáveis e consistentes entre diferentes condições experimentais. Essa característica garante sua adequação para a normalização da expressão de genes-alvo em análises de RT-qPCR. Além disso, a β -actina apresenta baixa variação de expressão frente a estímulos ou tratamentos, minimizando interferências nos resultados relativos de quantificação. Trata-se de um padrão amplamente reconhecido na literatura científica internacional, sendo frequentemente utilizado em estudos de expressão gênica. A

validação prévia dos primers empregados confirmou a integridade do material genético e a especificidade da amplificação, assegurando a confiabilidade dos dados obtidos.

A expressão gênica relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, conforme o protocolo de cálculo descrito no Quadro 7. Para este cálculo, o grupo de macrófagos infectados e não tratados foi utilizado como calibrador (unidade de referência = 1,0), permitindo a quantificação do impacto da DFO, AMK e CLA sobre a modulação gênica (Livak; Schmittgen, 2001; Cheng *et al.*, 2020).

Quadro 4. Passo a Passo para o cálculo da expressão relativa – Método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Passo a passo	Descrição / Fórmula	Exemplo
1. Determinação do Ct (Cycle Threshold)	Ct: ciclo em que a fluorescência ultrapassa o limite de detecção; Registro automático pelo equipamento de qPCR em tempo real.	—
2. Cálculo de ΔCt para cada amostra	$\Delta Ct = Ct \text{ (gene alvo)} - CT \text{ (gene de referência)}$	Ct TNF- α = 22,5 Ct β -actina = 18,0 $\Delta Ct = 22,5 - 18,0 = 4,5$
3. Cálculo de $\Delta\Delta Ct$ (Comparativo entre amostras)	$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (amostra tratada)} - \Delta Ct \text{ (amostra não tratada)}$	$\Delta Ct \text{ TNF-}\alpha \text{ (infectado + DFO)} = 24,2$; $\Delta Ct \text{ TNF-}\alpha \text{ (infectado sem tratamento)} = 22,5$ $\rightarrow \Delta\Delta Ct = 1,7$
4. Cálculo da Expressão Relativa	$\text{Expressão Relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$	Expressão Relativa = $2^{-1,7} = 0,31$
5. Interpretação dos resultados	Valor = 1,00 $\rightarrow$ Sem alteração (igual ao controle) Valor < 1,00 $\rightarrow$ Downregulation (redução) Valor > 1,00 $\rightarrow$ Upregulation (aumento)	Em proporção, $1 - 0,31 =$ redução de 69% em relação ao controle.

As diferenças entre grupos foram analisadas por ANOVA seguida de pós-teste de Tukey, considerando $p < 0,05$ como significativo (*) e $p < 0,01$ como altamente significativo (**).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata técnica de cada uma das três réplicas biológicas (n=3).

4.12 Docking Molecular

O potencial de interação entre desferrioxamina, amicacina e claritromicina com a proteína Eis2 de *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* foi avaliado por estudos de docking molecular (Quadro 3). As estruturas químicas dos ligantes foram obtidas no PubChem (CID: 2973, 37768 e 84029, respectivamente) e preparadas no Open Babel, com otimização conformacional em 3D pelo campo de força MMFF94 (Merck Molecular Force Field) e

conversão para o formato PDBQT (Protein Data Bank, Charges, Torsions) (O'Boyle *et al.*, 2011).

Quadro 5. Alvos moleculares de *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* utilizados para docking com a DFO.

Alvo potencial	Proteína	Família	Modo de ação
Metabolismo lipídico	Enoil-CoA hidratase/isomerase	Hidratase tipo MaoC	Prejuízo à β -oxidação de intermediários derivados do colesterol
Metabolismo energético	Fumarase (Fumarato hidratase)	Líase	Interrupção do ciclo do ácido cítrico por competição com o substrato (malato)
Sobrevivência intracelular / Resistência	Proteína Eis2	N-acetiltransferase (família GNAT)	Bloqueio da acetilação de aminoglicosídeos e dos mecanismos de resistência
Metabolismo energético	Subunidade ϵ da F-ATP sintase (Mab ϵ)	ATP sintase (subunidade ϵ)	Inibição conformacional do acoplamento rotacional, afetando a síntese de ATP
Metabolismo energético	Fumarase (Fumarato hidratase)	Líase	Interrupção do ciclo do ácido cítrico por competição com o substrato (malato)

A estrutura cristalográfica da proteína Eis2 complexada com Acetil-CoA (PDB ID: 6RFT) foi obtida no PDB. O *docking* foi realizado com o AutoDock Vina, utilizando uma grid box centrada no sítio ativo identificado pelo PrankWeb (coordenadas $x = 29.5$, $y = 7.2$, $z = 59.7$).

A afinidade ligante-receptor foi estimada pela variação da energia livre de Gibbs (ΔG), sendo valores mais negativos interpretados como interações mais favoráveis e estáveis (Trott; Olson, 2010; O'Boyle *et al.*, 2011).

As interações moleculares foram analisadas no BIOVIA Discovery Studio Visualizer 4.2, com identificação dos principais resíduos envolvidos e caracterização dos tipos de ligação (hidrogênio e interações hidrofóbicas) (Trott; Olson, 2010; O'Boyle *et al.*, 2011; Dassault Systèmes, 2015).

4.13 Análise ADME e Predição de Propriedades Toxicológicas (*in silico*)

As propriedades farmacocinéticas como absorção, distribuição, metabolismo e excreção foram avaliados utilizando o servidor SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php#>) (Daina; Michielin; Zoete, 2017). Foram analisados descritores moleculares como massa molecular, número de aceitadores e doadores de ligações de hidrogênio, lipofilicidade, refratividade molar, número de ligações rotativas e área de

superfície polar topológica, aplicando-se a Regra dos Cinco de Lipinski para estimativa de semelhança com fármacos (Quadro 1) (Chen *et al.*, 2020).

Quadro 6. Critérios de Lipinski para Semelhança com Fármacos.

Descritor	Critério	Violações Aceitáveis
Peso Molecular (MW)	≤ 500 Da	≤ 1
LogP (Lipofilicidade)	≤ 5	≤ 1
Doadores de H (HBD)	≤ 5	≤ 1
Aceitadores de H (HBA)	≤ 10	≤ 1
Ligações Rotativas (nRB)	≤ 10	Sem limite
Área de Superfície Polar (TPSA)	20-130 Å ²	Sem limite

Nota: Moléculas que violam mais de um critério podem ter biodisponibilidade oral reduzida. Análogos de fármacos podem apresentar até 2 violações; LogP: Medida de lipofilicidade; LogP > 5 indica potencial acúmulo em tecidos lipídicos; HBA/HBD: Alto número pode comprometer permeabilidade intestinal; nRB: Número de ligações rotativas; > 10 indica alta flexibilidade conformacional; TPSA: Área de superfície polar; valores < 20 Å² indicam baixa permeabilidade celular; > 130 Å² indicam dificuldade de permeação.

A toxicidade foi predita por meio dos servidores admetSAR (<https://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2>) e ProTox-II (https://tox.charite.de/protox3-/?site=compound_input), utilizando modelos de similaridade molecular e aprendizado de máquina para prever DL₅₀ oral, hepatotoxicidade, carcinogenicidade, citotoxicidade, imunotoxicidade e mutagenicidade (Quadro 2) (Banerjee *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2019).

Quadro 7. Classificação de DL por Classe de Toxicidade (ProTox-II).

Classe	DL ₅₀ (mg/kg)	Categoria	Classificação GHS
I	≤ 5	Fatal por ingestão	Classe 1
II	5-50	Tóxico	Classe 2
III	50-300	Tóxico	Classe 3
IV	300-2000	Prejudicial	Classe 4
V	2000-5000	Praticamente não tóxico	Classe 5
VI	> 5000	Não tóxico	Classe 6

Nota: Valores de DL₅₀ são preditos por modelagem de similaridade molecular e devem ser validados

4.14 Predição de Atividades Biológicas (*in silico*)

As atividades biológicas foram avaliadas utilizando a plataforma PASS Online (Prediction of Activity Spectra for Substances), disponível em: (www.way2drug.com/passonline).

As estruturas químicas em formato SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) foram obtidas do PubChem. Atividades com probabilidade de atividade (P_a) superior à probabilidade de inatividade (P_i) foram consideradas relevantes. Para interpretação dos resultados obtidos pelo software, considerou-se o composto de maior atividade aquele com maior valor de P_a e menor valor de P_i . Estes resultados foram interpretados com base nos critérios: (1) apenas foram consideradas possíveis atividades cujo valor de P_a é maior que o valor de P_i ; (2) Se o valor de P_a for maior que 0,7 a chance de encontrar a atividade experimental é alta; (3) Se o valor de P_a estiver entre 0,5 e 0,7 a chance de encontrar esta atividade experimentalmente é intermediária; (4) se o valor de P_a for menor que 0,5 a chance de encontrar atividade experimental desta molécula é baixa. Atividades com probabilidade de atividade (P_a) superior à probabilidade de inatividade (P_i) foram consideradas relevantes. Genes candidatos à downregulation foram selecionados quando $P_a > 0,5$ (Filimonov *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2021; Moraes-Neto *et al.*, 2022).

4.15 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) de três experimentos biológicos independentes ($n = 3$), cada um realizado em triplicata técnica para assegurar a reprodutibilidade dos dados. A significância estatística das diferenças entre os grupos experimentais foi avaliada por meio da análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias (one-way ou two-way ANOVA), conforme a natureza das variáveis, seguida pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações. Valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****) foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas e a elaboração das representações gráficas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Capítulo I - Bibliometric Review on New Possibilities of Antimycobacterial Agents: Exploring Siderophore Desferrioxamine's Applications as an Antimicrobial Agent

Periódico: Pharmaceuticals

Classificação Qualis – Periódico: A1

Área: Medicina I

Fator de Impacto: 4.3

ISSN: 1424-8247



pharmaceuticals

an Open Access Journal by MDPI



Bibliometric Review on New Possibilities of Antimycobacterial Agents: Exploring Siderophore Desferrioxamine's Applications as an Antimicrobial Agent

Patrícia Vieira de Oliveira; Roseane Lustosa de Santana Lira; Rafael de Abreu Lima; Yasmim Costa Mendes; Antenor Bezerra Martins; Bruna de Oliveira de Melo; Millena Ferreira Goiano; Rivaldo Lira Filho; Flávia Baluz Bezerra de Farias Nunes; Amanda Silva dos Santos Aliança; Wellyson da Cunha Araújo Firmo; Rafael Cardoso Carvalho; Adrielle Zagnignan; Eduardo Martins de Sousa

Pharmaceuticals 2023, Volume 16, Issue 9, 1335



Review

Bibliometric Review on New Possibilities of Antimycobacterial Agents: Exploring Siderophore Desferrioxamine's Applications as an Antimicrobial Agent

Patrícia Vieira de Oliveira ¹, Roseane Lustosa de Santana Lira ², Rafael de Abreu Lima ², Yasmim Costa Mendes ¹, Antenor Bezerra Martins ³, Bruna de Oliveira de Melo ⁴, Millena Ferreira Goiano ⁵, Rivaldo Lira Filho ⁶, Flávia Baluz Bezerra de Farias Nunes ⁷, Amanda Silva dos Santos Aliança ^{1,3}, Wellyson da Cunha Araújo Firmo ^{1,3}, Rafael Cardoso Carvalho ², Adrielle Zagminan ^{1,3} and Eduardo Martins de Sousa ^{1,2,3,4,*}

- ¹ Graduate Program in Microbial Biology, CEUMA University—UNICEUMA, São Luís 65075-120, Brazil; patricia001444@ceuma.com.br (P.V.d.O.); yasmim001407@ceuma.com.br (Y.C.M.); amanda.alianca@ceuma.com.br (A.S.d.S.A.); wellyson004830@ceuma.com.br (W.d.C.A.F.); adrielle004602@ceuma.com.br (A.Z.)
- ² Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Maranhão—UFMA, São Luís 65080-805, Brazil; roseane.lustosa@discente.ufma.br (R.L.d.S.L.); rafael.al@ufma.br (R.d.A.L.); carvalho.rafael@ufma.br (R.C.C.)
- ³ Graduate Program in Health and Services Management, CEUMA University—UNICEUMA, São Luís 65075-120, Brazil; antenor_oficial@hotmail.com
- ⁴ Graduate Program in Biodiversity and Biotechnology—BIONORTE Amazonian Network, Federal University of Maranhão—UFMA, São Luís 65080-805, Brazil; brunaoliv.96@gmail.com
- ⁵ Graduate Program in Biomedicine, CEUMA University—UNICEUMA, São Luís 65075-120, Brazil; mgoiano130@gmail.com
- ⁶ Graduate Program in Nursing, St. Therese College—CEST, São Luís 65045-180, Brazil; rivaldolirafilho@gmail.com
- ⁷ Graduate Program in Nursing, Federal University of Maranhão—UFMA, São Luís 65080-805, Brazil; flavia.farias@ufma.br
- * Correspondence: eduardo.martins@ceuma.br



Citation: Oliveira, P.V.d.; Lira, R.L.d.S.; Lima, R.d.A.; Mendes, Y.C.; Martins, A.B.; de Melo, B.d.O.; Goiano, M.F.; Filho, R.L.; Nunes, F.B.B.d.F.; Aliança, A.S.d.S.; et al. Bibliometric Review on New Possibilities of Antimycobacterial Agents: Exploring Siderophore Desferrioxamine's Applications as an Antimicrobial Agent. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 1335. <https://doi.org/10.3390/ph16091335>

Academic Editor: Luis Constantino

Received: 1 August 2023

Revised: 7 September 2023

Accepted: 16 September 2023

Published: 21 September 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Mycobacteria cause tuberculosis and other serious diseases. Understanding their mechanisms of resistance to our immune system and exploring novel drugs are critical strategies to combat infections. A bibliometric analysis was performed to identify publication trends and critical research areas in the field of the antimicrobial activity of desferrioxamine. A total of twenty-four publications on the topic, from 2012 to 2023, were retrieved from databases including Web of Science, Scopus, PubMed, and Embase, using specific keywords. The quality of the publications was assessed using impact and productivity metrics, with an average annual publication rate of 2.1 articles. The United States emerged as the most productive country, with medicine (23.4%, 11 publications) and biochemistry, genetics, and molecular biology (21.3%, 10 publications) as the top research fields. The five most cited publications accounted for 672 citations, with a relatively low h-index (11:11). In conclusion, there has been a lack of publications on this topic in the last decade. The United States dominates production and publication in this area, and there appears to be limited exchange of knowledge, ideas, and technology within the field. Therefore, fostering international cooperation through funding is essential to facilitate further research and development of desferrioxamine-related studies.

Keywords: siderophore; desferrioxamine; anti-infective agents; *Mycobacterium*

1. Introduction

Bacteria of the genus *Mycobacterium* are responsible for various diseases affecting the respiratory system and other organs in humans and animals and include more than 200 species [1]. These microorganisms can be found mainly in soil and water, but most do not cause infection or disease and are considered apathogenic [2]. Among the pathogenic bacteria, we have two groups. One is the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC),

formed by *M. tuberculosis* (Mtb) along with seven other similar mycobacteria: *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. canetti*, and *M. mungie* [3], which are pathogens capable of causing tuberculosis (TB), one of the main causes of death from infectious diseases in the world, surpassed only by COVID-19 [4].

Other mycobacterial infections are caused by non-tuberculous mycobacteria (NTM), which include species of the *Mycobacterium abscessus* complex (MABSC), characterized as rapidly growing mycobacteria [3]. This complex includes related species: *M. abscessus*, *M. massiliense*, and *M. bolletii* [5]. These bacteria can cause chronic pulmonary disease, post-traumatic wound infection, and disseminated cutaneous disease, mainly in immunocompromised patients, and are very common among patients with cystic fibrosis, according to clinical data [2].

The currently recommended treatment for TB patients is a six-month regimen of four first-line drugs: isoniazid, rifampicin, ethambutol, and pyrazinamide. The success rate of treatment is at least 85% [6]. The species possess intrinsic and acquired resistance mechanisms, making them some of the most problematic microorganisms to treat, with therapy often extending over months or even years, with the risk of antibiotic toxicity and a high rate of treatment failure [2]. The antimicrobial resistance of these mycobacteria is related to their composition and lipophilic structure, as mycobacteria have a cell wall that confers intrinsic resistance to several antibiotics. This lipophilic property creates a physical barrier that prevents proper diffusion of antibacterial drugs through the cell wall, thereby reducing the efficacy of antibiotics against these mycobacteria [6].

Drug-resistant TB represents a serious threat to global public health, hindering TB case control worldwide. Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) is defined as a clinical form resistant to rifampicin and isoniazid, while extensively resistant tuberculosis (XDR-TB), in addition to resistance to rifampicin and isoniazid, also exhibits resistance to fluoroquinolone and a second-line injectable drug such as amikacin, capreomycin, or kanamycin [7].

The search for compounds with novel mechanisms of action and physicochemical properties that enhance intracellular accumulation or act synergistically with other antimycobacterial drugs may represent a strategy to reduce and prevent further drug resistance [8]. Consequently, recent research has explored non-antibiotic antimicrobial agents as an alternative to current drugs [9]. In this context, metallophores and siderophores can be reported. Metallophores are secondary metabolites secreted by bacteria that play an important role in their virulence [10]. They are low-molecular-weight molecules produced under the conditions of scarce availability of essential transition metal ions such as iron. To support this iron deficiency, bacteria have developed various mechanisms for obtaining iron from the host since it is important for their colonization during infection. These mechanisms include the acquisition of heme-bound iron, absorption by membrane-bound uptake systems, and secretion of siderophores [11].

Siderophores, high-affinity iron metallophores, are essential pathogenicity factors in bacteria. There are four distinct types of siderophores: catecholate, phenolate, hydroxamate, and carboxylate, classified according to their iron-chelating portions. Siderophores are a type of chelating agent that can sequester iron and prevent its absorption by pathogenic microorganisms [12].

One alternative is host-directed therapies (HDTs), such as the use of the iron chelator subtype desferrioxamine (DFO) B, as studies have shown that it can be used as an adjuvant therapy with the combination of antimicrobials [13,14]. DFO is a drug that binds iron and aluminum and is produced by removing the trivalent iron portion of ferrioxamine B, an iron-containing sideramine produced by the actinomycete *Streptomyces pilosus*. This chelating agent is known for its high binding affinity for trivalent iron and lower affinity for other metals [15]. HDTs, combined with antimicrobial agents, may favor more effective elimination of bacteria, thus reducing treatment time, which may improve adherence, preventing the emergence of these rapidly growing drug-resistant mycobacteria and reducing the adverse effects caused by prolonged use of antimicrobials [14].

Given the above, we propose a bibliometric study, as such investigations are fundamental for assessing the flow of science and information and determining the state of the art or knowledge [16]. Bibliometric indicators have become essential as they provide crucial information on the number of authors, studies, countries, scientific connections, journals, and impact factors of existing publications within each product category. We acknowledge that studies correlating the antimicrobial activity of desferrioxamine remain scarce, with many gaps to be filled. Therefore, this bibliometric review is necessary to assess the quantity and quality of indexed publications on the antimicrobial and biological activities of desferrioxamine.

2. Results

Forty-one studies were obtained from searches in the Scopus, Web of Science (WOS), CINAHL, EMBASE, WHO, and Pubmed/Medline databases. After the studies were refined based on a temporal filter (2012 to June of 2023), document type (articles), and language (English), a total of twenty-four studies remained. All articles included in the research were then subjected to bibliometric data analysis.

2.1. Articles on Desferrioxamine and Predictors of Siderophores and Antimicrobial Agents: Year, Authors, Title, and Journal

The main data from the 24 publications are presented in Table 1. As shown, the yearly publication count was limited. Nevertheless, the number of publications experienced growth in 2022 (N = 6, representing 25% of the total), indicating an increasing interest among researchers in investing more in this field in recent years.

Table 1. Publications on the antimicrobial activity of desferrioxamine, from 2012 to June of 2023.

Year	Authors	Title	Journal
2023 [17]	Dvoretckaia, A., Egorova, T., Dzhuza, A., (...), Demyanova, E., Korzhikova-Vlakh, E.	Polymyxin B Conjugates with Bio-Inspired Synthetic Polymers of Different Nature	<i>International Journal of Molecular Sciences</i>
2022 [18]	Shepherdson, E.M.F., Elliot, M.A.	Cryptic specialized metabolites drive <i>Streptomyces</i> exploration and provide a competitive advantage during growth with other microbes	<i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</i>
2022 [19]	Du, G.-F., Dong, Y., Fan, X., (...), Le, Y.-J., Yang, X.-Y.	Proteomic Investigation of the Antibacterial Mechanism of Cefiderocol against <i>Escherichia coli</i>	<i>Microbiology Spectrum</i>
2022 [20]	Pita-Grisanti, V., Chasser, K., Sobol, T., Cruz-Monserrate, Z.	Understanding the Potential and Risk of Bacterial Siderophores in Cancer	<i>Frontiers in Oncology</i>
2022 [21]	Naclerio, G.A., Onyedibe, K.I., Karanja, C.W., Aryal, U.K., Sintim, H.O.	Comparative Studies to Uncover Mechanisms of Action of N-(1,3,4-Oxadiazol-2-yl) benzamide Containing Antibacterial Agents	<i>ACS Infectious Diseases</i>
2022 [22]	Baranova, M.N., Kudzhaev, A.M., Mokrushina, Y.A., (...), Smirnov, I.V., Terekhov, S.S.	Deep Functional Profiling of Wild Animal Microbiomes Reveals Probiotic <i>Bacillus pumilus</i> Strains with a Common Biosynthetic Fingerprint	<i>International Journal of Molecular Sciences</i>
2022 [23]	Deflandre, B., Stulanovic, N., Planckaert, S., (...), Devreese, B., Rigali, S.	The virulome of <i>Streptomyces scabiei</i> in response to cello-oligosaccharide elicitors	<i>Microbial Genomics</i>
2021 [24]	Chan, D.C.K., Burrows, L.L.	Thiocillin and micrococin exploit the ferrioxamine receptor of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> for uptake	<i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy</i>

Table 1. Cont.

Year	Authors	Title	Journal
2020 [25]	Dávila Costa, J.S., Hoskisson, P.A., Paterlini, P., Romero, C.M., Alvarez, A.	Whole genome sequence of the multi-resistant plant growth-promoting bacteria <i>Streptomyces</i> sp. Z38 with potential application in agroindustry and bio-nanotechnology	Genomics
2020 [26]	Phelan, J.J., McQuaid, K., Kenny, C., (...), O'Sullivan, M.J., Keane, J.	Desferrioxamine Supports Metabolic Function in Primary Human Macrophages Infected with <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Frontiers in Immunology
2020 [27]	Kidd, J.M., Abdelraouf, K., Nicolau, D.P.	Development of neutropenic murine models of iron overload and depletion to study the efficacy of siderophore-antibiotic conjugates	Antimicrobial Agents and Chemotherapy
2019 [28]	Saha, P., Xiao, X., Yeoh, B.S., (...), Kirimanjeswara, G.S., Vijay-Kumar, M.	The bacterial siderophore enterobactin confers survival advantage to <i>Salmonella</i> in macrophages	Gut Microbes
2017 [29]	Rana, N., Jesse, H.E., Tinajero-Trejo, M., (...), Schatzschneider, U., Poole, R.K.	A manganese photosensitive tricarbonyl molecule [Mn(CO) ₃ (tpa-κ ³ N)]Br enhances antibiotic efficacy in a multi-drug-resistant <i>Escherichia coli</i>	Microbiology (United Kingdom)
2017 [30]	Huayhuaz, J.A.A., Vitorino, H.A., Campos, O.S., (...), Kaneko, T.M., Espósito, B.P.	Desferrioxamine and desferrioxamine-caffeine as carriers of aluminum and gallium to microbes via the Trojan Horse Effect	Journal of Trace Elements in Medicine and Biology
2017 [31]	Thyagarajan, S.L., Ramanathan, G., Singaravelu, S., (...), Perumal, P.T., Sivagnanam, U.T.	Microbial Siderophore as MMP inhibitor: An interactive approach on wound healing application	Wound Medicine
2016 [32]	Pupin, M., Esmael, Q., Flissi, A., (...), Jacques, P., Leclère, V.	Norine: A powerful resource for novel nonribosomal peptide discovery	Synthetic and Systems Biotechnology
2015 [33]	Kishimoto, S., Nishimura, S., Hatano, M., Igarashi, M., Kakeya, H.	Total Synthesis and Antimicrobial Activity of Chlorocatechelin A	Journal of Organic Chemistry
2015 [34]	Jayasinghe, S., Siriwardhana, A., Karunaratne, V.	Natural iron sequestering agents: Their roles in nature and therapeutic potential	International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences
2014 [35]	Frangipani, E., Bonchi, C., Minandri, F., Imperi, F., Visca, P.	Pyochelin potentiates the inhibitory activity of gallium on <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Antimicrobial Agents and Chemotherapy
2014 [36]	Górska, A., Sloderbach, A., Marszałł, M.P.	Siderophore-drug complexes: Potential medicinal applications of the 'Trojan horse' strategy	Trends in Pharmacological Sciences
2014 [37]	Farkas, E., Szabó, O., Parajdi-Losonczy, P.L., Balla, G., Pócsi, I.	Mn(II)/Mn(III) and Fe(III) binding capability of two <i>Aspergillus fumigatus</i> siderophores, desferrirocic and N', N'', N'''-triacylfusarinine C	Journal of Inorganic Biochemistry
2013 [38]	Fukushima, T., Allred, B.E., Sia, A.K., (...), Andersen, U.N., Raymond, K.N.	Gram-positive siderophore-shuttle with iron-exchange from Fe-siderophore to apo-siderophore by <i>Bacillus cereus</i> YxeB	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
2013 [39]	Traxler, M.F., Watrous, J.D., Alexandrov, T., Dorrestein, P.C., Kolter, R.	Interspecies interactions stimulate diversification of the <i>Streptomyces coelicolor</i> secreted metabolome	mBio
2012 [40]	Weiss, G., Fritsche, G., Nairz, M., Libby, S.J., Fang, F.C.	Slc11a1 (Nramp1) impairs growth of <i>Salmonella enterica</i> serovar typhimurium in macrophages via stimulation of lipocalin-2 expression	Journal of Leukocyte Biology

2.2. Analysis of the Annual Number of Publications, Main Journals, and Regions/Countries

Figure 1a displays the number of publications on the antimicrobial activity of desferrioxamine over the years, revealing a low count in most years, with an absence in 2018 and a peak in 2022. The average number of articles published in journals during the studied period is 2.1 publications per year. The publications retrieved in this study were distributed among 21 journals, and the journals displaying greater interest in the subject are depicted in Figure 1b.

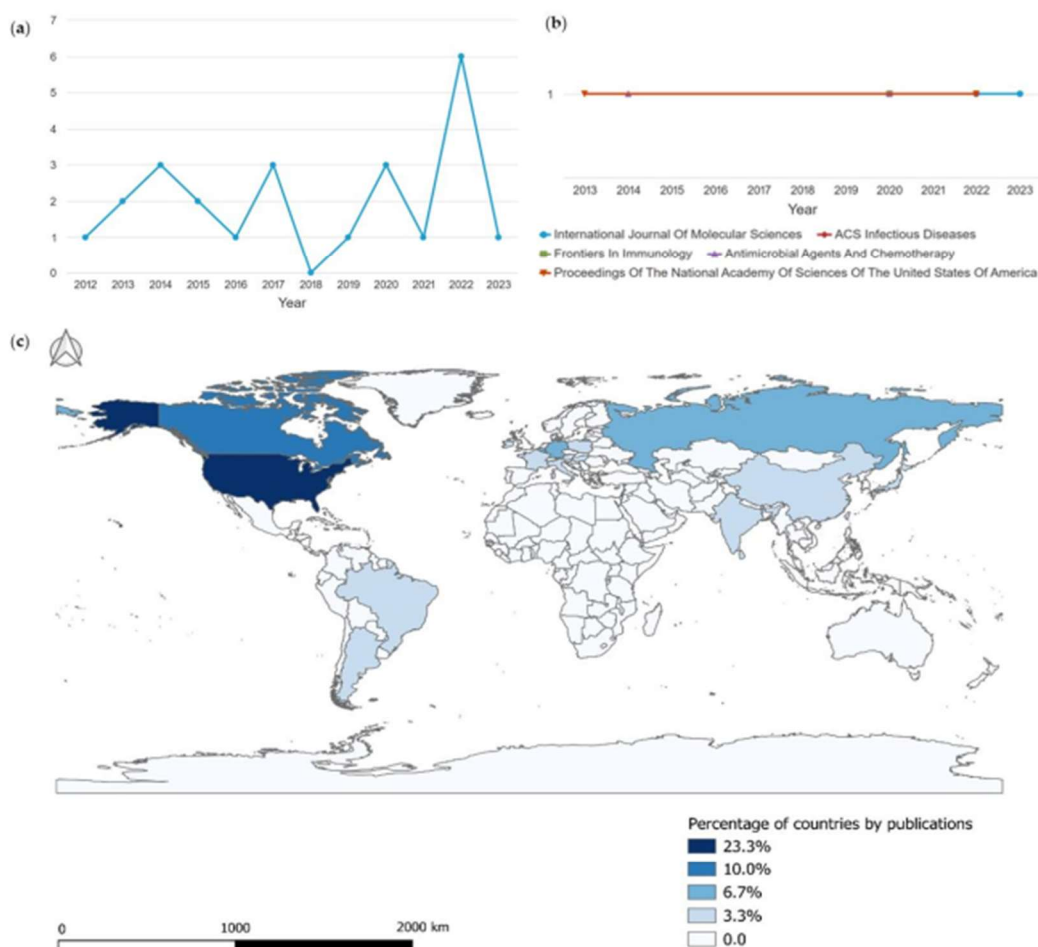


Figure 1. (a) Number of annual publications. (b) Most productive journals. (c) Countries/regions with the highest publication output on the antimicrobial activity of desferrioxamine from 2012 to June of 2023.

Regarding the regions/countries of the 24 publications included in the review, the majority originated from the United States, accounting for 23.4% (seven publications), followed by Canada with 10% (three publications). Belgium, Germany, Russia, and the United Kingdom contributed 6.7% each (two publications each), while countries such as Argentina, Austria, Brazil, and China each presented one publication, representing 3.3% each, as demonstrated in Figure 1c.

2.3. Analysis of the Main Funding and Affiliated Institutions

A total of 34 funding agencies were active in the area, and the top 10 funding agencies for research in this area were identified. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases funded the largest number of research projects, as shown in Figure 2a. A total of

72 institutions contributed to the topic based on their region/country of origin, as shown in Figure 2b. Most of these affiliations (23.6%) were from the United States, followed by the Russian Federation (13.8%), France (11.1%), and China and Hungary (5.5% each, with four affiliations each). The United Kingdom, Belgium, and Argentina each had 4.2% (three members each), while Italy, Sri Lanka, Ireland, Germany, and Japan each had 2.8% (two members each). Finally, Brazil, Poland, and Austria had only one affiliation each, representing 1.4%.

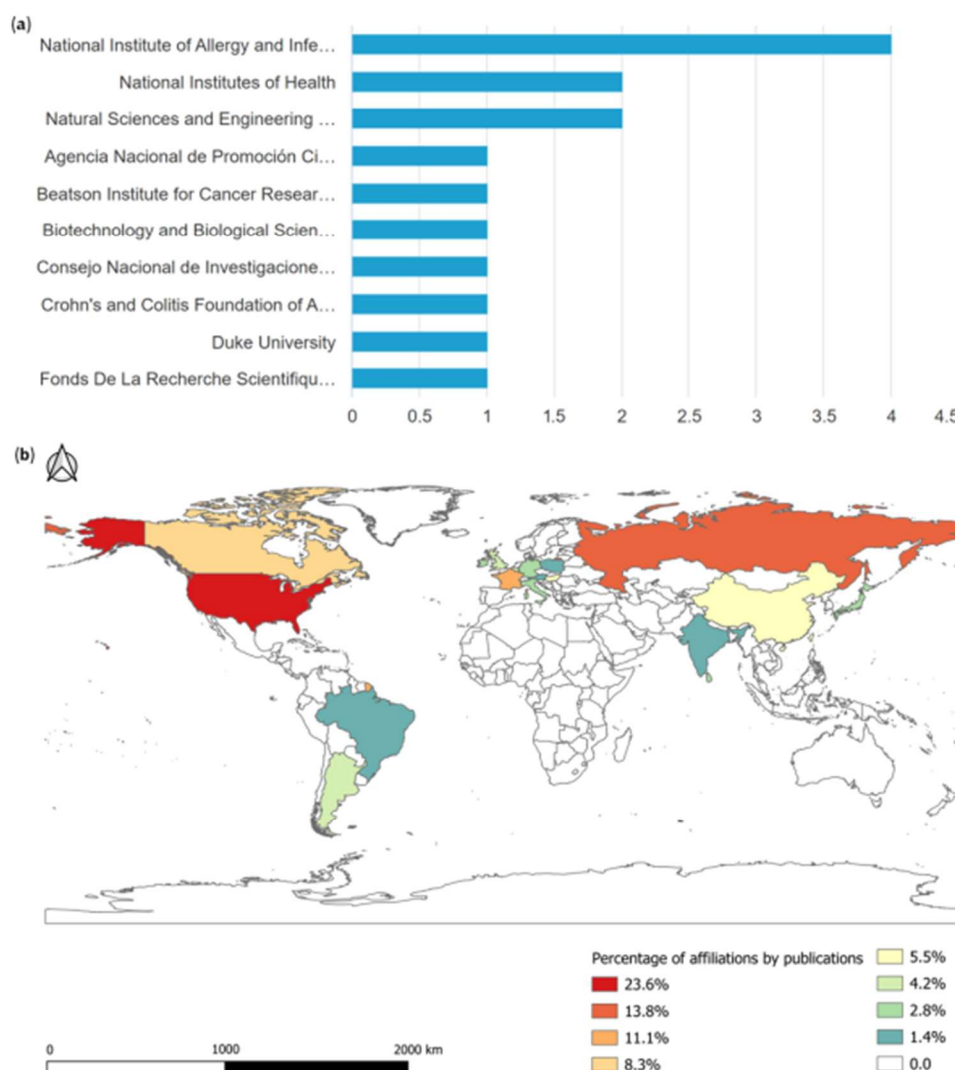


Figure 2. Publications by funding institutions (a) and affiliated institutions (b) conducting research on the antimicrobial activity of desferrioxamine from 2012 to June of 2023.

2.4. Analysis of Document Types and the Most Prolific Areas of Publication

Regarding document types, Figure 3a reveals the identification of 4 reviews and 20 original articles. Notably, the prominent areas of publication include medicine (23.4%, 11 publications), biochemistry, genetics, and molecular biology (21.3%, 10 publications), immunology and microbiology (17.0%, 8 publications), chemistry and pharmacy, pharmacology, and toxicology (10.6%, 5 publications each), as shown in Figure 3b.

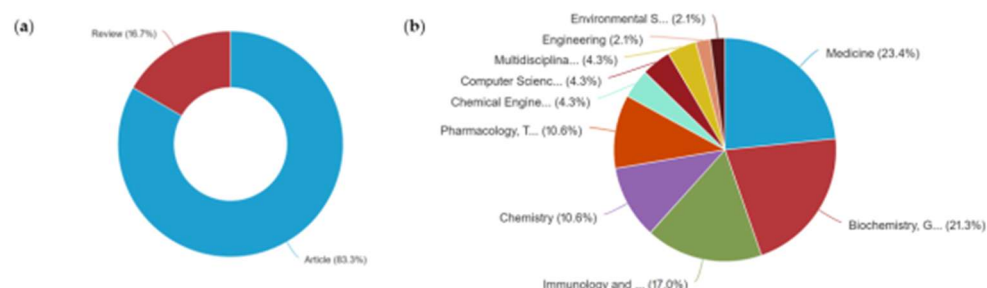


Figure 3. Publications by document type (a) and publication by area (b) on the antimicrobial activity of desferrioxamine, from 2012 to June of 2023.

2.5. Analysis of Citations and Index Analysis

Table 2 displays the number of citations per year for each publication, and the cumulative citations of the top 10 publications from 2012 to 2023 amounted to 672 citations. Additionally, we highlight the five most cited journals along with their respective indicators: *MBio* (244 citations, CiteScore 10.8/SjR 2.283/SNIP 1.357), *Trends in Pharmacological Sciences* (114 citations, CiteScore 23.3/SjR 2.964/SNIP 2.373), *Journal of Leukocyte Biology* (55 citations, CiteScore 11.0/SjR 1.622/SNIP 1.219), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* (45 citations, CiteScore 19.2/SjR 4.026/SNIP 2.765), and *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (43 citations, CiteScore 10/SjR 1.415/SNIP 1.175).

Table 2. Citations of the top 10 publications on the antimicrobial activity of desferrioxamine, from 2012 to June of 2023.

Article Title	Journal	Citations						Total
		<2019	2019	2020	2021	2022	2023	
		306	60	71	102	85	48	
Interspecies interactions stimulate diversification of the <i>Streptomyces coelicolor</i> secreted metabolome	<i>MBio</i>	151	20	19	28	18	08	244
Siderophore-drug complexes: Potential medicinal applications of the ‘Trojan horse’ strategy	<i>Trends in Pharmacological Sciences</i>	54	12	13	18	13	07	117
Slc11a1 (Nramp1) impairs growth of salmonella enterica serovar typhimurium in macrophages via stimulation of lipocalin-2 expression	<i>Journal of Leukocyte Biology</i>	39	3	2	7	3	1	55
Gram-positive siderophore-shuttle with iron-exchange from Fe-siderophore to apo-siderophore by <i>Bacillus cereus</i> YxeB	<i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA</i>	24	5	3	5	4	4	45
Pyochelin potentiates the inhibitory activity of gallium on <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i>	17	5	3	8	6	4	43
Norine: A powerful resource for novel nonribosomal peptide discovery	<i>Synthetic and Systems Biotechnology</i>	7	7	5	2	4	0	25

Table 2. Cont.

Article Title	Journal	Citations						Total
		<2019	2019	2020	2021	2022	2023	
		306	60	71	102	85	48	
A manganese photosensitive tricarbonyl molecule [Mn(CO) ₃ (tpa-κ ³ N)]Br enhances antibiotic efficacy in a multi-drug-resistant escherichia coli	Microbiology	3	2	8	3	6	2	24
Desferrioxamine Supports Metabolic Function in Primary Human Macrophages Infected with <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Frontiers in Immunology	-	-	3	9	6	3	21
The bacterial siderophore enterobactin confers survival advantage to <i>Salmonella</i> in macrophages	Gut Microbes	-	-	5	4	5	5	19
Desferrioxamine and desferrioxamine-caffeine as carriers of aluminum and gallium to microbes via the Trojan Horse Effect	Journal of Trace Elements in Medicine and Biology	2	3	3	5	1	1	15

In the analysis of the top 10 institutions, it is evident that the majority are located in developed countries such as the USA, the United Kingdom, Canada, and Belgium. Notably, the institution with the highest number of publications, citations, and the best h-index is the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (4 journals/345 citations/h-index 3). On the other hand, the National Institutes of Health had two published journals with only 19 citations, and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada with two publications, had merely nine citations. In contrast, the institutions Biotechnology and Biological Sciences Research Council and Beatson Institute for Cancer Research, both from the United Kingdom, had only one publication each; however, they garnered more than 20 citations each (Table 3).

Table 3. The top 10 institutions and the number of publications researching the antimicrobial activity of desferrioxamine, from 2012 to June of 2023.

Rank	Institution	Number of Papers	Citation	H-Index	Country
1	National Institute of Allergy and Infectious Diseases	4	345	3	USA
2	National Institutes of Health	2	19	1	USA
3	Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada	2	9	2	Canada
4	Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica	1	7	1	Argentina
5	Beatson Institute for Cancer Research	1	21	1	United Kingdom
6	Biotechnology and Biological Sciences Research Council	1	24	1	United Kingdom
7	Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas	1	12	1	Argentina
8	Crohn's and Colitis Foundation of America	1	19	1	USA
9	Duke University	1	0	0	USA
10	Fonds De La Recherche Scientifique—FNRS	1	4	1	Belgium

2.6. Analysis of Indicators in Terms of Citation and Impact Factor

Figure 4 illustrates the CiteScore (a), SJR (b), and SNIP (c) graphs compared in terms of citations and impact factor related to siderophore–desferrioxamine–antimicrobial research, demonstrating that the journals *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, *Frontiers in Immunology*, and *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* achieved the highest scores and metrics over the years.

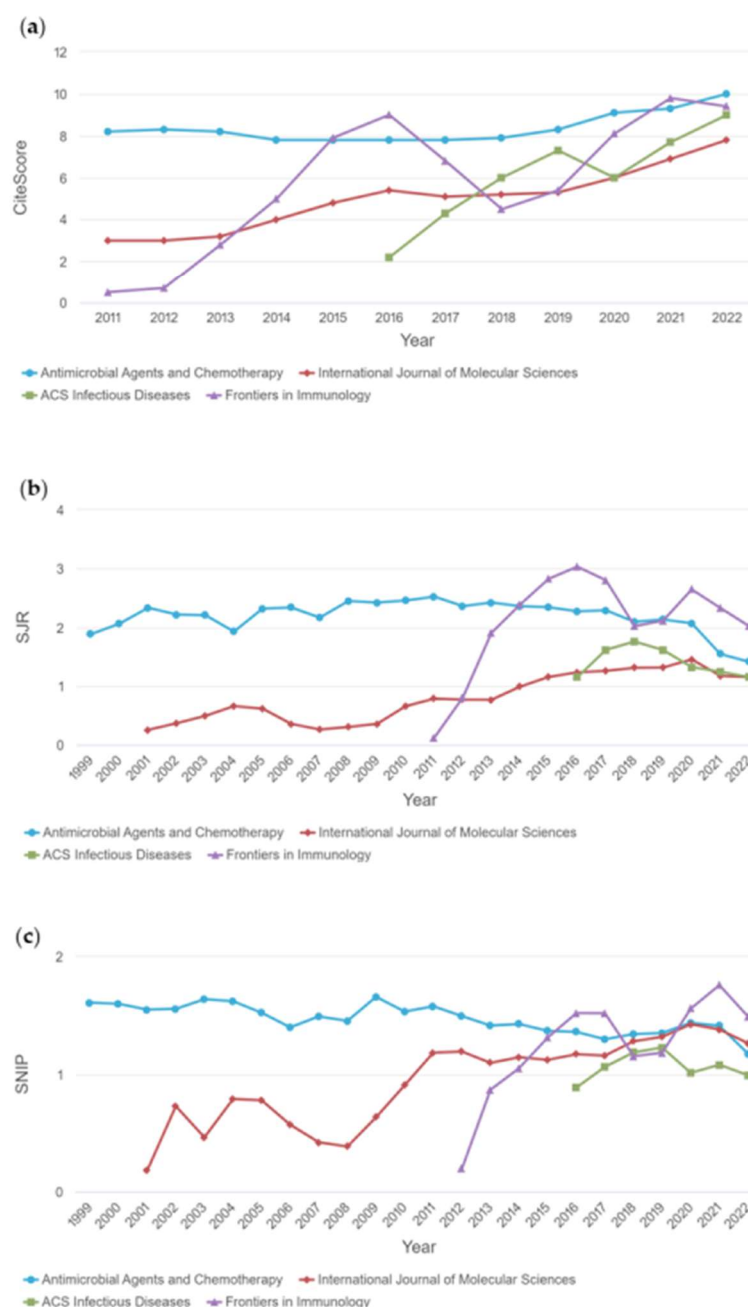


Figure 4. Indicators of publications on the antimicrobial activity of desferrioxamine, from 2012 to June of 2023. (a) Illustrates of CiteScore. (b) Illustrates of SJR, and (c) Illustrates of SNIP. The graphs compared in terms of citations and impact factor related to siderophore–desferrioxamine–antimicrobial research.

The CiteScore is a straightforward measure of citation impact for sources such as journals. It is based on the number of citations received by documents in a journal over four years, divided by the number of the same types of documents indexed in Scopus and published in those same four years. The SCImago Journal Rank (SJR) graph expresses the average number of weighted citations received in the selected year by documents published in the chosen journal in the preceding three years. On the other hand, the Source Normalized Impact per Paper (SNIP) graph provides a corrective metric to account for differences in citation potential across different fields.

The graph below depicts a 45-degree line (Figure 5), representing a 1:1 relationship between publications and citations, highlighting that out of the 24 documents considered for the h-index, 11 were cited at least 11 times (Figure 5). A comprehensive view of the selected documents reveals a general trend of citation growth starting from 2014 with 27 citations (Figure 6). However, there were peak periods such as 2015 (58 citations), 2017 (72 citations), 2020 (70 citations), and 2021 (96 citations). Conversely, there were periods with relative decreases, like 2016 (56 citations), 2018 (62 citations), 2019 (50 citations), 2022 (77 citations), and up to June 2023 with 44 citations.

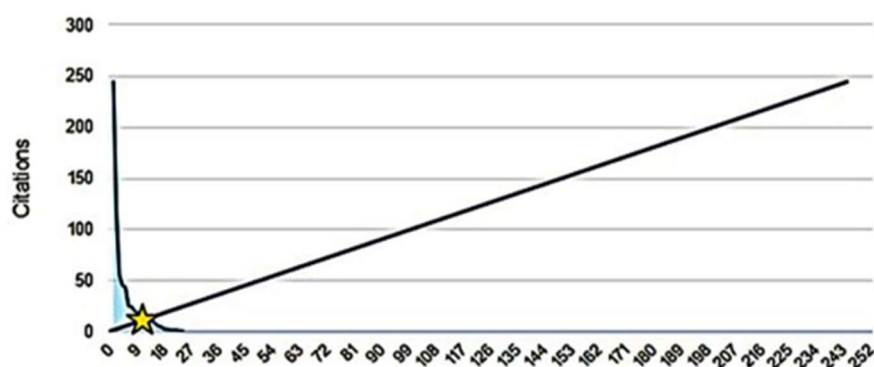


Figure 5. h-index of publications on the antimicrobial activity of desferrioxamine, from 2012 to June of 2023.

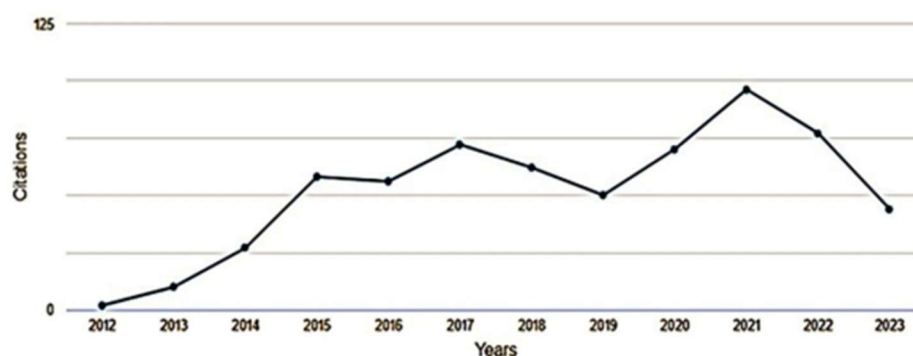


Figure 6. Citations of publications, over an 11-year period, on the antimicrobial activity of desferrioxamine, from 2012 to June of 2023.

2.7. Analysis of Co-Occurrence and Keyword Density Analysis

The networks of keyword co-occurrence (a) and word density or “hotspots” (b) were elucidated through an analysis involving a combination of the most cited references, keyword co-occurrence, clusters, and bursts, primarily focusing on the antimicrobial activity of desferrioxamine. The system mapped 772 terms, with the minimum selection criterion being the occurrence of a term at least five times in the publications, resulting in 27 words,

and among these, 7 keywords received special attention: “desferrioxamine”, “article”, “siderophore”, “controlled study”, “nonhuman”, “iron”, and “unclassified drug” (Figure 7).

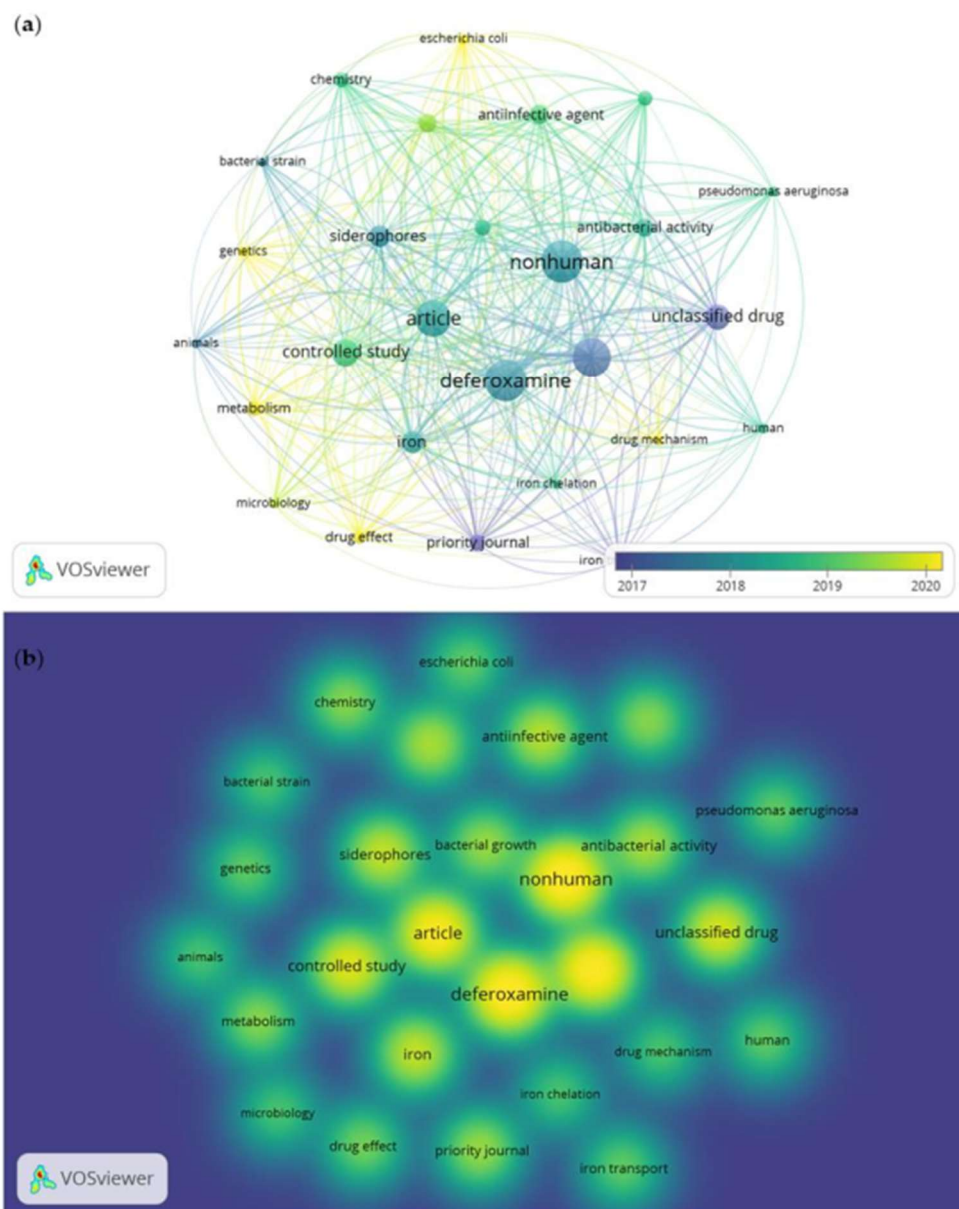


Figure 7. (a) Visualization of keyword co-occurrence. (b) Visualization of word density in publications on the antimicrobial activity of desferrioxamine, from 2012 to June of 2023.

In the visualization of the keyword co-occurrence analysis, the size of the colored circles indicates the frequency of occurrence of these words, and the lines connecting the nodes represent their co-occurrence in the same publication. The smaller the distance between two nodes, the higher the number of occurrences of the two keywords together. The hotspots are represented by the intensity of color and the size of the circle, where intense yellow stands out.

2.8. Analysis of Author Groups and Authors with Most Citations

After analyzing the authors and co-authors, a total of 143 names were identified, considering a maximum of 25 authors per document and a minimum of 1 document per author. By examining the frequency of names, it was observed that the largest cluster of related authors consisted of 16 names (Figure 8).



Figure 8. Visualization of the most cited authors in the field of the antimicrobial activity of desferrioxamine, from 2012 to June of 2023.

3. Discussion

This bibliometric review study of the scientific literature published on the antimicrobial activity of desferrioxamine from 2012 to 2023 allowed us to visualize the most recent and globally relevant scientific productions related to the proposed topic. Through the analysis, we observed a scarcity of publications in indexed databases. Of the 41 articles initially selected (as shown in the flowchart), 17 were excluded for not meeting the inclusion criteria, leaving only 24 studies for bibliometric analysis within the proposed timeframe. Furthermore, there was an uneven distribution of publication years for these journals, with no publications in 2018 and almost three times as many in 2022 compared to the average of the other years. This uneven distribution may be strongly related to the onset of the SARS-CoV-2 pandemic, as it was particularly observed in 2021, leading to a significant decrease in the number of scientific publications on topics unrelated to COVID-19 [4].

Regarding the countries with the highest number of publications, the United States takes the lead. This can be explained by several factors, including greater incentives and investments in research compared to other countries, and primarily because the United States has historically provided ample space for scientific production, unlike many other countries, such as Brazil, which prioritizes professional education in key areas of knowledge rather than creating research opportunities [41].

Among the prominent articles, ten received a more significant number of citations, each publication ranging from 15 to 244 citations, for a total of 672 citations in the last 10 years for these ten articles analyzed. This high number of citations can be explained by the fact that most of these journals are in the field of medicine, indicating that these publications have gained significant international and multidisciplinary visibility on the topic [42,43].

Another striking result of this bibliometric review is the low impact of the publications as revealed by the h-index. However, when other citation metrics and impact factors

were evaluated (CiteScore, SJR, and SNIP), focusing on desferrioxamine associated with siderophore and antimicrobial predictors, the most significant publications were found in journals dedicated to microbiology, immunology, and pharmacology. Several factors and barriers may explain this low impact of publications, such as the focus of journals on specific, innovative, and timely topics; low publication quality that prevents access to specialized and high-impact journals; lack of incentives for research in the field; the need for greater financial and technological investment to improve study quality, especially in developing countries; and the fact that a journal's impact factor does not necessarily reflect the quality of an article [44]. In addition, research resources are often directed towards the development of high-cost technologies and treatments, making it difficult to implement study results in low-income countries [43,45].

In the word density analysis, the term “antimicrobial” was absent in both abstracts and titles. However, other terms such as “antibacterial activity” and “unclassified drug” may indicate similarity to the antimicrobial term. Siderophore desferrioxamine was the most prominent among the words. Siderophores are organic molecules that bind to iron with high affinity and specificity and perform various biological functions [46]. They have been studied in several areas, such as microbial ecology, where they can facilitate the cultivation of recalcitrant microorganisms; agriculture, where they can stimulate plant development; biological control, where they can act as antifungal or antibacterial agents; bioremediation, where they can mobilize or immobilize heavy metals; biosensing, where they can signal the presence of iron in various matrices; and medicine, where they can potentiate the action of antibiotics against multiresistant bacteria [47]. Research also reports the activities of siderophores with an antifungal effect, which is a mutual effect between iron and calcium in fungal pathogens, and the combination of calcium with an iron chelator could serve to improve antifungal therapy [48].

The presence of the words *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* near desferrioxamine was also verified, suggesting research with a potential siderophore effect for these two pathogens. No words related to the term mycobacteria were found. The use of appropriate terms that reflect the purpose of the research is paramount, as they effectively guide the reader and consolidate search strategies in databases [45].

In mapping the network of authors, we found that the largest network of researchers is composed of North American scholars, branching out into smaller groups while still maintaining key researchers across these groups. This quantitative consolidation forms a cohesive group of researchers. This phenomenon can be attributed to the regional proximity of researchers as well as the higher number of publications and citations originating from the same region/country [43].

This study presented limitations regarding the few references for data comparison. Thus, we found that there are few studies on the use of siderophores and the use of desferrioxamine as alternatives for host-directed therapies for mycobacteria. It is necessary to stimulate more research in the various areas of knowledge in the future, with funding and international cooperation, as only in this way will we obtain a solid base of information with more robust data regarding more effective treatments in the control of difficult-to-treat diseases, since these diseases have a negative impact on the quality of life of affected people.

4. Materials and Methods

4.1. Origin and Research Strategy

All data were collected in June 2023. The topic was desferrioxamine associated with siderophore and antimicrobial predictors; publications in peer-reviewed journals between 2012 and June of 2023 were retrieved from Scopus, WOS, CINAHL, EMBASE, WHO, and PubMed/Medline databases to conduct this research.

WOS (owned by Clarivate, formerly Thomson Reuters) and Scopus (owned by Elsevier) are the most well known sources of citation data with curation by subscribing institutions. They are also the most widely used databases for bibliometric analysis [15,16]. The combination of WOS and Scopus databases covers a wider range of scientific disci-

plines, a more comprehensive range of publication dates, and a wider range of countries while providing detailed citation analysis.

Cumulative Index to Nursing and Allied Health (CINAHL) involves rigorous curation of OA journals, resulting in a growing collection of 1253 global OA journals. Once validated and certified for inclusion, these OA journals undergo high-quality subject indexing and sophisticated, accurate full-text linking, covering titles published since 1937 (information collected from each database's website—not included in the references).

Embase is a unique medical literature database that goes beyond content. By indexing full-text content from Emtree and specific search terms, it retrieves all relevant and current results, including information that may not be available in other databases.

The WHO Library is the world's leading public health library. It provides access to WHO knowledge as well as to other sources of scientific literature produced worldwide. The resources and expertise of the WHO Library also bring scientific evidence and knowledge to low- and middle-income countries through a number of low-cost, high-impact initiatives.

PubMed is a free resource that supports the search and retrieval of biomedical and life sciences literature to improve global and individual health. The database contains over 35 million citations and abstracts from the biomedical literature. It does not include full-text journal articles; however, links to the full text are generally available if they are accessible from other sources, such as the publisher's website or PubMed Central (PMC). PubMed has been publicly available online since 1996 and is developed and maintained by the National Center for Biotechnology Information (NCBI) at the National Library of Medicine (NLM), part of the National Institutes of Health (NIH).

The search strategy used was as comprehensive as possible to identify all relevant publications. Keyword mapping was used to structure the search: "siderophores" AND "desferrioxamine" AND "antimicrobial". Each article extracted from Scopus TM includes information on the authors, institutional affiliation, country, year of publication, journal of origin, title, abstract, keywords, and references. The literature search process is shown in Figure 9.

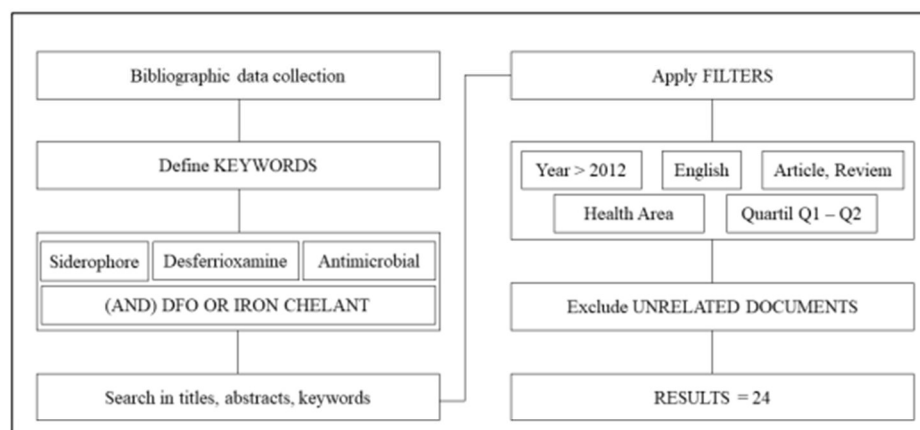


Figure 9. Bibliographic data collection process.

Literature quantity and publication trends were analyzed in terms of total publications, research types, research organizations, author contributions, journals, and funding. Publication quality was assessed by total citation frequency, average citations per article, h-index, CiteScore, SCImago Journal Rank (SjR), and Source Normalized Impact per Paper (SNIP). Related data such as the number of publications, citations, h-index, journal, references, and keywords were extracted and recorded as bibliometric indicators.

4.2. Preliminary Screening

Disagreements regarding inconsistent content were discussed and resolved. Two authors independently screened articles based on their titles to identify duplicate articles and articles that met the exclusion criteria (e.g., case studies, protocols, letters, books, and reports unrelated to the topic of interest). Articles that could not be judged to meet the inclusion criteria based on their titles alone were retained for the next screening stage [17], which was completed on 30 June 2023. Thus, inclusion and exclusion criteria were used to limit the age range of the articles reviewed (Table 4).

Table 4. Inclusion and exclusion criteria.

Inclusion Criteria	Exclusion Criteria
✓ Peer-reviewed journal articles	✓ Dissertations
✓ Research articles	✓ Letters
✓ Reviews (narrative and systematic)	✓ Conference abstracts
✓ Clinical studies	✓ Case studies
✓ Theoretical articles	✓ Protocols
✓ Articles in English	✓ Books
✓ Abstract available	✓ Unrelated articles or those whose main outcome was not DFO
✓ Articles on DFO and <i>Mycobacteria</i>	
✓ DFO as the topic of interest	

4.3. Access to Information

Citation information for all articles was exported from Scopus.

4.4. Bibliometric Analysis

This study conducted a quantitative descriptive analysis based on bibliometric analysis, and the data generated are presented in graphs and tables with results in absolute and percentage terms.

Bibliometric mapping and cluster analysis were performed using VOSviewer version 1.6.15 (Leiden University, the Netherlands), a software tool for constructing and visualizing bibliometric networks. Thematic maps were created using QGIS 3.32 from geocoding performed by measuring latitude and longitude on the website <https://pt.batchgeo.com> (accessed on 15 June 2023), using the DATUM SIRGAS 2000 geodetic reference system.

Bibliometric mapping visualizes the literary production in publications and citation information for a specific field. Cluster analysis uses different algorithms to detect the natural division of networks of research groups (clusters) based on similarity, allowing the visualization of co-authorship networks involving researchers, institutions, and countries [18].

4.5. Ethics

As this was an analysis of existing research, ethical approval was not required. No authors were contacted for further information about their publications.

5. Conclusions

The total number of publications on desferrioxamine and its biological activities has grown exponentially over the last decade. However, the proportion of articles on the topic remains low. Research groups worldwide are encouraged to focus their collaborative efforts on high-quality research and clinical trials.

Author Contributions: E.M.d.S. and A.Z.; methodology, P.V.d.O., R.L.d.S.L. and R.d.A.L.; investigation, P.V.d.O., R.L.d.S.L., R.d.A.L., Y.C.M., A.B.M., B.d.O.d.M., M.F.G., R.L.F., F.B.B.d.F.N., A.S.d.S.A., W.d.C.A.F., R.C.C., A.Z. and E.M.d.S.; resources, P.V.d.O., R.L.d.S.L., R.d.A.L., Y.C.M., A.B.M., B.d.O.d.M., M.F.G., R.L.F., F.B.B.d.F.N., A.S.d.S.A., W.d.C.A.F., R.C.C., A.Z. and E.M.d.S.; writing—original draft preparation, E.M.d.S., A.Z., P.V.d.O., R.L.d.S.L. and R.d.A.L.; writing—review and

editing, E.M.d.S. and R.C.C.; supervision, E.M.d.S.; project administration, E.M.d.S.; funding acquisition, E.M.d.S. and A.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) under grant numbers FAPEMA—INFRA-022122021, CIDADES-05255, BEPP-0190621, and Universal-06536/22, Universidade CEUMA.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data sharing is not applicable.

Acknowledgments: The authors extend their appreciation to CEUMA University (UNICEUMA) for funding this work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Troesch, A.; Nguyen, H.; Miyada, C.G.; Desvarenne, S.; Gingeras, T.R.; Kaplan, P.M.; Cros, P.; Mabilat, C. *Mycobacterium* species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *J. Clin. Microbiol.* **1999**, *37*, 49–55. [\[CrossRef\]](#)
2. Johansen, M.D.; Herrmann, J.L.; Kremer, L. Non-tuberculous mycobacteria and the rise of *Mycobacterium abscessus*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18*, 392–407. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Gordon, S.V.; Parish, T. Microbe Profile: *Mycobacterium tuberculosis*: Humanity's deadly microbial foe. *Microbiology* **2018**, *164*, 437–439. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Gao, J.; Yin, Y.; Myers, K.R.; Lakhani, K.R.; Wang, D. Potentially long-lasting effects of the pandemic on scientists. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 6188. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Richard, K.L.; Kelley, B.R.; Johnson, J.G. Heme uptake and utilization by gram-negative bacterial pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2019**, *9*, 81. [\[CrossRef\]](#)
6. Pham, D.D.; Fattal, E.; Tsapis, N. Pulmonary drug delivery systems for tuberculosis treatment. *Int. J. Pharm.* **2015**, *478*, 517–529. [\[CrossRef\]](#)
7. Johnston, J.C.; Cooper, R.; Menzies, D. Chapter 5: Treatment of tuberculosis disease. *Can. J. Respir. Crit. Care Sleep Med.* **2022**, *6* (Suppl. S1), 66–76. [\[CrossRef\]](#)
8. Kapp, E.; Joubert, J.; Sampson, S.L.; Warner, D.F.; Seldon, R.; Jordaan, A.; de Vos, M.; Sharma, R.; Malan, S.F. Antimycobacterial Activity, Synergism, and Mechanism of Action Evaluation of Novel Polycyclic Amines against *Mycobacterium tuberculosis*. *Adv. Pharmacol. Pharm. Sci.* **2021**, *2021*, 5583342. [\[CrossRef\]](#)
9. Ezzeddine, Z.; Ghssein, G. Towards new antibiotics classes targeting bacterial metallophores. *Microb. Pathog.* **2023**, *182*, 106221. [\[CrossRef\]](#)
10. Ghssein, G.; Ezzeddine, Z. The Key Element Role of Metallophores in the Pathogenicity and Virulence of *Staphylococcus aureus*: A Review. *Biology* **2022**, *11*, 1525. [\[CrossRef\]](#)
11. Marchetti, M.; De Bei, O.; Bettati, S.; Campanini, B.; Kovachka, S.; Gianquinto, E.; Spyarakis, F.; Ronda, L. Iron Metabolism at the Interface between Host and Pathogen: From Nutritional Immunity to Antibacterial Development. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2145. [\[CrossRef\]](#)
12. Cassat, J.E.; Skaar, E.P. Iron in infection and immunity. *Cell Host Microbe* **2013**, *13*, 509–519. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Bosne-David, S.; Bricard, L.; Ramiandrasoa, F.; DeRoussent, A.; Kunesch, G.; Andreumont, A. Evaluation of growth promotion and inhibition from mycobactins and nonmycobacterial siderophores (Desferrioxamine and FR160) in *Mycobacterium aurum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 1837–1839. [\[CrossRef\]](#)
14. Cahill, C.; O'Connell, F.; Gogan, K.M.; Cox, D.J.; Basdeo, S.A.; O'Sullivan, J.; Gordon, S.V.; Keane, J.; Phelan, J.J. The Iron Chelator Desferrioxamine Increases the Efficacy of Bedaquiline in Primary Human Macrophages Infected with BCG. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2938. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Lau, C.K.; Krewulak, K.D.; Vogel, H.J. Bacterial ferrous iron transport: The Feo system. *FEMS Microbiol. Rev.* **2016**, *40*, 273–298. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Zyoud, S.H.; Fuchs-Hanusch, D. A bibliometric-based survey on AHP and TOPSIS techniques. *Expert Syst. Appl.* **2017**, *78*, 158–181. [\[CrossRef\]](#)
17. Dvoretckaya, A.; Egorova, T.; Dzhuzha, A.; Levit, M.; Sivtsov, E.; Demyanova, E.; Korzhikova-Vlakh, E. Polymyxin B Conjugates with Bio-Inspired Synthetic Polymers of Different Nature. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 1832. [\[CrossRef\]](#)
18. Shepherdson, E.M.F.; Elliot, M.A. Cryptic specialized metabolites drive *Streptomyces* exploration and provide a competitive advantage during growth with other microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2022**, *119*, e2211052119. [\[CrossRef\]](#)
19. Du, G.F.; Dong, Y.; Fan, X.; Yin, A.; Le, Y.J.; Yang, X.Y. Proteomic Investigation of the Antibacterial Mechanism of Cefiderocol against *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.* **2022**, *10*, e01093-22. [\[CrossRef\]](#)
20. Pita-Grisanti, V.; Chasser, K.; Sobol, T.; Cruz-Monserrate, Z. Understanding the Potential and Risk of Bacterial Siderophores in Cancer. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 867271. [\[CrossRef\]](#)

21. Naclerio, G.A.; Onyedibe, K.I.; Karanja, C.W.; Aryal, U.K.; Sintim, H.O. Comparative Studies to Uncover Mechanisms of Action of N-(1,3,4-Oxadiazol-2-yl) benzamide Containing Antibacterial Agents. *ACS Infect. Dis.* **2022**, *8*, 865–877. [CrossRef] [PubMed]
22. Baranova, M.N.; Kudzhayev, A.M.; Mokrushina, Y.A.; Babenko, V.V.; Kornienko, M.A.; Malakhova, M.V.; Yudin, V.G.; Rubtsova, M.P.; Zalevsky, A.; Belozero, O.A.; et al. Deep Functional Profiling of Wild Animal Microbiomes Reveals Probiotic *Bacillus pumilus* Strains with a Common Biosynthetic Fingerprint. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1168. [CrossRef] [PubMed]
23. Deflandre, B.; Stulanovic, N.; Planckaert, S.; Anderssen, S.; Bonometti, B.; Karim, L.; Coppeters, W.; Devreese, B.; Rigali, S. The virulome of *Streptomyces scabiei* in response to cello-oligosaccharide elicitors. *Microb. Genom.* **2022**, *8*, 000760. [CrossRef] [PubMed]
24. Chan, D.C.K.; Burrows, L.L. Thiocillin and micrococin exploit the ferrioxamine receptor of *Pseudomonas aeruginosa* for uptake. *J. Antimicrob. Chemother.* **2021**, *76*, 2029–2039. [CrossRef] [PubMed]
25. Dávila Costa, J.S.; Hoskisson, P.A.; Paterlini, P.; Romero, C.M.; Alvarez, A. Whole genome sequence of the multi-resistant plant growth-promoting bacteria *Streptomyces* sp. Z38 with potential application in agroindustry and bionanotechnology. *Genomics* **2020**, *112*, 4684–4689. [CrossRef]
26. Phelan, J.J.; McQuaid, K.; Kenny, C.; Gogan, K.M.; Cox, D.J.; Basdeo, S.A.; O’Leary, S.; Tazoll, S.C.; Maoldomhnaigh, C.Ó.; O’Sullivan, M.P.; et al. Desferrioxamine Supports Metabolic Function in Primary Human Macrophages Infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 836. [CrossRef]
27. Kidd, J.M.; Abdelraouf, K.; Nicolau, D.P. Development of neutropenic murine models of iron overload and depletion to study the efficacy of siderophore-antibiotic conjugates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64*, e01961-19.
28. Saha, P.; Xiao, X.; Yeoh, B.S.; Chen, Q.; Katkera, B.; Kirimanjeswara, G.S.; VijayKumar, M. The bacterial siderophore enterobactin confers survival advantage to *Salmonella* in macrophages. *Gut Microbes* **2019**, *10*, 412–423. [CrossRef]
29. Rana, N.; Jesse, H.E.; Tinajero-Trejo, M.; Butler, J.A.; Tarlit, J.D.; Von Und Zur Muhlen, M.L.; Nagel, C.; Schatzschneider, U.; Poole, R.K. A manganese photosensitive tricarbonyl molecule [Mn(CO)₃(tpa-κ³N)]Br enhances antibiotic efficacy in a multi-drug-resistant *Escherichia coli*. *Microbiology* **2017**, *163*, 1477–1489. [CrossRef]
30. Huayhuaz, J.A.A.; HVitorino, A.; Campos, O.S.; Serrano, S.H.P.; Kaneko, T.M.; Espósito, B.P. Desferrioxamine and desferrioxamine-caffeine as carriers of aluminum and gallium to microbes via the Trojan Horse Effect. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2017**, *41*, 16–22. [CrossRef]
31. Thyagarajan, S.L.; Ramanathan, G.; Singaravelu, S.; Kandhasamy, S.; Perumal, P.T.; Sivagnanam, U.T. Microbial Siderophore as MMP inhibitor: An interactive approach on wound healing application. *Wound Med.* **2017**, *16*, 7–14. [CrossRef]
32. Pupin, M.; Esmaeel, Q.; Flissi, A.; Dufresne, Y.; Jacques, P.; Leclère, V. Norine: A powerful resource for novel nonribosomal peptide discovery. *Synth. Syst. Biotechnol.* **2016**, *1*, 89–94. [CrossRef] [PubMed]
33. Kishimoto, S.; Nishimura, S.; Hatano, M.; Igarashi, M.; Kakeya, H. Total Synthesis and Antimicrobial Activity of Chlorocatechelin A. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 6076–6082. [CrossRef]
34. Jayasinghe, S.; Siriwardhana, A.; Karunaratne, V. Natural iron sequestering agents: Their roles in nature and therapeutic potential. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2015**, *7*, 8–12.
35. Frangipani, E.; Bonchi, C.; Minandri, F.; Imperi, F.; Visca, P. Pyochelin potentiates the inhibitory activity of gallium on *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 5572–5575. [CrossRef]
36. Górski, A.; Sloderbach, A.; Marszall, M.P. Siderophore-drug complexes: Potential medicinal applications of the ‘Trojan horse’ strategy. *Trends Pharmacol. Sci.* **2014**, *35*, 442–449. [CrossRef] [PubMed]
37. Farkas, E.; Szabó, O.; Parajdi-Losonczy, P.L.; Balla, G.; Pócsi, I. Mn(II)/Mn(III) and Fe(III) binding capability of two *Aspergillus fumigatus* siderophores, desferrioxamine and N’, N’’, N’’’- triacetylfulvarine C. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *139*, 30–37. [CrossRef]
38. Fukushima, T.; Allred, B.E.; Sia, A.K.; Nichiporuk, R.; Andersen, U.N.; Raymond, K.N. Gram-positive siderophore-shuttle with iron-exchange from Fesiderophore to apo-siderophore by *Bacillus cereus* YxeB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 13821–13826. [CrossRef]
39. Traxler, M.F.; Watrous, J.D.; Alexandrov, T.; Dorrestein, P.C.; Kolter, R. Interspecies interactions stimulate diversification of the *Streptomyces coelicolor* secreted metabolome. *mBio* **2013**, *4*, e00459-13. [CrossRef]
40. Weiss, G.; Fritsche, G.; Nairz, M.; Libby, S.J.; Fang, F.C. Slc11a1 (Nramp1) impairs growth of *Salmonella enterica* serovar typhimurium in macrophages via stimulation of lipocalin-2 expression. *J. Leukoc. Biol.* **2012**, *92*, 353–359.
41. Cadillo, C.D.M. *The Role of Patents in Latin American Development: Models of Protection of Pharmaceutical Patents and Access to Medicines in Brazil, Chile and Venezuela*; Hanken School of Economics: Helsinki, Finland, 2014; 265p.
42. Garcia, J.B.S.; de Moraes, É.B.; Neto, J.O.B. A Bibliometric Analysis of Published Literature in Postoperative Pain in Elderly Patients in Low- and Middle-Income Countries. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 2334. [CrossRef] [PubMed]
43. Bonorino, C. Scientific Research in Brazil is Undervalued. GZH Porto Alegre. 2015. Available online: <https://gauchazh.clicrbs.com.br/porto-alegre/noticia/2015/08/pesquisa-cientifica-no-brasil-e-menosprezada-4825155.html> (accessed on 7 July 2023).
44. Zhao, Y.; Zhang, Z.; Guo, S.; Feng, B.; Zhao, X.; Wang, X.; Wang, Y. Bibliometric Analysis of Research Articles on Pain in the Elderly Published from 2000 to 2019. *J. Pain Res.* **2021**, *14*, 1007–1025. [CrossRef] [PubMed]
45. Doğan, G.; Karaca, O. A bibliometric analysis of the field of anesthesia during 2009–2018. *Braz. J. Anesthesiol.* **2020**, *70*, 140–152. [CrossRef] [PubMed]
46. Kramer, J.; Özkaya, Ö.; Kümmerli, R. Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18*, 152–163. [CrossRef] [PubMed]

-
47. Saha, M.; Sarkar, S.; Sarkar, B.; Sharma, B.K.; Bhattacharjee, S.; Tribedi, P. Microbial siderophores and their potential applications: A review. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2016**, *23*, 3984–3999. [[CrossRef](#)]
 48. Ye, J.; Wang, Y.; Li, X.; Wan, Q.; Zhang, Y.; Lu, L. Synergistic Antifungal Effect of a Combination of Iron Deficiency and Calcium Supplementation. *Microbiol. Spectr.* **2022**, *10*, e0112122. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

5.2 Capítulo II – *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*: Biofilm Formation, Host Immune Response, and Therapeutic Strategies

Periódico: Microorganisms

Classificação Qualis – Periódico: A1

Área: Medicina I

Fator de Impacto: 4.1

ISSN: 2076-2607



microorganisms

an Open Access Journal by MDPI



Mycobacterium abscessus subsp. *massiliense*: Biofilm Formation, Host Immune Response, and Therapeutic Strategies

Roseane Lustosa de Santana Lira; Flávio Augusto Barros Nogueira; Rosália de Fátima Penna de Carvalho Campos; Dayenne Regina Mota Ferreira; Pedro Lucas Brito Tromps Roxo; Caio César Santana de Azevedo; Eleonôra Costa Monteiro Gimenes; Ruan Lucas Costa Bastos; Camila Evangelista Carnib Nascimento; Flávia Danyelle Oliveira Nunes; Mayane Cristina Pereira Marques; Carmem Duarte Lima Campos; Camila Guerra Martinez; Adrielle Zagmignan; Luís Cláudio Nascimento Silva; Rachel Melo Ribeiro; Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos; Rafael Cardozo Gonçalves; Eduardo Martins da Silva

Microorganisms 2025, Volume 13, Issue 2, 447



Review

Mycobacterium abscessus subsp. *massiliense*: Biofilm Formation, Host Immune Response, and Therapeutic Strategies

Roseane Lustosa de Santana Lira ^{1,†}, Flávio Augusto Barros Nogueira ^{2,†}, Rosália de Fátima Penna de Carvalho Campos ³, Dayenne Regina Mota Ferreira ³, Pedro Lucas Brito Tromps Roxo ⁴, Caio César Santana de Azevedo ⁴, Eleonora Costa Monteiro Gímenes ⁴, Ruan Lucas Costa Bastos ⁴, Camila Evangelista Carnib Nascimento ¹, Flávia Danyelle Oliveira Nunes ¹, Mayane Cristina Pereira Marques ¹, Carmem Duarte Lima Campos ¹, Camila Guerra Martinez ³, Adrielle Zagnignan ^{2,3}, Luís Cláudio Nascimento Silva ³, Rachel Melo Ribeiro ¹, Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos ¹, Rafael Cardoso Carvalho ¹ and Eduardo Martins de Sousa ^{1,2,3,*}

¹ Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Maranhão—UFMA, São Luís 65080-805, Brazil; roseane.lustosa@discente.ufma.br (R.L.d.S.L.); camila.carnib@ufma.br (C.E.C.N.); flavia.danyelle@ufma.br (F.D.O.N.); marques.mayanne@gmail.com (M.C.P.M.); carmem.campos@discente.ufma.br (C.D.L.C.); melo.rachel@ufma.br (R.M.R.); ana.azevedo@ufma.br (A.P.S.d.A.d.S.); carvalho.rafael@ufma.br (R.C.C.)

² Graduate Program in Biodiversity and Biotechnology, Amazônia—BIONORTE, Federal University of Maranhão—UFMA, São Luís 65080-805, Brazil; augustofabn@gmail.com (F.A.B.N.); adrielle004602@ceuma.com.br (A.Z.)

³ Graduate Program in Biosciences Applied to Health, CEUMA University—UNICEUMA, São Luís 65075-120, Brazil; rocam_ped@hotmail.com (R.d.F.P.d.C.C.); dayenneregina@hotmail.com (D.R.M.F.); camila005150@ceuma.com.br (C.G.M.); luiscn.silva@ceuma.br (L.C.N.S.)

⁴ Undergraduate in Medicine, CEUMA University—UNICEUMA, São Luís 65075-120, Brazil; pedrotromps.med@gmail.com (P.L.B.T.R.); caioazevedo1513@gmail.com (C.C.S.d.A.); eleonoragimenes.medicina@gmail.com (E.C.M.G.); lucasruan1500@gmail.com (R.L.C.B.)

* Correspondence: eduardo.martins@ceuma.br

† These authors contributed equally to this work.



Academic Editor: Simon Swift

Received: 15 January 2025

Revised: 8 February 2025

Accepted: 11 February 2025

Published: 18 February 2025

Citation: Lira, R.L.d.S.; Nogueira, F.A.B.; Campos, R.d.F.P.d.C.; Ferreira, D.R.M.; Roxo, P.L.B.T.; de Azevedo, C.C.S.; Gímenes, E.C.M.; Bastos, R.L.C.; Nascimento, C.E.C.; Nunes, F.D.O.; et al. *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*: Biofilm Formation, Host Immune Response, and Therapeutic Strategies. *Microorganisms* 2025, 13, 447. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13020447>

Copyright: © 2025 by the authors.

Licensee MDPI, Basel, Switzerland.

This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Infection by *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* poses a growing public health threat, especially to immunocompromised individuals. The pathogenicity of this mycobacterium is directly linked to its ability to form biofilms, complex structures that confer resistance to antibiotics and the host immune response. The extracellular matrix of the biofilm acts as a physical barrier, hindering the penetration of drugs and the action of the immune system, while also inducing a slow-growth state that reduces susceptibility to antibiotics. Current therapies, which involve prolonged use of multiple antibiotics, are often ineffective and cause significant side effects. Therefore, it is essential to explore new strategies targeting bacterial resistance and biofilm destruction. This narrative review explores the biofilm-forming capacity of *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* and the potential of novel therapeutic strategies. Promising approaches include inhibiting biofilm formation, developing drugs with improved penetration of the extracellular matrix, combination therapies with agents that destabilize the biofilm structure, and modulating the host immune response. Investing in research and development of new therapeutic strategies is essential to combat this resistant bacterium and improve patient outcomes.

Keywords: biofilm; *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*; immune response

1. Introduction

Mycobacterium abscessus subsp. *massiliense* is a rapidly growing non-tuberculous mycobacterium [NTM] that stands out as an opportunistic pathogen, posing an increasing

threat to human health [1]. The ubiquity of this organism in environments such as water and soil, combined with its tendency to colonize hospital water systems, heightens the risk of infections, particularly among immunocompromised individuals [2].

M. abscessus subsp. *massiliense* has a particular affinity for the respiratory tract [3]. The chronic and progressive nature of these infections leads to a constant decline in pulmonary function, significantly affecting patients' quality of life and survival [4,5]. *M. abscessus* subsp. *massiliense* causes not only pulmonary infections but also skin and soft tissue infections, particularly following surgical procedures, trauma, or the use of medical devices [6,7]. These infections are persistent and often recurrent, posing significant challenges for clinical management [1,7].

One of the challenges in treating infections caused by *M. abscessus* subsp. *massiliense* is its remarkable resistance to a wide range of antibiotics [8]. This intrinsic resistance results from a combination of factors, including the complex structure of the mycobacterial cell wall, the presence of efflux pumps that actively expel drugs, and its ability to form biofilms, which provide protection against environmental stress and antibiotic action [7,9].

Biofilms are communities of microorganisms that adhere to surfaces and produce a self-generated extracellular matrix. This matrix provides antimicrobial resistance and helps microorganisms evade the host immune response [10,11]. The extracellular matrix, primarily composed of polysaccharides, proteins, and extracellular DNA, acts as a physical barrier, limiting the penetration of antibiotics. Simultaneously, the slow growth and reduced metabolism of bacteria within the biofilm make them less susceptible to antibiotics [12].

Furthermore, biofilm formation can promote bacteria within the biofilm to express antibiotic resistance genes and harbor persistent cells, which are highly tolerant to antibiotics and can cause relapses after treatment [10]. The extracellular matrix also shields bacteria from the immune system, while intercellular communication through *quorum sensing* coordinates biofilm formation, virulence, and antibiotic resistance [10,11,13].

It is essential to note that biofilm formation is not restricted to a single morphotype of *M. abscessus*. Both smooth and rough morphotypes have demonstrated the ability to form biofilms [12]. Rough morphotypes, often associated with higher virulence, form biofilm-like aggregates that exhibit tolerance to adverse conditions such as acidic pH, hydrogen peroxide, and antibiotic treatments [10]. Cord formation, a hallmark of rough strains, facilitates extracellular dissemination and immune evasion, contributing to infection persistence [8,10,11].

Biofilm formation by *M. abscessus*, particularly the *massiliense* subspecies, presents a significant obstacle in the treatment of pulmonary infections, especially in patients with cystic fibrosis [5]. The biofilm's complex structure, composed of bacteria embedded in an extracellular matrix, creates a protective environment that limits antibiotic penetration and hinders the host immune system's response [11,12]. The increasing prevalence of *M. abscessus* infections and its inherent antimicrobial resistance demand a deeper understanding of the mechanisms behind biofilm formation, composition, and structure [5,8]. Elucidating the intricate relationship between biofilms and the host immune response, including immune evasion mechanisms and infection persistence, is critical for developing effective therapeutic strategies.

This review aims to investigate the impact of biofilm formation by *M. abscessus* subsp. *massiliense* on the host immune response and explore new therapeutic approaches, including the development of novel antimicrobial agents, therapies targeting the biofilm matrix, and strategies to enhance the activity of existing antibiotics, with the goal of improving clinical outcomes for patients affected by this challenging bacterium.

2. Characteristics of *M. abscessus* subsp. *massiliense*

M. abscessus, including the subspecies *massiliense*, is a rapidly growing mycobacterium characterized by its ability to form visible colonies on agar media within just four days [14]. This species exhibits two distinct colony morphologies: smooth [MaSm] and rough [MaRg], differentiated by the presence or absence of glycopeptidolipids [GPLs] in the cell wall. The MaSm variant, rich in GPLs, presents a smooth surface and a nearly mucoid appearance when forming biofilms [12]. In contrast, the MaRg variant, deficient in GPLs, is hyperaggregative, forming biofilm-like aggregates with a characteristic cauliflower morphology [8]. Figure 1 illustrates the morphological variations between MaSm and MaRg colonies and also details the cell wall structure and the distribution of GPLs, which are important for the bacterium's ability to cause disease, including components such as GPLs and LAM.

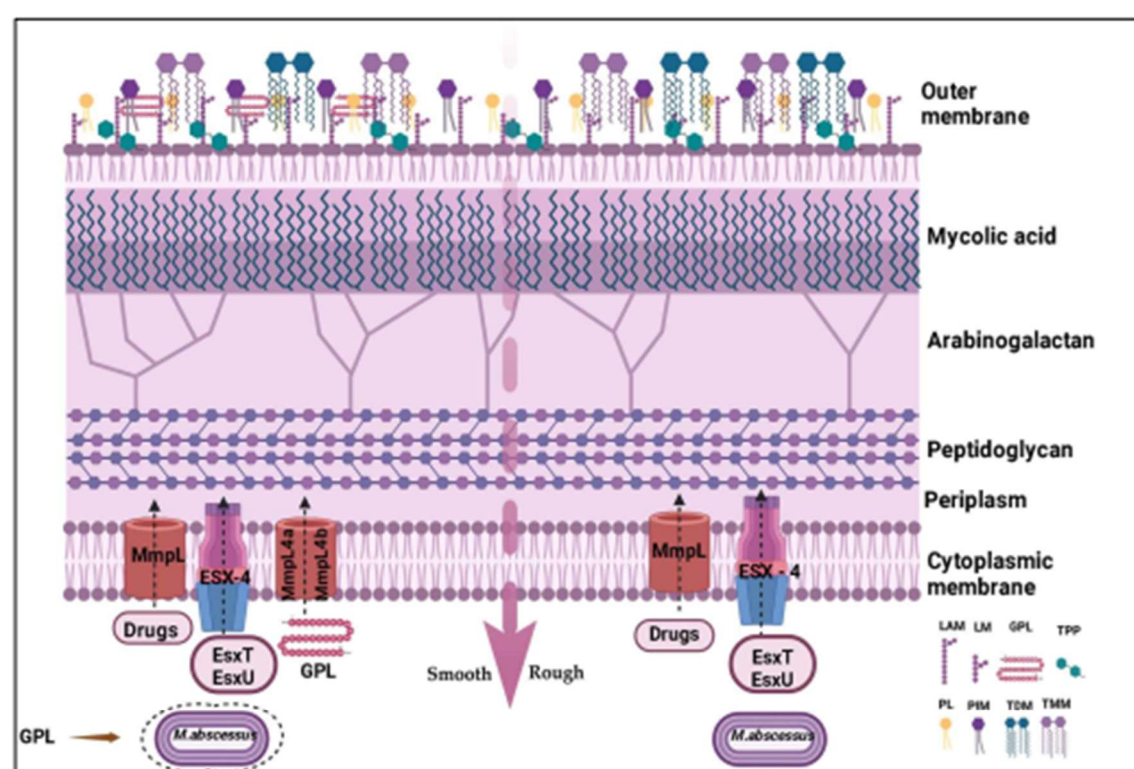


Figure 1. Schematic representation of the mycobacterial cell envelope. GPLs are specific to the smooth [S] variant cell wall and are transported across the inner membrane by MmpL4a and MmpL4b proteins. Other MmpL proteins may function as drug efflux pumps, contributing to intrinsic antibiotic resistance. The type VII secretion system [ESX-4], responsible for translocating EsxT and EsxU effectors, plays a key role in intracellular survival and bacterial pathogenesis. Legend: LAM [lipid arabinomannan], LM [lipomannan], PIM [phosphatidyl-inositol mannoside], PL [phospholipid], TDM [trehalose dimycolate], TPP [trehalose polyphosphate], and TMM [trehalose monomycolate]. Figure created with BioRender.com.

Under microscopy, *M. abscessus* subsp. *massiliense* appears as short or long, thin, slightly curved, non-sporulated, acid-fast bacilli, staining red with the Ziehl–Neelsen technique. Genomically, *M. abscessus* subsp. *massiliense* is recognized as a distinct subspecies of *M. abscessus* through genomic analyses [11]. A key genetic feature of the *massiliense* subspecies is the presence of an inactivated *erm41* gene, which confers susceptibility to macrolide antibiotics [15].

Additionally, the genome of *M. abscessus* harbors non-mycobacterial virulence genes, some originating from *P. aeruginosa* [16]. Mutations in genes involved in the biosynthesis or transport of GPLs can lead to transitions from high-GPL-producing to low-GPL-producing variants, affecting virulence and interactions with host cells [8]. Similarly, modifications in lipoarabinomannan [LAM], an important lipoglycan in the cell wall, due to mutations in the *embC* gene, contribute to phenotypic heterogeneity in host-adapted *M. abscessus* isolates. These mutations impact the ability to form serpentine cords and biofilms, replicate within innate immune cells, and induce inflammatory responses [17].

The intricate architecture of the *M. abscessus* cell wall, rich in unique components such as GPLs, LAM, mycolic acids, and glycolipids, grants this mycobacterium remarkable adaptability and survival in diverse environments. This complex structure, along with antibiotic resistance mechanisms mediated by efflux pumps and the ESX-4 secretion system, significantly contributes to its pathogenicity, enabling the bacterium to persist in intracellular environments, modulate the host immune response, and cause hard-to-treat infections [11,15,16].

3. Virulence Factors

The virulence of *M. abscessus* subsp. *massiliense* is multifactorial and intrinsically linked to its ability to form biofilms—complex structures that confer antibiotic resistance and enable immune evasion. Several virulence factors influence infection and antibiotic resistance, with the key factors presented in Table 1 [14].

Table 1. Virulence factors of *M. abscessus* subsp. *massiliense*.

Virulence Factor	Description	Role in Virulence	References
Morphotypes	Smooth [MaSm]: rich in GPLs, forms viscous biofilms, evades the immune system. Rough [MaRg]: fewer GPLs, more invasive, forms resistant aggregates.	Adaptation to the host environment, immune evasion, resistance to adverse conditions.	[18,19]
Glycopeptidolipids [GPLs]	Abundant cell wall components in the smooth morphotype, surface lipids that affect biofilm structure and modulate the immune response.	Adhesion, biofilm formation, immune response modulation [inhibits TLR2 and TNF- α], infection persistence.	[10,18]
Trehalose dimycolate [TDM]	Glycolipid present in both morphotypes.	Contributes to virulence, particularly in biofilms formed in the lungs of cystic fibrosis patients.	[19]
Lipoarabinomannan [LAM]	Lipoglycan present in the cell wall.	Modulates the immune response.	[19,20]
Surface proteins	Adhesins, porins, etc.	Host cell adhesion, nutrient uptake, antibiotic resistance.	[19–21]
Biofilms	Complex structures that protect bacteria from antibiotics and the host immune system, associated with infection persistence and recurrence.	Confer antibiotic resistance, shield bacteria from the immune system, facilitate bacterial communication and infection persistence.	[19–21]

Table 1. Cont.

Virulence Factor	Description	Role in Virulence	References
Extracellular matrix [ECM]	Composed of polysaccharides, proteins, eDNA, and lipids.	Provides antibiotic resistance, protects bacteria from the immune system.	[20,21]
Quorum sensing	Bacterial communication system.	Influences biofilm formation and development.	[22]

The morphotypes are among the factors that directly influence the virulence of this bacterium. The smooth morphotype (MaSm), rich in GPLs, is associated with the formation of more viscous biofilms and immune system evasion, while the rough morphotype (MaRg), with fewer GPLs, is more invasive and forms aggregates resistant to adverse conditions. The transition between these morphotypes reflects the bacterium's adaptation to the host environment, and the mechanisms of immune evasion are depicted in Figure 2 [14,23].

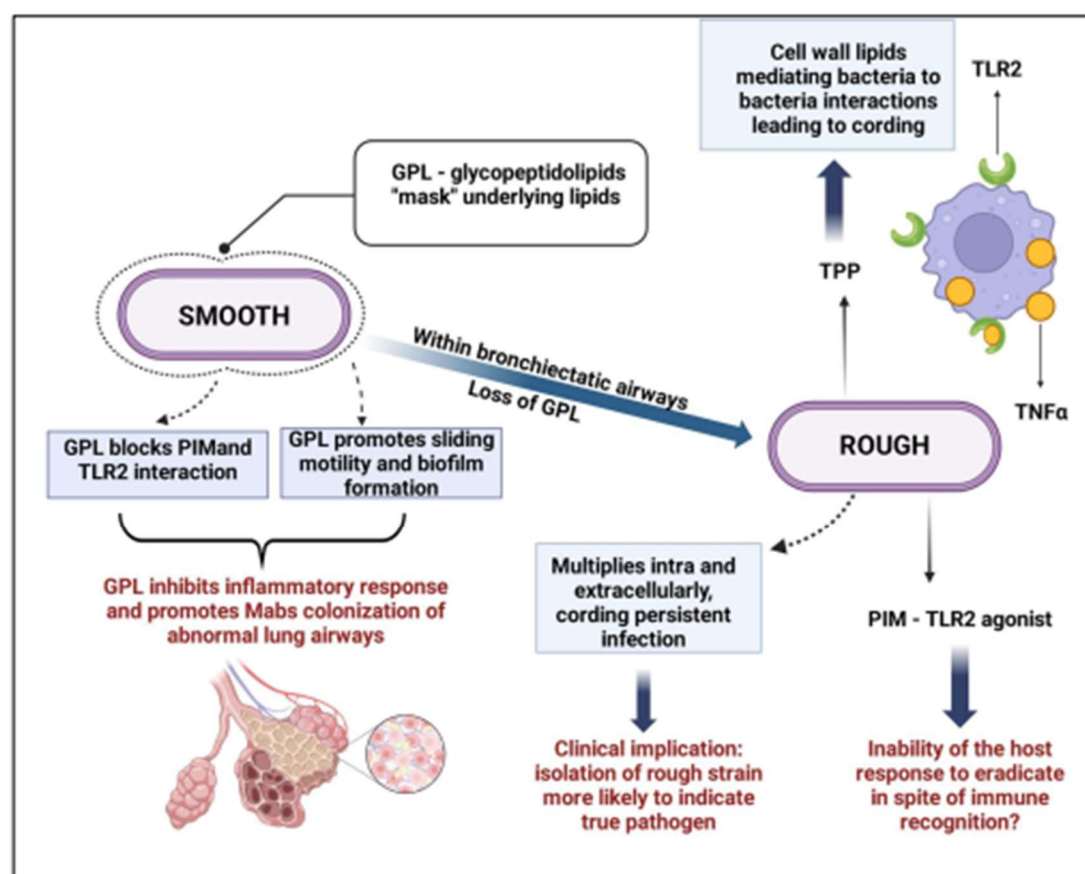


Figure 2. Mechanisms of immune evasion by *M. abscessus*. The smooth colony morphotype, expressing GPLs, "masks" immune recognition molecules such as PIMs and prevents the bacterial interaction of lipids like trehalose polyphosphates. This action facilitates pulmonary colonization. The loss of GPLs leads to recognition by TLR2, resulting in the release of pro-inflammatory cytokines. The rough morphotype, more virulent, grows in serpentine cords, inducing macrophage apoptosis to disseminate the infection. This figure was created with BioRender.com.

GPLs are key components of the cell wall, influencing biofilm formation and modulating the immune response. They inhibit the activation of immune system receptors, such as TLR2, and the production of pro-inflammatory cytokines like TNF- α , favoring infection persistence [3,5]. Another important factor is trehalose dimycolate (TDM), a glycolipid present in both morphotypes, contributing to virulence, especially in biofilms formed in the pulmonary environment of cystic fibrosis patients. In addition to GPLs and TDM, lipoarabinomannan [LAM] and surface proteins also play a role in the bacterium's pathogenicity [6,8,19].

Biofilm formation begins with the adhesion of planktonic bacteria to a surface, followed by the production of the extracellular matrix (ECM), composed of polysaccharides, proteins, eDNA, and lipids [13,14]. This matrix provides antibiotic resistance and protects the bacteria from the immune system. Bacterial communication, known as quorum sensing, and environmental factors such as the presence of nutrients, ions, and temperature influence biofilm formation and development. The biofilm progresses through different stages, with changes in the expression of genes related to metabolism and virulence [5,10,11].

The virulence of *M. abscessus* is a complex process involving the interaction of various factors, including biofilm formation, morphological variation, the production of virulence factors, and adaptation to the host environment. Understanding these mechanisms is essential for developing new therapeutic strategies that overcome resistance and eradicate the infection [20,21].

4. Biofilm Formation

The formation of biofilm by *M. abscessus* occurs in three main stages: first, adhesion, where planktonic cells attach to a surface; then aggregation and maturation, where bacteria cluster to form microcolonies and produce the ECM, maturing the biofilm [24].

The adhesion of planktonic cells to a surface is facilitated by GPLs and influenced by the hydrophobicity of the surface [24,25]. The bacteria aggregate, forming microcolonies and producing the ECM, which is composed of polysaccharides, proteins, eDNA, and lipids. This matrix acts as a protective barrier [26]. The ECM provides antibiotic resistance and impedes the immune system's action, with its composition varying to influence the biofilm's characteristics [26–28].

As the biofilm matures, it becomes more structured, with channels that allow nutrient circulation and waste removal [26,27]. Bacterial communication, known as quorum sensing, regulates gene expression and coordinates the behavior of the bacterial community [29]. The mature biofilm reaches its maximum resistance to antimicrobials [28]. In response to environmental factors or internal signals, the biofilm may disperse, releasing bacterial cells that can colonize new areas, as shown in Figure 3 [30].

Environmental factors, such as nutrient availability, oxygen presence, and pH, also influence biofilm formation [3,5,20]. To combat this resistance, various strategies can be employed, such as inhibiting bacterial adhesion, modulating GPL production, inhibiting quorum sensing, and blocking efflux pumps [31–33]. The destabilization of the ECM can be achieved with enzymes that degrade its components, such as DNases and enzymes that break down polysaccharides, or with disaggregating agents like Tween 80 [13,30,34].

Other strategies include increasing antibiotic penetration through the development of new drugs or the use of nanoparticles and modulating the immune response with immunotherapies or cytokines [31–33]. The use of liposomal antibiotics, such as liposomal amikacin and liposomal ciprofloxacin, has shown potential to penetrate biofilms and increase treatment efficacy [14,25,34]. Antimicrobial peptides can increase the sensitivity of *M. abscessus* to antibiotics in mature biofilms [34], and disruption of bacterial aggre-

gates, combined with immune response modulation, can also improve the response to antibiotics [14,30,31,34].

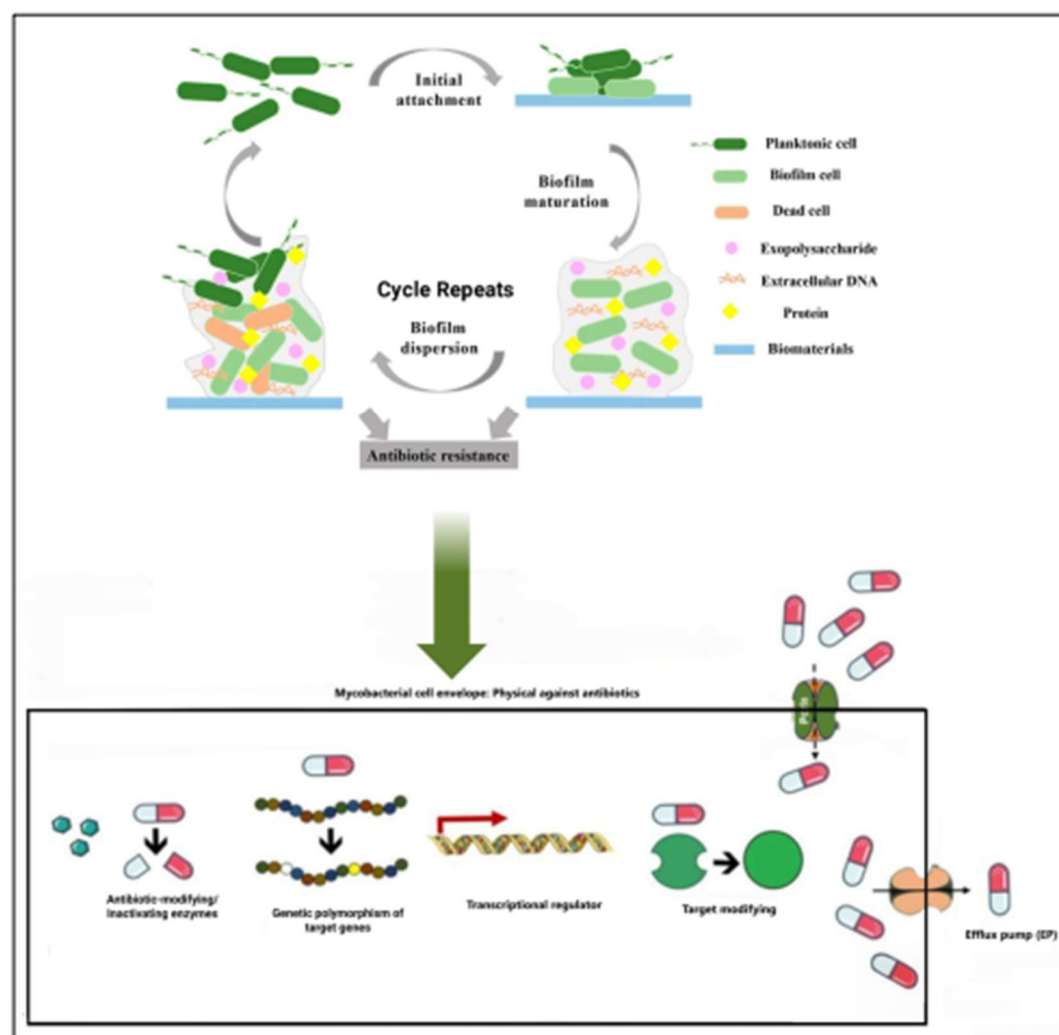


Figure 3. Schematic representation of *M. abscessus* biofilm formation and antibiotic resistance. Biofilm formation begins with the reversible attachment of planktonic cells [dark green] to a surface [blue]. The bacteria then form a monolayer and irreversibly adhere, producing an extracellular matrix. A microcolony forms, with multilayered growth appearing. In later stages, the biofilm matures. Finally, some cells begin to detach, and the biofilm disperses. The inherent resistance of *M. abscessus* subsp. *massiliense* is attributed to factors such as an impermeable and serous cell wall that acts as a physical [size exclusion] and chemical [hydrophobic] barrier, drug export systems, enzymes that modify or target drugs, and genetic polymorphisms in target genes. This figure was created with BioRender.com.

The treatment of *M. abscessus* infections requires a multidisciplinary approach, combining different strategies, such as biofilm matrix destruction, the development of new antibiotic molecules, immunomodulation, and phage therapy [3,5]. Combined therapy, which associates different strategies like using antibiotics with agents that destabilize the biofilm or phage therapy, may be more effective than using each therapy in isolation. Other approaches include the use of agents that increase oxygen concentration in the environment and beta-lactamase inhibitors [23–25,32].

Treatment strategies to combat *M. abscessus* should target immune evasion mechanisms. Biofilm disintegration, phage therapy, and the development of new antibiotics with better activity, especially in biofilms, are promising approaches. To overcome bacterial resistance, combining drugs with different mechanisms of action is essential. Furthermore, modulating the host's immune response is crucial to controlling infection by this mycobacterium [3,5].

5. Immune Response

The innate immune response to *M. abscessus* subsp. *massiliense* serves as the body's first line of defense. Cells such as macrophages and neutrophils act as phagocytes, engulfing and destroying the bacteria [11,14,15]. Macrophages can be infected by both the smooth and rough variants of *M. abscessus*, although the rough variant survives longer within these cells. Neutrophils are also critical for defense against *M. abscessus*, but the bacterium can induce a limited activation pattern in neutrophils, which promotes its survival [8]. Natural killer (NK) cells play a role by destroying infected cells, contributing to infection control [5,14].

Biofilms formed by *M. abscessus* subsp. *massiliense* pose a significant challenge to the innate immune response [13]. The extracellular matrix of the biofilm acts as a physical barrier, hindering the access of immune cells and impairing phagocytosis. Additionally, bacterial aggregation within biofilms increases tolerance to antibiotics, making infection eradication more difficult [4,5].

When the innate immune response fails to control the infection, the adaptive immune response is activated [5]. CD4+ T cells play a pivotal role in the immune response against mycobacteria, particularly in patients with cystic fibrosis. These cells produce cytokines such as interferon-gamma (IFN- γ) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α). IFN- γ activates macrophages, enhancing their bactericidal capacity, while TNF- α contributes to granuloma formation, which aims to contain the infection [4,5,18].

The Cytokines TNF and IFN- γ produced by macrophages and CD4+ T cells are required for granuloma formation and induce macrophage effector function, such as phagosomal acidification and reactive oxygen species (ROS) production, while Type I IFN production promotes nitric oxide (NO) production. IL-8 attracts neutrophils, which mediate phagocytosis, NET production, and antimicrobial peptide LL37 secretion.

However, the release of *M. abscessus* into the extracellular space as a result of cell death leads to the formation of serpentine cords, which are resistant to innate immune defenses and results in uncontrolled bacterial growth [35,36]. *M. abscessus* possesses numerous immune evasion mechanisms to resist macrophage effector functions. These include: bacterial escape from the phagosome to the cytosol by interfering with the phagosomal membrane; prolonged survival within the phagosome by blocking phagosomal acidification and thus preventing degradation; and inhibition of macrophage TLR signaling, which limits downstream immune cell activation and recruitment [5,35,36]. *M. abscessus* also persists extracellularly by avoiding phagocytosis. This is achieved through adherence to macrophage phagocytic cups and by forming serpentine cords too large for macrophage engulfment [5,35–38].

The production of IgG antibodies against *M. abscessus* is also observed in patients with cystic fibrosis. These antibodies may serve as biomarkers of infection, although their protective role against *M. abscessus* remains unclear [15,18]. The biofilm's nature likely limits the effectiveness of these antibodies. Research has demonstrated that infection by *Mycobacterium tuberculosis* and the Bacillus Calmette–Guérin (BCG0 vaccine can induce a cross-reactive memory lymphocyte response against *M. abscessus* and the *Mycobacterium avium* complex [15,39].

However, despite the complex interaction between *M. abscessus* subsp. *massiliense* and the host's immune system, the immune response is often insufficient to control the infection. This difficulty in eradicating the infection highlights the need to develop new therapeutic strategies that complement the host's immune response and assist in the elimination of the bacteria [8,11,14,18].

6. Therapeutic Strategies

The difficulty in eradicating *M. abscessus* infections due to the complex interaction between the bacteria and the immune system, as well as the bacterium's intrinsic resistance to antibiotics, primarily due to its ability to form biofilms, makes it essential to develop new therapeutic strategies that can circumvent these evasion and resistance mechanisms of the bacteria [40,41].

The innate resistance of *M. abscessus* subsp. *massiliense* is attributed to several factors, including its complex cell wall structure, efficient efflux pump systems, and the production of antibiotic-modifying enzymes [17]. The mycobacterial cell wall, rich in lipids, acts as a formidable barrier, restricting the penetration of many antibiotics. Efflux pumps, specialized membrane proteins, actively expel antibiotics that manage to penetrate the cell, reducing their intracellular concentration and effectiveness. Additionally, the bacterium produces enzymes that chemically modify antibiotics, neutralizing their activity [13,14].

The ability of *M. abscessus* to form biofilms compromises the effectiveness of treatment for this infection, requiring strategies aimed at breaking this protective barrier and enhancing the efficacy of antibiotics [19,37,38]. Several approaches show promise in this regard. Enzymes that degrade the components of the extracellular matrix, such as polysaccharides, proteins, and DNA, can destabilize the biofilm, exposing the bacteria to antimicrobials. Detergents, like Tween 80, have also shown the ability to disrupt biofilms, facilitating the action of antibiotics [24,29,30].

Another innovative targeted strategy is the use of iron chelators, which aim to sequester iron and modulate the environment, limiting the growth of the mycobacteria [41–43]. Genetic editing and nanotechnology are examples of advanced therapeutic approaches. Genetic editing can be used to silence genes that promote biofilm formation, while nanotechnology delivers drugs directly to the site of infection [2,44].

The development of new drugs with greater penetration ability into the extracellular matrix is essential for effective treatment of *M. abscessus* subsp. *massiliense* infections [4,6,45]. These drugs should have characteristics that favor their diffusion through the matrix, such as higher liposolubility and lower molecular weight, enabling them to reach the bacteria protected within the biofilm [46].

Combined therapy, using agents that destabilize the biofilm structure alongside traditional antibiotics, emerges as a promising approach to eradicate these infections. By combining different mechanisms of action, this strategy aims to overcome the challenges posed by biofilms and enhance treatment efficacy [45–47].

The standard treatment for pulmonary infections caused by *M. abscessus* subsp. *massiliense* involves a prolonged regimen of multiple antibiotics, lasting 12 to 24 months [10,11,45,47]. Typical antibiotic combinations include macrolides [clarithromycin or azithromycin], aminoglycosides [amikacin], and other agents such as rifampicin, ethambutol, imipenem, cefoxitin, and linezolid. The specific choice of antibiotics is guided by susceptibility testing of the isolate and the patient's clinical condition. However, these therapies often yield limited efficacy, with low success rates, particularly in biofilm-associated infections [5,18].

Given the challenges posed by antibiotic resistance and biofilm formation, new therapeutic strategies are being explored. Efforts to identify new antibiotics with enhanced activity against *M. abscessus* subsp. *massiliense*, especially those capable of penetrating

biofilms, are underway [10]. NF1001, a novel thiopeptide antibiotic, has demonstrated potent activity against both planktonic forms and biofilms of *M. abscessus* subsp. *massiliense*. Additionally, gold-complexed sulfadiazine has shown promise in reducing biofilm formation by inhibiting c-di-GMP synthesis, a signaling molecule essential for biofilm development [10,13,17].

Monoclonal antibodies targeting essential biofilm components, such as DNABII proteins, can destabilize biofilm structure, exposing bacteria to antibiotics and the host immune system. Studies with the humanized monoclonal antibody HuTipMab have shown promising results, enhancing the susceptibility of *M. abscessus* subsp. *massiliense* to amikacin and azithromycin [11].

Disrupting bacterial communication systems, known as quorum sensing, can inhibit biofilm formation or make it more susceptible to antibiotics. While this approach shows promise for controlling biofilm-related infections, it remains in early development [13,17]. Similarly, enzymes that degrade the extracellular matrix of biofilms can dismantle their structure, rendering bacteria more vulnerable to antibiotics and the host immune response [10]. Modulating the host immune response to enhance T-cell activity and pro-inflammatory cytokine production may also improve the body's ability to combat *M. abscessus* subsp. *massiliense* [11].

Finally, bacteriophages—viruses that infect and destroy bacteria—emerge as a promising alternative to antibiotics, particularly for treating infections caused by multidrug-resistant strains [5]. The infections caused by *M. abscessus* subsp. *massiliense* are significant therapeutic challenges. The bacterium's intrinsic resistance to multiple antibiotics, its ability to form biofilms, and its adaptation to the hostile pulmonary environment contribute to the difficulty in treating these infections.

6.1. Conventional Approaches

The standard treatment for pulmonary infections caused by *M. abscessus* subsp. *massiliense* typically involves a combination of intravenous and oral antibiotics administered over an extended duration, ranging from months to years. Antibiotic selection is guided by in vitro susceptibility testing, though the correlation between these test results and clinical response is often weak [47,48]. A summary of commonly used antibiotics is presented in Table 2.

The selection of antibiotics to treat infections caused by mycobacteria should always be based on in vitro susceptibility tests, which indicate which drugs are most effective against the specific bacterium [22]. Treatment is generally long term, lasting months or even years, and the combination of different antibiotics is essential to prevent the bacteria from developing resistance to the medications. It is critical to monitor the side effects of antibiotics, especially during prolonged treatments [46,49].

The guidelines from the American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America (ATS/IDSA) in 2007 and the British Thoracic Society (BTS) in 2017 recommend a minimum of 12 months of treatment following culture conversion. This means that treatment should continue for at least one year after sputum culture test results become negative [11].

Traditional antibiotic treatment for *M. abscessus* subsp. *massiliense* infections faces several challenges [41]. Success rates are low, ranging from 10% to 55%, and the bacteria can persist in the lungs even after treatment [3,22,23]. Furthermore, prolonged use of high-dose antibiotics causes side effects such as bone marrow problems, liver issues, and allergic reactions [2,21]. While the host immune response is essential for controlling infections, it is often ineffective against bacteria within biofilms. These biofilms shield bacteria from immune cells and antimicrobial agents, making infections difficult to eradicate [24].

Table 2. Classes of antibiotics for the treatment of *M. abscessus* subsp. *massiliense* infections.

Antibiotic Class	Medication	Route of Administration	Recommended Dose in Adults BTS, 2017 * (90)	Observations
Macrolides	Clarithromycin	Oral	500 mg BID	Frequently used in infections caused by <i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> , which is generally sensitive to this antibiotic class [9,10].
Aminoglycosides	Amikacin	Intravenous	10–15 mg/kg QD	Commonly included in therapeutic regimens. Can also be administered via inhalation [Liposomal Amikacin for Inhalation] [3].
Beta-lactams	Cefoxitin	Intravenous	12 g daily in divided doses	Used in combination with other agents. Cefoxitin is one of the two beta-lactams commonly used to treat <i>M. abscessus</i> infections, along with imipenem [9,10].
Other	Linezolid	Oral	600 mg QD or BID	Used depending on the strain's sensitivity profile and the patient's tolerance [25].
	Clofazimine	Oral	50–100 mg QD	Used depending on the strain's sensitivity profile and the patient's tolerance [2].
	Quinolones	Oral	1 mg/kg QD	Occasionally used, depending on the strain's sensitivity profile and the patient's tolerance. Ciprofloxacin is a commonly used quinolone [22].

* BTS: British Thoracic Society; BID: twice daily; QD: once daily.

6.2. Emerging Therapeutic Strategies

The search for new therapeutic strategies for *M. abscessus* subsp. *massiliense* infections has intensified, driven by the limitations of conventional antibiotic therapy. This urgent need for therapeutic alternatives is highlighted by the analysis of strategies reported annually between 2000 and 2025, as shown in Figure 4.

The data, compiled from searches in databases such as Scopus, Web of Science (WOS), CINAHL, EMBASE, WHO, and Pubmed/Medline, reveal a significant increase in the number of strategies reported in 2024, contrasting with the absence of records in certain years between 2000, 2001, and 2003 to 2010. This temporal disparity highlights the growing scientific interest in developing new approaches to combat this challenging pathogen, emphasizing the importance of ongoing research to expand the therapeutic arsenal against *M. abscessus* subsp. *massiliense* infections.

Research into new therapeutic strategies, such as new antibiotics, antiparasitic agents, phage therapy, immunotherapy, biofilm-targeted approaches, enzymes, gene editing and nanotechnology (Table 3), is essential to improving the prognosis of patients infected with this bacterium [5,20,31]. Combining different therapeutic approaches, such as antibiotics with phage therapy, may help overcome drug resistance and persistent infections, which are major challenges in treating *M. abscessus* [6,23].

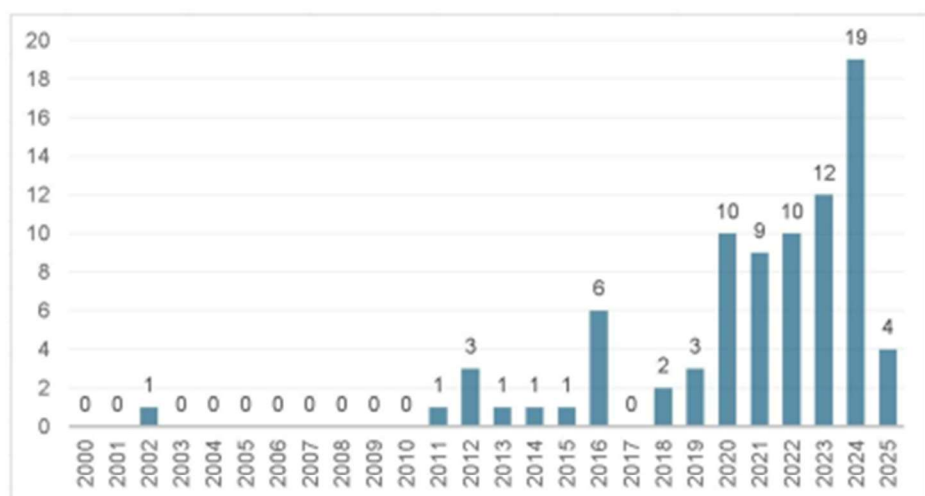


Figure 4. Number of annual publications from 2000 to 2025 on new therapeutic strategies for *M. abscessus* infections.

Table 3. New therapeutic approaches for *M. abscessus* infections.

Therapeutic Approach	Description	Observations	References
New antibiotics	Bedaquiline: Inhibits mycobacterial ATP synthase. Tedizolid: Oxazolidinone antibiotic with activity against various non-tuberculous mycobacteria. Tiopetide (NF10011): produced by <i>Streptomyces</i> sp.	Bedaquiline has been approved for the treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. Tedizolid has demonstrated in vitro activity against <i>M. abscessus</i> . NF1001 exhibits activity against both planktonic forms (free cells) and biofilms of NTM, showing a reduction in bacterial load.	[8,10,12,14,17,34]
Antiparasitic agent	Bithionol: This antiparasitic agent has shown significant antimicrobial activity against <i>M. abscessus</i> , including the ability to eliminate biofilms.	Bithionol's biofilm-eradicating efficacy is notable, achieving up to 99.9% elimination of biofilm bacteria at appropriate concentrations.	[48,50]
Phage therapy	Use of bacteriophages to infect and destroy <i>M. abscessus</i> bacteria.	Phages may be used in combination with antibiotics. Case studies have reported promising results in treating <i>M. abscessus</i> infections.	[2,37,40]
Bacteriophage	Modulation of the host immune response to enhance the ability to combat <i>M. abscessus</i> infection.	Research in this area is still preliminary. Potential strategies include the use of cytokines or other immunomodulatory molecules.	[5,10,40,41]

Table 3. Cont.

Therapeutic Approach	Description	Observations	References
Beta-lactamase inhibitors	Avibactam: Inhibits the beta-lactamase Bla _{Mab} , which is responsible for beta-lactam resistance in <i>M. abscessus</i> .	Adding avibactam to therapeutic regimens containing beta-lactams may improve their efficacy.	[23–25,48]
Biofilm-targeted approaches	Strategies to inhibit biofilm formation, disperse existing biofilms, or increase the susceptibility of bacteria in biofilms to antibiotics.	Tween 80: A detergent that can disaggregate <i>M. abscessus</i> biofilms, making the bacteria more susceptible to antibiotics. Oxygenation: Increasing oxygen availability can enhance the activity of some antibiotics against <i>M. abscessus</i> . Iron chelator: The bacteria have mechanisms to survive in environments with low iron levels.	[6,20,29,41–44]
Enzymes	Enzymes that degrade the components of the extracellular matrix of the <i>M. abscessus</i> biofilm.	Enzymes with degradative potential include phospholipases, carbohydrases, proteases, and DNases.	[11,34,46,47,51,52]
Genetic editing and nanotechnology	Genetic editing and nanotechnology emerge as promising tools in the fight against <i>M. abscessus</i> infections.	Genetic editing allows for the manipulation of genes essential to the bacteria's virulence and resistance, while nanotechnology provides solutions for drug delivery, biofilm destabilization, and infection monitoring.	[51,53]

Bedaquiline and tedizolid emerge as alternatives in the treatment of *M. abscessus* infections [12,14,17,34]. Initially approved for multidrug-resistant tuberculosis, bedaquiline inhibits bacterial energy production, proving effective against *M. abscessus*, including resistant strains. Studies indicate that its combination with amikacin and rifabutin may be bactericidal, acting on dormant forms and biofilms. However, bedaquiline has limitations in inhibiting biofilm formation, particularly in rough morphotypes [17,34].

Tedizolid, an antibiotic in the oxazolidinone class, inhibits bacterial protein synthesis. Although it exhibits in vitro activity against *M. abscessus*, its clinical efficacy still requires further study. Data suggest that its monotherapy may be insufficient to eradicate the bacterium [17,34].

Both drugs are frequently used in combination with other antibiotics to enhance efficacy and combat resistance. The use of drugs already approved for other indications, such as bedaquiline and tedizolid, accelerates the discovery of new therapies [10,12,14,17,34]. Given the variability in response among *M. abscessus* subsp. *massiliense*, a personalized approach based on susceptibility testing is necessary [33–35].

NF1001, a novel thiol peptide antibiotic derived from an Antarctic soil sample, demonstrates a broad spectrum of activity against NTM, including *M. abscessus* (Mabs). It acts

against both planktonic forms and biofilms, including multi-drug-resistant strains [34]. NF1001 exhibits concentration-dependent activity, with minimum inhibitory concentrations (MICs) ranging from 0.06 to 2 µg/mL for various NTM species [8,10,14,34].

In Mabs biofilms, NF1001 reduces bacterial load, with results comparable to azithromycin. Its activity in biofilms is similar to amikacin. NF1001 also demonstrates intracellular efficacy against NTMs in macrophages. Synergy studies show that NF1001 works in combination with commonly used NTM antibiotics, such as amikacin, clarithromycin, and moxifloxacin [34]. Its mechanism of action appears distinct from traditional protein synthesis inhibitors, possibly interfering with ribosomal protein synthesis. Toxicity studies indicate a promising safety profile for NF1001, which also shows good intracellular penetration [8,10,12,14,17].

Another therapeutic approach that demonstrates biofilm elimination capability is bithionol, an antiparasitic drug that emerges as a promising alternative [8,12,14,17]. Studies show its potent antimicrobial activity against *M. abscessus*, with minimum inhibitory concentrations (MICs) ranging from 0.625 µM to 2.5 µM and proven bactericidal action.

Bithionol exhibits a remarkable ability to eliminate *M. abscessus* biofilms, eradicating bacteria at concentrations of 128 µg/mL [50,51,54]. This property distinguishes it from conventional antibiotics, such as clarithromycin, amikacin, and moxifloxacin, which show low efficacy against biofilms. The mechanism of action of bithionol involves changes in cell morphology and bacterial lysis [11,35,48].

Phage therapy emerges as a promising alternative for treating *M. abscessus* infections. Phages, viruses that infect bacteria, offer high specificity to *M. abscessus*, minimizing damage to the patient's microbiota [10,51,55]. These viruses destroy bacteria through cell lysis, acting even in biofilms, where conventional antibiotics struggle to penetrate. Additionally, they exhibit immunomodulatory potential, beneficial in pulmonary diseases [10].

Despite its potential, phage therapy faces challenges such as bacterial resistance development and interference from temperate phages that integrate into the host bacterium's genome [56]. To overcome these obstacles, researchers are exploring the use of phage cocktails with different mechanisms of action. Administration may be performed via inhalation for pulmonary infections, intravenously for systemic infections, and topically for skin infections. Encapsulation in liposomes enhances therapy effectiveness [56,57].

The combination of phages with antibiotics shows promise, creating synergy and facilitating drug action. Success cases with genetically modified phages illustrate the potential of this therapy [40,42]. While still in its early stages, preclinical research using animal models and reports of compassionate use indicate positive results. The search for new phages, genomic analysis, and in vitro and in vivo studies are crucial for advancing phage therapy. Combined with other strategies, phage therapy appears to be an option in the treatment of *M. abscessus* infections, particularly in cases of multidrug resistance [42–44,58,59].

Another significant therapeutic approach is host-directed immunotherapy, which emerges as a promising strategy to modulate the immune system and combat infection [1,13]. This approach aims to strengthen the body's natural defenses, complementing or replacing traditional antimicrobial therapies [51,52].

One of the main challenges in *M. abscessus* infections is inadequate immune response, exacerbated by biofilm formation that protects the bacteria [5,10,41,45]. Dysregulated inflammatory responses can cause damage to lung tissues [47]. Immunotherapy aims to activate host defense mechanisms to eliminate the bacterium, including in biofilms. This can be achieved by activating antioxidant pathways, modulating immune cell activity such as neutrophils and macrophages, and controlling inflammatory cytokine production [45–47].

Biofilm disruption is essential for the success of immunotherapy, as it facilitates the action of immune cells and antibiotics [5,45,47]. Studies with immune checkpoint

inhibitors and activators of the antioxidant NQO1 pathway show promising results. Human airway organoid models and co-cultures of *M. abscessus* with immune cells allow for the investigation of host-pathogen interactions and the evaluation of new therapies [11].

GPLs on the surface of *M. abscessus* mask the underlying phosphatidylmyo-inositol mannosides in the cell wall, preventing interaction with TLR2 (Toll-like receptor 2) and consequently inhibiting TNF- α induction in macrophages. Spontaneous loss of GPLs in rough variants may lead to a more intense immune response, with increased inflammation [48,50,54].

The structure of lipoarabinomannan (LAM), a lipoglycan present in the cell wall, also influences the interaction with TLR2 and the inflammatory response [54]. Mutations in the *embC* gene, which codes for an arabinosyl transferase involved in LAM synthesis, may lead to changes in LAM structure and modify TLR2 activation, as well as affect cord and biofilm formation [48,50,51,54].

Although *M. abscessus* can induce the production of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6, the inflammatory response can be regulated to prevent pathogen elimination and, in some cases, promote infection persistence [4,5,18,48]. The ability to form cords [cord-like structures] and biofilms is associated with evasion of phagocytosis, promoting extracellular growth and infection persistence [48,50,54].

M. abscessus uses a combination of mechanisms to evade the immune response, including biofilm formation, modulation of the inflammatory response, and the ability to survive inside macrophages [52]. Combining immunotherapy with antibiotics and biofilm-disrupting therapies enhances the antibacterial response. Despite progress, immunotherapy for *M. abscessus* is still under development. Further research is needed to identify optimal therapeutic targets and understand the bacterium's immune evasion mechanisms [10,52,57].

Another promising approach is avibactam, a β -lactamase inhibitor, which serves as a solution to restore the efficacy of antibiotics [23–25,27]. The β -lactamase BlaMab, produced by *M. abscessus*, inactivates β -lactam antibiotics, rendering them ineffective. Avibactam inhibits BlaMab, allowing antibiotics to regain activity against the bacterium. In vitro and in vivo studies demonstrate that combining avibactam with imipenem significantly enhances antibacterial activity against *M. abscessus* [56,57]. In animal models, this combination reduces bacterial load and improves treatment outcomes [57].

Resistance to β -lactams is a challenge in treating *M. abscessus* infections, and avibactam offers a new strategy to overcome this problem [27]. The combination of avibactam with imipenem shows promise, with potential to improve the treatment of these infections. It is important to note that avibactam has no intrinsic antimicrobial activity, acting specifically as an inhibitor of BlaMab [23–25,27].

Although the results are promising, more research is needed to determine the best clinical use of avibactam, including dosage optimization and combinations with other antibiotics [17,34]. Avibactam represents a significant advancement in treating *M. abscessus* infections, restoring the activity of β -lactam antibiotics and paving the way for new therapeutic strategies [25,55].

Therapeutic approaches targeting biofilms are also promising strategies in treating *M. abscessus* infections. These approaches focus on disrupting the biofilm structure and increasing bacterial susceptibility to antimicrobial agents. Three promising approaches are the use of the detergent Tween 80, increased oxygenation, and iron chelation [2,3,17,29,60].

Tween 80 works by disaggregating *M. abscessus* biofilms, breaking down the extracellular matrix and facilitating antibiotic access to the bacteria [13]. Furthermore, Tween 80 enhances aerobic respiration and bacterial growth, making them more susceptible to antibiotics that target metabolically active bacteria [29,40].

Oxygenation also plays a crucial role in combating *M. abscessus*. Under low oxygen conditions, the bacterium enters a dormant state, reducing its susceptibility to antibiotics [8,10,14]. Increasing oxygen levels stimulates bacterial metabolism and enhances the action of antibiotics such as amikacin [42,59].

Combining Tween 80 and oxygenation may have a synergistic effect in treatment. Biofilm disaggregation by Tween 80 allows oxygen to penetrate deeper layers of the structure, increasing antibiotic efficacy [17,34]. This combination represents a promising strategy for developing more effective therapies against *M. abscessus* infections [60,61].

Iron chelation therapy has emerged as an innovative approach in the fight against bacterial infections, particularly against multidrug-resistant bacteria such as *M. abscessus* [6,41–43]. This strategy works by sequestering iron, a critical element for bacterial metabolism, indirectly modulating the host environment to limit bacterial growth and enhance susceptibility to antibiotics [41].

Iron chelators, such as deferoxamine, bind to available iron in the body, making it inaccessible to bacteria [42,43]. This iron deprivation disrupts various bacterial processes, including biofilm formation—structures that contribute to antibiotic resistance. By interfering with biofilm formation, iron chelators potentiate the action of antibiotics and facilitate infection eradication [41–43].

Iron chelation therapy offers several advantages. Since it targets the host rather than the bacteria, it reduces the risk of resistance development [41,42]. Additionally, it can modulate the immune response, reducing inflammation and promoting bacterial clearance [43]. It is especially effective against persistent bacteria, which enter a dormant state and become tolerant to conventional antibiotics [60,61].

Combining iron chelators with traditional antibiotics, biofilm-disrupting agents, and other host-directed therapies, such as immunomodulators, can increase treatment efficacy [41]. However, challenges remain, including the potential for resistance to chelators, host toxicity, and the drug's bioavailability at the site of infection [60,61].

The ECM of *M. abscessus* biofilms acts as a protective barrier, hindering antibiotic penetration and immune system action [9,10,55,61]. Enzymes capable of degrading the ECM present a promising alternative for treating these persistent infections [9].

Studies show that various enzymes target specific ECM components [52]. Phospholipases, for example, promote biofilm dispersion by degrading phospholipids in the matrix [46]. Carbohydrases, such as α -mannosidase and cellulase, break down specific carbohydrates, while proteases, such as proteinase K, degrade proteins in the ECM [19,31,60]. The activity of these enzymes depends on the culture medium and environmental conditions, suggesting that the ECM's composition is influenced by these factors [6,7].

The ECM of *M. abscessus* consists of lipids, carbohydrates, proteins, and extracellular DNA (eDNA) [5,7,47]. The proportion of each component varies, with lipids being the most abundant, followed by eDNA. This complex and variable composition explains the differential response to enzymatic treatments [47].

The degradation of the ECM by enzymes can increase the susceptibility of *M. abscessus* to antibiotics, facilitating their penetration and action. Combining enzymes with antibiotics or other therapeutic agents, such as DNase to degrade extracellular DNA (eDNA), can potentiate treatment effectiveness [47,48,50]. Moreover, the enzyme-induced biofilm dispersion may enhance the efficacy of other therapies, such as oxygenation, which boosts bacterial metabolism and antibiotic susceptibility [3,34].

It is important to note that the effectiveness of enzymes varies depending on environmental conditions and the maturation stage of the biofilm. Additionally, bacteria may develop resistance to these treatments [39,45,61]. The development of new approaches and the combination of different strategies are essential for combating persistent *M. abscessus*.

infections [19,40]. Enzymatic degradation of the ECM is a promising strategy for treating *M. abscessus* infections. Identifying specific enzymes and combining them with other therapies may be key to overcoming bacterial resistance and improving clinical outcomes [2,41,46].

Genetic editing allows for silencing genes essential for biofilm formation and bacterial virulence. The Tet-OFF system, for example, controls the expression of specific genes, paving the way for the development of new therapies [57]. Studies involving the *mmpL3* gene, which is involved in cell wall biosynthesis and the transport of TDM, have shown that its inactivation reduces biofilm formation and bacterial virulence [58].

Genetic editing can also be used to silence antibiotic resistance genes and genes involved in the synthesis of GPLs, which are critical for adhesion and biofilm formation [58]. Furthermore, this technology helps investigate resistance mechanisms, aiding in the search for new therapeutic strategies [39,45].

Nanotechnology offers tools for targeted drug delivery, such as nanoparticles that encapsulate antibiotics and facilitate their penetration into the biofilm's extracellular matrix [3,4]. Liposomes containing antibiotics have proven effective in reducing bacterial load in biofilms, and inhalation of liposomal amikacin improves drug penetration into the biofilm [47,59].

Nanoparticles can also be designed to destabilize biofilm structures, targeting specific ECM components like eDNA [47,49,53]. Additionally, nanotechnology enables the development of new antimicrobial materials, such as silver nanoparticles, which can be incorporated into medical devices to prevent biofilm formation. Nanomaterials may also be used in sensors to monitor infection progression and treatment efficacy [53].

The combination of genetic editing with nanotechnology expands therapeutic possibilities [2,54]. Genetic editing can silence genes that promote biofilm formation, while nanotechnology delivers drugs directly to the site of infection. This combined approach, along with genetic data from the patient, paves the way for personalized therapies that are more effective and have fewer side effects [2,54,61].

The pursuit of new therapeutic strategies to combat *M. abscessus* is crucial to overcoming the challenges posed by bacterial resistance and improving patient prognosis. Continued investment in research and innovation in new therapies is essential for advancing the treatment of this challenging infection.

7. Conclusions and Future Perspectives

M. abscessus subsp. *massiliense* infections present a growing challenge to public health, particularly for immunocompromised individuals. The bacterium's ability to form biofilms, complex structures that house bacterial communities, is crucial for its pathogenicity and resistance to treatment.

Biofilms act as protective barriers against antibiotics and the host's immune response, making infections caused by *M. abscessus* subsp. *massiliense* notoriously difficult to treat. The complex biofilm structure, the bacterium's intrinsic resistance to antibiotics, and its ability to adapt to the hostile environment of the host's lungs contribute to the difficulty of eradicating the infection. Biofilm formation is influenced by various factors, including the presence of lipoglycopeptides (LGPs) in the bacterial cell wall, the quorum sensing communication system, and environmental conditions such as nutrient and oxygen availability. Although the host's immune response is crucial for controlling infections, it is often ineffective against bacteria within biofilms. These biofilms shield bacteria from immune cells and antimicrobial agents, making infection eradication challenging.

The combination of different approaches, such as the use of antibiotics, appears promising in overcoming drug resistance and infection persistence. Continued research and the development of new therapeutic strategies for treating *M. abscessus* subsp. *massiliense*

infections are essential, including the investigation of novel combination therapies, host-directed therapies, and effective immunotherapies.

Author Contributions: E.M.d.S. and R.C.C., conceptualization. R.L.d.S.L., F.A.B.N., R.d.F.P.d.C.C., D.R.M.F., P.L.B.T.R., C.C.S.d.A., E.C.M.G., R.L.C.B., C.E.C.N., F.D.O.N., M.C.P.M., C.D.L.C., C.G.M., A.Z., L.C.N.S., R.M.R., A.P.S.d.A.d.S., R.C.C. and E.M.d.S., data curation, investigation, formal analysis, methodology. R.L.d.S.L., F.A.B.N., A.Z., L.C.N.S., R.M.R., A.P.S.d.A.d.S., R.C.C. and E.M.d.S., writing—original draft preparation. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) under grant numbers FAPEMA: BEPP-02457/23, and Universal-06536/22; Ceuma University (UNICEUMA); CNPq Nº 316605/2024-9; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Cao, D.; Yuan, X.; Jiang, X.; Wu, T.; Xiang, Y.; Ji, Z.; Liu, J.; Dong, X.; Bi, K.; Tenjum, T.; et al. Antimicrobial and Antibiofilm Effects of Bithionol against *Mycobacterium abscessus*. *Antibiotics* **2024**, *13*, 529. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Lanni, A.; Borroni, E.; Iacobino, A.; Russo, C.; Gentile, L.; Fattorini, L.; Giannoni, F. Activity of Drug Combinations against *Mycobacterium abscessus* Grown in Aerobic and Hypoxic Conditions. *Microorganisms* **2022**, *10*, 1421. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kolpen, M.; Jensen, P.O.; Qvist, T.; Kragh, K.N.; Ravnholt, C.; Fritz, B.G.; Johansen, U.R.; Bjarnsholt, T.; Hoiby, N. Biofilms of *Mycobacterium abscessus* Complex Can Be Sensitized to Antibiotics by Disaggregation and Oxygenation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *64*, e01212-19. [\[CrossRef\]](#)
- De, K.; Belardinelli, J.M.; Pandurangan, A.P.; Ehaneta, T.; Lian, E.; Palčeková, Z.; Lam, H.; Gonzalez-Juarrero, M.; Bryant, J.M.; Blundell, T.L.; et al. Lipoarabinomannan modification as a source of phenotypic heterogeneity in host-adapted *Mycobacterium abscessus* isolates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2024**, *121*, e2403206121. [\[CrossRef\]](#)
- Mauch, R.M.; Jensen, P.O.; Qvist, T.; Kolpen, M.; Moser, C.; Pressler, T.; da Silva, M.T.N.; Hoiby, N. Adaptive Immune Response to *Mycobacterium abscessus* Complex (MABSC) in Cystic Fibrosis and the Implications of Cross-Reactivity. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 858398. [\[CrossRef\]](#)
- Vang, C.K.; Dawrs, S.N.; Oberlag, N.M.; Gilmore, A.E.; Hasan, N.A.; Honda, J.R. Comparative survival of environmental and clinical *Mycobacterium abscessus* isolates in a variety of diverse host cells. *J. Appl. Microbiol.* **2022**, *132*, 3302–3314. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hunt-Serracin, A.C.; Parks, B.J.; Boll, J.; Boutte, C.C. *Mycobacterium abscessus* Cells Have Altered Antibiotic Tolerance and Surface Glycolipids in Artificial Cystic Fibrosis Sputum Medium. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e02488-18. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- López-Medrano, R.; Retuerto-Guerrero, M.; Blanco-Conde, S.; Morán-Fernández, M.B.; Rivero-Lezcano, O.M. Formation of *Mycobacterium abscessus* colonies in cellular culture in an in vitro infection model. *MethodsX* **2024**, *12*, 102667. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Tseng, C.Y.; Sun, M.F.; Li, T.C.; Lin, C.T. Effect of *Coptis chinensis* on Biofilm Formation and Antibiotic Susceptibility in *Mycobacterium abscessus*. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2020**, *2020*, 9754357. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kaur, P.; Krishnamurthy, R.V.; Shandil, R.K.; Mohan, R.; Narayanan, S. A Novel Inhibitor against the Biofilms of Non-Tuberculous *Mycobacteria*. *Pathogens* **2024**, *13*, 40. [\[CrossRef\]](#)
- Kurbatinski, N.; Hill, P.J.; Tobin, N.; Kramer, C.N.; Wickham, J.; Goodman, S.D.; Hall-Stoodley, L.; Bakaletz, L.O. Disruption of nontuberculous mycobacteria biofilms induces a highly vulnerable to antibiotic killing phenotype. *Biofilm* **2023**, *6*, 100166. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Gutiérrez, A.V.; Viljoen, A.; Ghigo, E.; Herrmann, J.L.; Kremer, L. Glycopeptidolipids, a double-edged sword of the *Mycobacterium abscessus* complex. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1145. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Clary, G.; Sasindran, S.J.; Nesbitt, N.; Mason, L.; Cole, S.; Azad, A.; McCoy, K.; Schlesinger, L.S.; Hall-Stoodley, L. *Mycobacterium abscessus* Smooth and Rough Morphotypes Form Antimicrobial-Tolerant Biofilm Phenotypes but Are Killed by Acetic Acid [Internet]. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e01782-17. [\[CrossRef\]](#)
- Gloag, E.S.; Wozniak, D.J.; Stoodley, P.; Hall-Stoodley, L. *Mycobacterium abscessus* biofilms have viscoelastic properties which may contribute to their recalcitrance in chronic pulmonary. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 5020. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hilpert, K.; Munshi, T.; López-Pérez, P.M.; Sequeira-García, J.; Hofmann, S.; Bull, T.J. Discovery of Antimicrobial Peptides That Can Accelerate Culture Diagnostics of Slow-Growing *Mycobacteria* Including *Mycobacterium tuberculosis*. *Microorganisms* **2023**, *11*, 2225. [\[CrossRef\]](#)

16. Idosa, A.W.; Wozniak, D.J.; Hall-Stoodley, L. Surface Dependent Inhibition of *Mycobacterium abscessus* by Diverse *Pseudomonas aeruginosa* Strains. *Microbiol. Spectr.* **2022**, *10*, e0247122. [\[CrossRef\]](#)
17. Bonez, P.C.; Agertt, V.A.; Rossi, G.G.; Siqueira, F.d.S.; Siqueira, J.D.; Marques, L.L.; de Oliveira, G.N.M.; Santos, R.C.V.; de Campos, M.M.A. Sulfonamides complexed with metals as mycobacterial biofilms inhibitors. *J. Clin. Tuberc. Other Mycobact. Dis.* **2021**, *23*, 100217. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Roux, A.L.; Viljoen, A.; Ban, A.; Simeone, R.; Bernut, A.; Laencina, L.; Dermaudt, T.; Rottman, M.; Gaillard, J.L.; Majlessi, L.; et al. *Mycobacterium abscessus* smooth and rough variants differentially modulate the TLR2-dependent TNF production in macrophages. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0166265. [\[CrossRef\]](#)
19. Guerrero-Bustamante, C.A.; Gengenbacher, M. Host-directed therapies for *Mycobacterium abscessus* infections: Targeting the Achilles' heel. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 867315. [\[CrossRef\]](#)
20. Halloum, I.; Carrère-Kremer, S.; Blaise, M.; Viljoen, A.; Bernut, A.; Moigne, V.; Vilchère, C.; Guérardel, Y.; Luftalla, G.; Hermann, J.L.; et al. Deletion of a single gene encoding a putative arabinosyltransferase abolishes cord formation and virulence of *Mycobacterium abscessus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 8807–8812.
21. Owens, B.R.; Filloux, A. New anti-biofilm approaches for *Mycobacterium abscessus* lung disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2019**, *47*, 101–106.
22. Esteban, J.; García-Coca, M. *Mycobacterium abscessus* biofilms. *Front. Microbiol.* **2018**, *8*, 2651. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Degiacomi, G.; Sammartino, J.C.; Chiarelli, L.R.; Riabova, O.; Makarov, V.; Pasca, M.R. *Mycobacterium abscessus*, an emerging and worrisome pathogen among cystic fibrosis patients. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5868. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Johansen, M.D.; Herrmann, J.L.; Kremer, L. Non-tuberculous mycobacteria and the rise of *Mycobacterium abscessus*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18*, 392–407. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Viljoen, A.; Lemmer, Y.; Beyers, N. Cystic fibrosis: A battleground for *Mycobacterium abscessus* persistence. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1906.
26. Kidd, T.J.; Floto, R.A. *Mycobacterium abscessus* lung disease. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2018**, *31*, 157–163.
27. Bryant, J.M.; Grogono, D.M.; Rodriguez-Rincon, D.; Karen, I.E.; Everall, I.; Moreno, P.; Verma, D.; Hill, E.; Drijckoningen, J.; Gilligan, P.; et al. Emergence and spread of a human-transmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium. *Science* **2016**, *354*, 751–757. [\[CrossRef\]](#)
28. Faboro, T.; Daniel, J. Biofilm formation and polar lipid biosynthesis in *Mycobacterium abscessus* are inhibited by naphthyl-methylpiperazine. *PLoS ONE* **2024**, *19*, e0311669. [\[CrossRef\]](#)
29. Yang, J.; Yu, H.H.; Rose, S.J.; Bai, X.; Lee, R.E.; Barry, C.E. Tween 80 potentiates the in vitro activity of antibiotics against *Mycobacterium abscessus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2016**, *71*, 3264–3267.
30. Ferrell, K.C.; Johansen, M.D.; Triccas, J.A.; Counoupas, C. Virulence Mechanisms of *Mycobacterium abscessus*: Current Knowledge and Implications for Vaccine Design. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 842017. [\[CrossRef\]](#)
31. Aung, T.T.; Yam, J.K.; Lin, S.; Salleh, S.M.; Givskov, M.; Liu, S.; Lwin, N.C.; Yang, L.; Beuerman, R.W. Biofilms of Pathogenic Nontuberculous Mycobacteria Targeted by New Therapeutic Approaches. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *60*, 24–35. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Martins de Sousa, E.; Bonfim de Bortoli, F.; Amaral, E.P.; Batista, U.M.C.; Liberman Kipnis, E.; Marques Cardoso, U.M.; Quipnis, U.M.; Junqueira-Kipnis, A.P. Acute immune response to *Mycobacterium massiliense* in C57BL/6 and BALB/c mice. *Infect. Immun.* **2010**, *78*, 1571–1581. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Lima Viana, J.; Zagnignan, A.; Lima Lobato, L.F.; Gomes Abreu, A., Jr.; da Silva, L.C.N.; de Sá, J.C.; Monteiro, C.A.; Lago, J.H.G.; Gonçalves, L.M.; Carvalho, R.C.; et al. Hydroalcoholic Extract and Ethyl Acetate Fraction of *Bixa orellana* Leaves Decrease the Inflammatory Response to *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* **2018**, *2018*, 6091934. [\[CrossRef\]](#)
34. Byrd, T.F.; Lyons, C.R. Preliminary characterization of a *Mycobacterium abscessus* mutant in human and murine models of infection. *Infect. Immun.* **1999**, *67*, 4700–4707. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Bernut, A.; Herrmann, J.L.; Kissa, K.; Dubremetz, J.F.; Gaillard, J.L.; Luftalla, G.; Kremer, L. *Mycobacterium abscessus* cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, E943–E952. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Blanchard, J.D.; Elias, V.; Cipolla, D.; Gonda, I.; Bermudez, L.E. Effective Treatment of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissus* and *Mycobacterium abscessus* Species Infections in Macrophages, Biofilm, and Mice by Using Liposomal Ciprofloxacin [Internet]. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e00440–18. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Senhaji-Kacha, A.; Esteban, J.; Garcia-Quintanilla, M. Considerations for Phage Therapy Against *Mycobacterium abscessus*. *Front. Microbiol.* **2021**, *11*, 609017. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Conyers, L.E.; Saunders, B.M. Treatment for non-tuberculous mycobacteria: Challenges and prospects. *Front. Microbiol.* **2024**, *15*, 1394220. [\[CrossRef\]](#)

39. Dedrick, R.M.; Guerrero-Bustamante, C.A.; Garland, R.A.; Russell, D.A.; Ford, K.; Harris, K.; Gilmour, K.C.; Sothill, J.; Jacobs-Sera, D.; Schooley, R.T.; et al. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus* infection. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 730–733. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Vandenheuvel, D.; Lavigne, R.; Brys, L. Bacteriophage therapy: Advances in formulation strategies and human clinical trials. *Annu. Rev. Virol.* **2015**, *2*, 599–626. [\[CrossRef\]](#)
41. Foreman, M.; Kolodkin-Gal, I.; Barkan, D. A Pivotal Role for Mycobactin/*mbtE* in Growth and Adaptation of *Mycobacterium abscessus*. *Microbiol. Spectr.* **2022**, *10*, e0262322. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Kumar, G.; Adhikari, P.A. Targeting *Mycobacterium tuberculosis* iron-scavenging tools: A recent update on siderophore inhibitors. *RSC Med. Chem.* **2023**, *14*, 1885–1913. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Skaar, E.P. The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1000949. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Griffith, D.E.; Daley, C.L. Treatment of *Mycobacterium abscessus* Pulmonary Disease. *Chest* **2022**, *161*, 64–75. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Hugonnet, J.E.; Tremblay, L.W.; Boshoff, H.I.; Barry, C.E., 3rd; Blanchard, J.S. Meropenem-clavulanate is effective against extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **2009**, *323*, 1215–1218. [\[CrossRef\]](#)
46. Flemming, H.C.; Wingender, J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 623–633. [\[CrossRef\]](#)
47. Tetz, V.V.; Tetz, G.V. Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 1204–1209. [\[CrossRef\]](#)
48. Dzalomidze, E.; Gorzynski, M.; Vande Voorde, R.; Nelson, D.; Danelishvili, L. Discovery of biofilm-inhibiting compounds to increase the effectiveness of antibiotics against *M. abscessus* infections. *Pharmaceutics* **2025**, *18*, 225. [\[CrossRef\]](#)
49. Weng, Y.-W.; Huang, C.-K.; Sy, C.-L.; Wu, K.-S.; Tsai, H.-C.; Lee, S.S.-J. Treatment for *Mycobacterium abscessus* complex–lung disease. *J. Formos. Med. Assoc.* **2020**, *119*, S58–S66. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Kleinboelting, S.; Ramos-Espinoza, L.; Buck, H.; Colis, L.; van den Heuvel, J.; Glickman, J.F.; Levin, L.R.; Buck, J.; Steegborn, C. Bithionol Potently Inhibits Human Soluble Adenylyl Cyclase through Binding to the Allosteric Activator Site. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 9776–9784. [\[CrossRef\]](#)
51. Fennelly, K.P.; Ojano-Dirain, C.; Yang, Q.; Liu, L.; Lu, L.; Progulski-Fox, A.; Wang, G.P.; Antonelli, P.; Schultz, G. Biofilm Formation by *Mycobacterium abscessus* in a Lung Cavity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2016**, *193*, 692–693. [\[CrossRef\]](#)
52. Ramakrishnan, R.; Singh, A.K.; Singh, S.; Chakravorty, D.; Das, D. Enzymatic Dispersion of Biofilms: An Emerging Biocatalytic Avenue to Combat Biofilm-Mediated Microbial Infections. *J. Biol. Chem.* **2022**, *298*, 102352. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Singh, A.; Mishra, P. Bacitracin and Isothiocyanate Functionalized Silver Nanoparticles for Synergistic and Broad Spectrum Antibacterial and Antibiofilm Activity with Selective Toxicity to Bacteria over Mammalian Cells. *Biomater. Adv.* **2022**, *133*, 112649. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Lefebvre, A.L.; Dubé, V.; Guilloux, V.; Hugonnet, J.E.; Dubost, L.; Barbier, M.; Herrmann, J.L.; Kremer, L.; Arthur, M. Pharmacokinetic/pharmacodynamic studies of the beta-lactamase inhibitor avibactam combined with imipenem against *Mycobacterium abscessus* in vitro and in a mouse. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*. [\[CrossRef\]](#)
55. Bjarnsholt, T.; Tolker-Nielsen, T.; Hoiby, N.; Givskov, M. Role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS* **2010**, *118*, 1–51. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Cipolla, D.; Blanchard, J.; Gonda, I. Development of Liposomal Ciprofloxacin to Treat Lung Infections. *Pharmaceutics* **2016**, *8*, 6. [\[CrossRef\]](#)
57. Boudehen, Y.; Tasrini, Y.; Aguilera-Correa, J.J.; Alcaraz, M.; Kremer, L. Silencing essential gene expression in *Mycobacterium abscessus* during infection. *Microbiol. Spectr.* **2023**, *11*, e02836-23. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Bernut, A.; Viljoen, A.; Dupont, C.; Sapriel, G.; Chevalier, A.; Malgrange, V.L.; de Chastellier, C.; Herrmann, J.L.; Kremer, L. Insights into the smooth-to-rough transitioning in *Mycobacterium boletii* unravels a functional Tyr residue in the MmpL4 protein conserved in all mycobacteria. *Mol. Microbiol.* **2014**, *93*, 1196–1210. [\[CrossRef\]](#)
59. Chiron, R.; Hoefsloot, W.; Van Ingen, J.; Marchandin, H.; Kremer, L.; Morisse-Pradier, H.; Charriot, J.; Mallet, J.P.; Herrmann, J.L.; Caimmi, D.; et al. Amikacin Liposomal Inhalation Suspension in the Treatment of *Mycobacterium abscessus* Lung Infection: A French Observational Experience. *Open Forum Infect. Dis.* **2022**, *9*, ofac465. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
60. Leon-Icaza, S.A.; Bagayoko, S.; Vergé, R.; Iakobachvili, N.; Ferrand, C.; Aydogan, T.; Bernard, C.; Dafun, A.S.; Murriss-Espin, M.; Mazières, J.; et al. Druggable redox pathways against *Mycobacterium abscessus* in cystic fibrosis patient-derived airway organoids. *PLoS Pathog.* **2023**, *19*, e1011559. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
61. Meliefste, H.M.; Mudde, S.E.; Ammerman, N.C.; de Steenwinkel, J.E.M.; Bax, H.I. A laboratory perspective on *Mycobacterium abscessus* biofilm culture, characterization and drug activity testing. *Front. Microbiol.* **2024**, *15*, 1392606. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

5.3 Capítulo III – A Desferrioxamina Potencializa as Respostas Antimicrobianas e Imunomodulatórias contra *Mycobacterium abscessus*: Evidências Integradas *In Silico* e *In Vitro*

Periódico: International Journal of Molecular Sciences

Classificação Qualis – Periódico: A1

Área: Medicina II

Fator de Impacto: 4.9

ISSN: 1661-6596

Manuscript Status					
Incomplete submissions (0) Under processing (1) Website Online (2) Rejected / Withdrawn / Archived (6)					
Manuscript ID	Journal Section / Special Issue	Title		Status	Submission Date
ijms-4297903 B	IJMS SI: Antibacterial Drug Discovery and Molecular Mechanisms of Antimicrobial Resistance	Deferoxamine Enhances Antimicrobial and Immunomodulatory Responses Against <i>Mycobacterium abscessus</i> : Integrated In Silico and In Vitro Evidence		Pending review	2026-04-18 22:55:54

Article

A Desferrioxamina Potencializa as Respostas Antimicrobianas e Imunomodulatórias contra *Mycobacterium abscessus*: Evidências Integradas In Silico e In Vitro

Roseane Lustosa de Santana Lira¹, Fabiane Barbosa Mendes², Pedro Lucas Brito Tromps Roxo³, Joana Tenório Albuquerque Madruga Mesquita Meireles Teixeira³, Caio César Santana de Azevedo³, Arícia de Azevedo Vidigal³, Eleonôra Costa Monteiro Gimenes³, Reidson Stanley Soares dos Santos⁴, Rivaldo Lira Filho¹, Camila Evangelista Carnib Nascimento¹, Flávia Danyelle Oliveira Nunes¹, Mayane Cristina Pereira Marques¹, José Lima Pereira Filho¹, Carmem Duarte Lima Campos¹, Valério Monteiro Neto¹, Rafael Cardoso Carvalho¹, Eduardo Martins de Sousa^{1,2,3,4*}

¹ Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Maranhão – UFMA; roseane.lustosa@discente.ufma.br (R.L.d.S.L); rivaldo.lira@ufma.br (R.L.F); camila.carnib@ufma.br (C.E.C.N); flavia.danyelle@ufma.br (F.D.O.N); marques.mayanne@gmail.com (M.C.P.M); jlp.filho@discente.ufma.br (J.L.P.F); carmem.campos@discente.ufma.br (C.D.L.C); valerio.monteiro@ufma.br (V.M.N); carvalho.rafael@ufma.br (R.C.C); eduardo.martins@ceuma.br (E.M.d.S);

² Graduate Program in Biosciences Applied to Health, CEUMA University – UNICEUMA; fabianem807@gmail.com (F.B.M); eduardo.martins@ceuma.br (E.M.d.S).

³ Undergraduate in medicine, CEUMA University – UNICEUMA; pedrotromps.med@gmail.com (P.L.B.T.R); tenoriojoana04@gmail.com (J.T.A.M.M.T); caioazevedo1514@gmail.com (C.C.S.A); aricia051769@ceuma.com.br (A.A.V); eleonoragimenes.medicina@gmail.com (E.C.M.G); eduardo.martins@ceuma.br (E.M.d.S).

⁴ Dentistry Graduate Program, University Ceuma (UNICEUMA), São Luís, MA, Brazil; reidsonstanley@gmail.com (R.S.S.S), eduardo.martins@ceuma.br (E.M.d.S).

Abstract

Mycobacterium abscessus subsp. massiliense (Mabs) representa um desafio terapêutico relevante devido à sua elevada resistência aos antimicrobianos convencionais. Este estudo avaliou o potencial da desferrioxamina (DFO) como agente terapêutico adjuvante contra Mabs, seguindo uma abordagem que integra ensaios biológicos e ferramentas computacionais. Inicialmente, a DFO demonstrou elevada segurança e biocompatibilidade, preservando a viabilidade de macrófagos murinos RAW 264.7 e a integridade de eritrócitos humanos. A avaliação da atividade antimicrobiana direta revelou um perfil bacteriostático (CIM = 9,75 µg/mL), o qual apresentou sinergismo significativo quando em associação com a claritromicina (FICI = 0,047). Além de comprometer fatores de virulência, como a formação de biofilme e a secreção de vesículas extracelulares, o tratamento com DFO reduziu drasticamente a carga bacteriana intracelular em macrófagos infectados ($2,8 \pm 0,04 \log_{10}$ UFC/mL; $p < 0,01$). Esse controle foi acompanhado por importantes efeitos imunomodulatórios, caracterizados pela redução dos níveis de TNF- α (Fator de Necrose Tumoral Alfa) e IL-6 (Interleucina-6) e aumento de IL-10 (Interleucina-10). Por fim, análises de docking molecular evidenciaram alta afinidade da DFO por proteínas essenciais de Mabs, como Eis2 (Enhanced Intracellular Survival 2) e InhA (Enoyl-ACP Redutase), enquanto predições in silico de ADME/Tox e PASS sustentam a interação multi-alvo e a viabilidade translacional do composto. Estes achados

Academic Editor: Firstname
Lastname

Received: date
Revised: date
Accepted: date
Published: date

Copyright: © 2026 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license.

consolidam a DFO como um candidato adjuvante promissor para o tratamento de infecções por Mabs.

Keywords: *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*; Desferrioxamine; Iron chelation; Antimicrobial resistance; Adjuvant therapy

1. Introduction

As micobactérias não tuberculosas (MNTs) constituem um grupo de patógenos oportunistas ubíquos capazes de causar infecções graves em indivíduos imunocomprometidos [1–3]. Entre elas, o complexo *Mycobacterium abscessus* (CMAB) destaca-se como uma das principais causas de infecção em humanos, sendo a subespécie *M. abscessus* subsp. *massiliense* (Mabs) associada a infecções respiratórias e cutâneas graves e de difícil tratamento devido à sua resistência antimicrobiana intrínseca [4–8]. Tais infecções representam um desafio terapêutico crítico, especialmente em pacientes com fibrose cística ou doenças pulmonares crônicas, onde as terapias convencionais são frequentemente limitadas pela toxicidade [9–12].

Nesse cenário, a desferrioxamina (DFO) um quelante de ferro surge como uma alternativa promissora para o tratamento adjuvante [13,14]. A DFO é um agente capaz de privar os microrganismos de ferro, um elemento essencial para o metabolismo, replicação e sobrevivência bacteriana, representando uma estratégia de antagonismo metálico contra patógenos multirresistentes [15,16]. Além disso, evidências indicam que a DFO pode exercer efeitos imunomoduladores ao favorecer a homeostase redox e a resposta efetora de macrófagos infectados [17].

Este estudo investigou se a desferrioxamina pode inibir o crescimento de Mabs, potencializar a atividade antibiótica e modular as respostas inflamatórias de macrófagos, utilizando abordagens integradas in silico e in vitro. O objetivo principal é investigar as propriedades antimicrobianas e o potencial da DFO como adjuvante em estratégias terapêuticas combinadas com amicacina (AMK) e claritromicina (CLA). Hipotetizamos que a desferrioxamina compromete vias metabólicas dependentes desse metal em Mabs, reduzindo sua capacidade de crescimento e sobrevivência intracelular, além de potencializar a atividade dos antibióticos utilizados no tratamento dessas infecções.

2. Results

2.1 Perfil de segurança em células hospedeiras

Investigou-se primeiramente se a Desferrioxamina (DFO) afeta a viabilidade das células hospedeiras e a integridade celular por meio de predições computacionais e ensaios biológicos. Os resultados demonstraram que a DFO não reduziu significativamente a viabilidade de macrófagos RAW 264.7 (Figura 1a) nem induziu atividade hemolítica (Figura 1b) em eritrócitos humanos, o que, somado à redução dose-dependente de óxido nítrico (NO) sem citotoxicidade (Figura 1c). Estes achados de biocompatibilidade e estabilidade celular estabeleceram a confiança necessária para a avaliação subsequente da atividade antimicrobiana direta do composto.

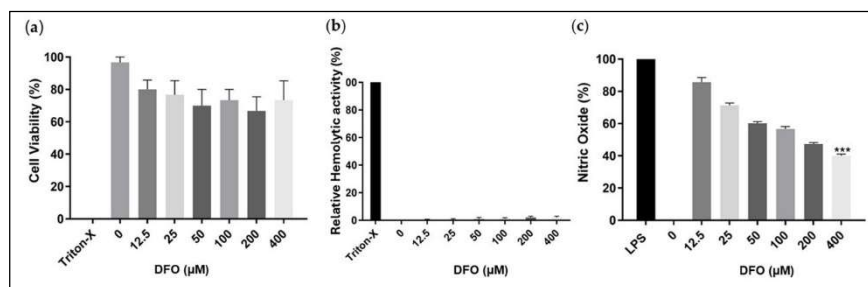


Figura 1. Perfil de segurança biológica e biocompatibilidade da desferrioxamina (DFO) em células hospedeiras. (a) Avaliação da viabilidade de macrófagos murinos RAW 264.7 infectados por Mabs após 24 h de tratamento com DFO. (b) Inibição dose-dependente da produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos ativados e infectados. (c) Avaliação do potencial hemolítico relativo em eritrócitos humanos, indicando ausência de toxicidade em todas as concentrações testadas. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos biológicos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey, onde *** $p < 0,001$ indica significância estatística em relação ao grupo controle (LPS para NO; Triton-X para hemólise) e ns indica não significativo ($p > 0,05$).

2.2 Atividade antimicrobiana direta

Após estabelecer o perfil de segurança do composto, investigou-se a eficácia antimicrobiana direta da DFO contra Mabs. A avaliação *in vitro* revelou que a DFO possui uma MIC de 9,75 $\mu\text{g/mL}$ e uma MBC superior a 10.000 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 1), o que resulta em uma razão MBC/MIC > 1.000 e confirma um perfil predominantemente bacteriostático, ao contrário da atividade bactericida observada para os antibióticos de controle amicacina (AMK) e claritromicina (CLA). Este perfil de inibição direta serviu de base para investigar se a DFO poderia potencializar a eficácia dos antibióticos convencionais através de efeitos sinérgicos.

Tabela 1. Concentrações Inibitórias Mínimas (MIC) e Concentrações Bactericidas Mínimas (MBC) de desferrioxamina, amicacina e claritromicina contra *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*.

Compostos	DFO	AMK	CLA
MIC	9,75 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	0,007 $\mu\text{g/mL}$ L
MBC	> 10.000 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	0,007 $\mu\text{g/mL}$
MBC/MIC	*	1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$
Atividade	Bacteriostático	Bactericida	Bactericida

DFO: Desferrioxamina; AMK: Amicacina; CLA: Claritromicina; MIC: concentrações inibitórias mínimas; MBC: concentrações bactericidas mínimas. *Não foi possível determinar. Os valores apresentados foram obtidos de forma consistente e reprodutível em três experimentos biológicos independentes, realizados em triplicata, e são expressos como média $\pm$ desvio padrão.

2.3 Sinergismo com antibióticos

Questionou-se em seguida se a associação da DFO com os antibióticos convencionais resultaria em efeitos sinérgicos, visando aumentar a eficácia contra o patógeno (**Figura 2**). Os ensaios de interação revelaram que a combinação DFO+CLA apresentou um sinergismo significativo com um FICI de 0,047, enquanto a associação DFO+AMK demonstrou um efeito aditivo. Estes resultados demonstram que a DFO atua de forma complementar aos antibióticos, o que levou à investigação de como essas associações impactam fatores de virulência, como a formação de biofilmes.

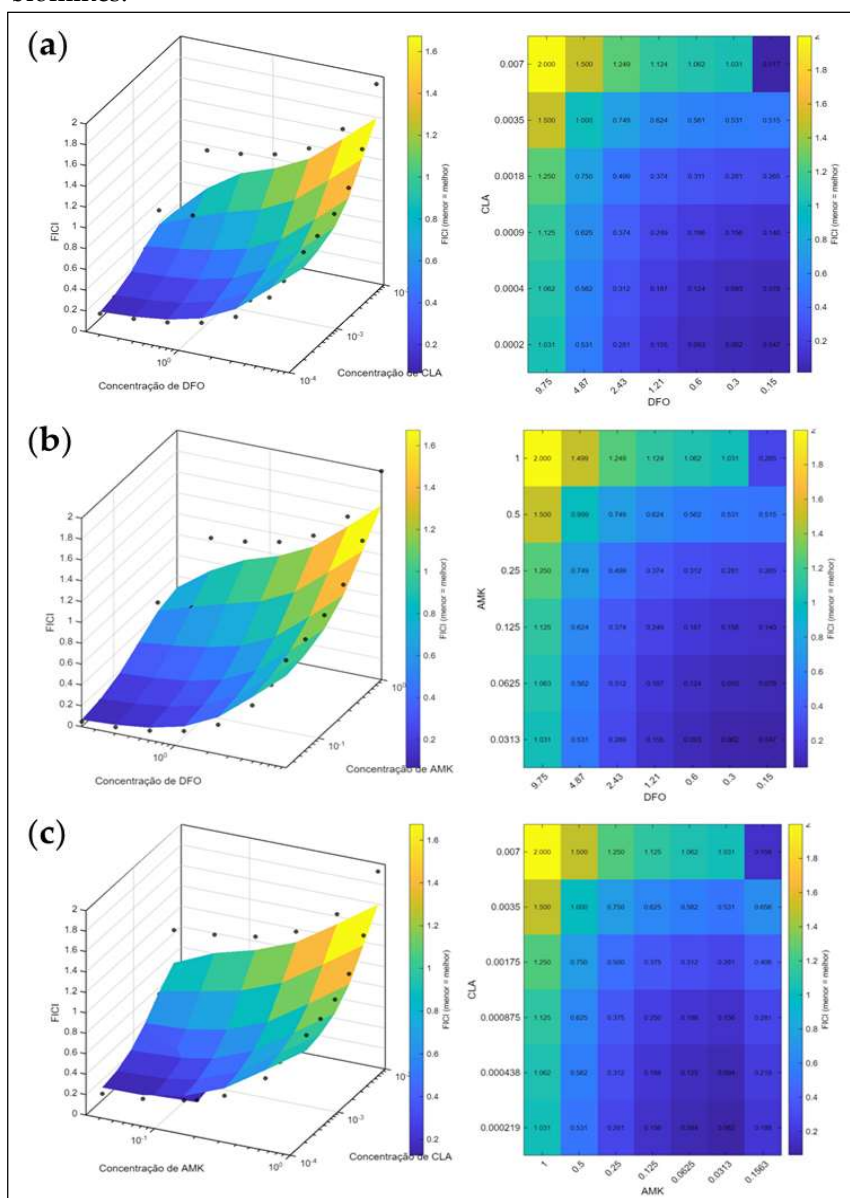


Figura 2. Interações Antimicrobianas contra Mabs. (a) DFO+CLA; (b) DFO+AMK; (c) AMK+CLA. DFO: Desferroxamina; AMK: Amicacina; CLA: Claritromicina. As superfícies de interação e os mapas de calor representam os valores do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI). Valores de $FICI \leq 0,5$ indicam sinergismo, enquanto $0,5 < FICI \leq 1,0$ indicam efeito aditivo. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de

três experimentos biológicos independentes realizados em triplicata.

2.4 Efeitos de antivirulência

Investigou-se o impacto da DFO, isolada e em combinação com antibióticos, sobre a formação de biofilme e a produção de vesículas extracelulares (VEs) como indicadores da virulência de *Mabs* (Figura 3). O tratamento isolado com DFO reduziu a formação de biofilme em 40% e a secreção de VEs em 44%, sendo que as associações terapêuticas demonstraram inibições ainda mais expressivas, atingindo reduções de até 55% para o biofilme. Esta interferência em fenótipos cruciais para a patogênese motivou a avaliação subsequente da eficácia do composto no controle da sobrevivência bacteriana em ambiente intracelular.

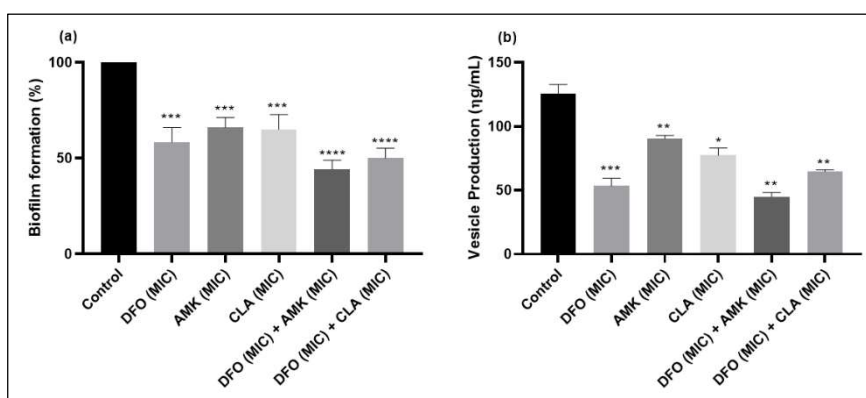


Figura 3. Inibição de fatores de virulência de *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* pela desferrioxamina (DFO) e combinações. (a) Quantificação da formação de biofilme após tratamento com desferrioxamina (DFO) (MIC: 9,75 µg/mL), amicacina (AMK) (MIC: 1µg/mL), claritromicina (CLA) (MIC: 7 µg/mL) e suas combinações. (b) Quantificação da produção de vesículas extracelulares nas mesmas condições de tratamento. Os dados representam a média ± desvio padrão de três experimentos biológicos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey, onde *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001 indicam significância estatística em relação ao grupo controle.

2.5 Eficácia intracelular

Investigou-se a capacidade da DFO em controlar a sobrevivência e a replicação de *Mabs* no interior de macrófagos murinos RAW 264.7 ao longo de 24 horas (Figura 4). O tratamento com DFO (2 × MIC) promoveu uma redução estatisticamente significativa na carga bacteriana intracelular, atingindo uma média de $2,80 \pm 0,04 \log_{10}$ UFC/mL em comparação aos $7,00 \pm 0,05 \log_{10}$ UFC/mL do grupo controle. Este controle da carga bacilar em ambiente intracelular sugeriu que a DFO poderia estar influenciando não apenas a bactéria, mas também a resposta imunológica da célula hospedeira, motivando a análise de citocinas inflamatórias.

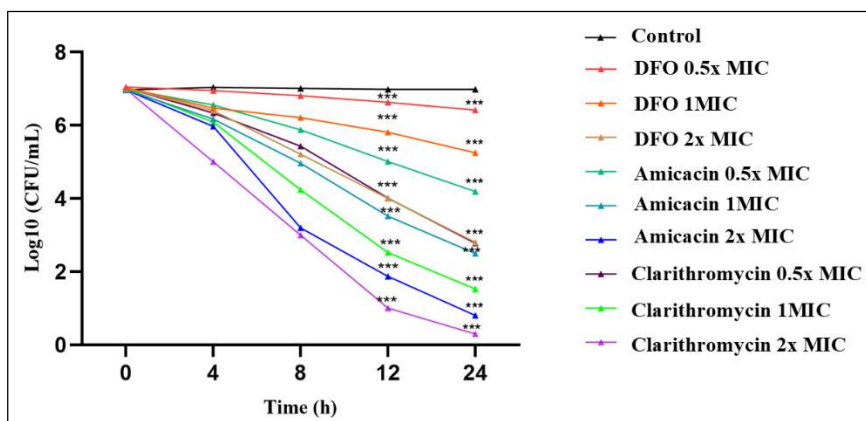


Figura 4. Cinética de sobrevivência intracelular e eficácia comparativa da desferrioxamina, amicacina e claritromicina em macrófagos murinos RAW 264.7 infectados. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos biológicos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey, onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ indicam significância estatística em relação ao grupo controle infectado.

2.6 Efeitos imunomodulatórios

Investigou-se como o tratamento com DFO influencia o perfil de citocinas e a resposta inflamatória em macrófagos infectados por *M. abscessus*. O tratamento com DFO ($1 \times \text{MIC}$) promoveu uma redução significativa na expressão das citocinas pró-inflamatórias $\text{TNF-}\alpha$ ($0,65 \pm 0,10$) e IL-6 ($0,65 \pm 0,08$), acompanhada por um incremento na citocina reguladora IL-10 ($1,45 \pm 0,15$) (Figura 5). Esse "desvio" imunológico sugere que a DFO favorece um microambiente menos responsivo ao estímulo inflamatório, o que motivou a busca por suporte mecanístico por meio de análises *in silico* de interação molecular.

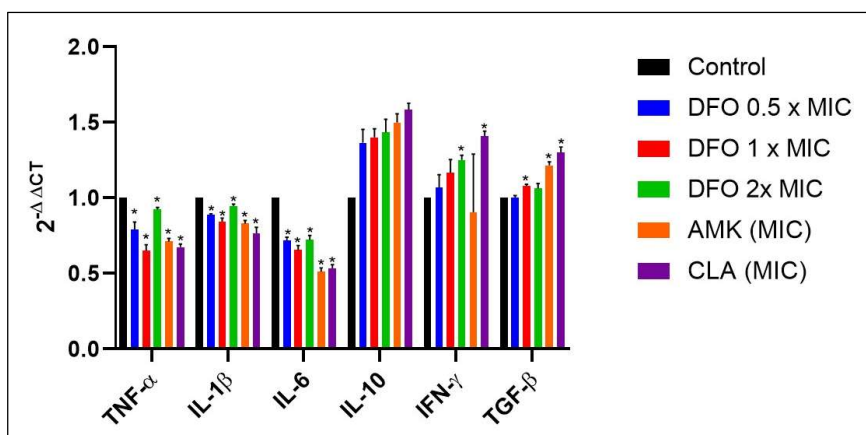


Figura 5. A desferrioxamina modula o perfil de expressão gênica de citocinas em macrófagos murinos infectados por Mabs. Análise quantitativa da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de mediadores pró-inflamatórios (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ) e reguladores (IL-10 e TGF- β) após 24 h de tratamento com DFO, AMK e CLA. A normalização foi realizada contra o gene de referência β -actina, utilizando o grupo infectado

não tratado como calibrador. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos biológicos independentes realizados em triplicata. Estatística: ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey (* $p < 0,05$ vs. Controle infectado).

2.7 Docking molecular compartilhado

Buscou-se identificar a afinidade da DFO por alvos moleculares essenciais para a sobrevivência e resistência de Mabs por meio de ferramentas de docking. As análises revelaram afinidades de ligação superiores para a acetiltransferase Eis2 (-10,8 kcal/mol) e para a enzima InhA (-10,3 kcal/mol), sugerindo uma interferência direta em vias de biossíntese e resistência (Figura 6). Estes achados estruturais foram integrados a predições funcionais para consolidar o potencial terapêutico do composto como suporte às terapias convencionais.

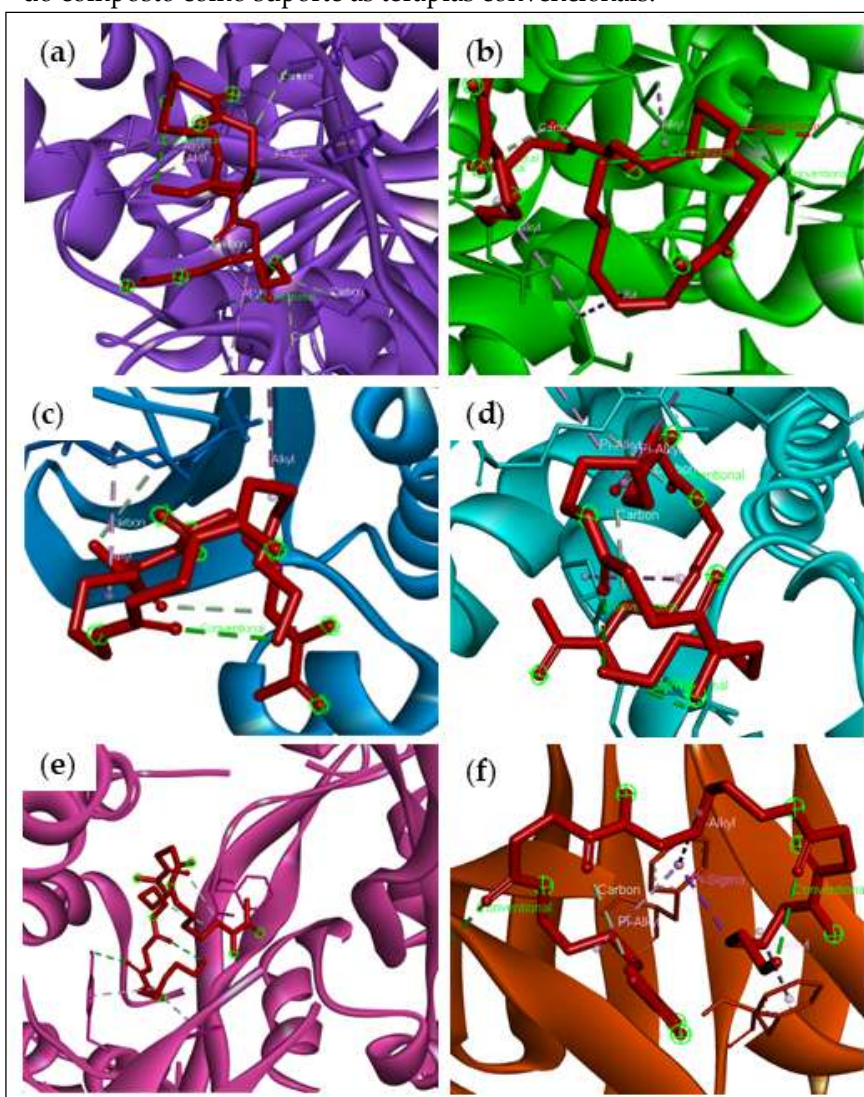


Figura 6. A desferrioxamina apresenta alta afinidade de ligação por alvos enzimáticos essenciais de Mabs. Representações das interações moleculares obtidas por docking molecular em: (a) tioredoxina redutase (TrxB2; PDB ID: 4POB); (b) InhA (PDB ID: 7U0M), com afinidade superior ao inibidor NITD-916; (c) fumarase (PDB ID: 3RRP), superando a afinidade

do ligante natural malato; **(d)** enoil-CoA hidratase/isomerase (PDB ID: 3R9Q); **(e)** Eis2 (PDB ID: 6RFT), apresentando a maior afinidade observada entre os alvos; **(f)** subunidade ϵ da F-ATP sintase (PDB ID: 7XKZ). As interações moleculares e as energias livres de ligação (ΔG) foram calculadas utilizando o software AutoDock Vina.

2.8 Análises *in silico* sustentam interações multi-alvo e viabilidade translacional

Investigou-se o espectro de atividade biológica, a biodisponibilidade e o perfil farmacocinético da DFO para validar seu potencial mecanístico e a viabilidade de sua aplicação clínica. A análise PASS confirmou uma probabilidade de 91,1% ($P_a = 0,911$) de atuação como antagonista do ferro (Tabela 2), o que reforça os dados de docking molecular.

Atividades	Previsões PASS	
	P_a	P_i
Desferrioxamina		
Antagonista de ferro	0,911	0,000
CDP-glicerol inibidor de glicerofosfotransferase	0,875	0,014
Inibidor de ATPase transportador de poliamina	0,826	0,004
Tratamento de mucosite	0,831	0,011
Antídoto	0,813	0,002
Inibidor de ribonuclease de levedura	0,808	0,003
Amicacina		
CDP-glycerolglycerophosphotransferase inhibitor	0,955	0,003
Cellulose 1,4-beta-cellobiosidase inhibitor	0,943	0,000
Antiprotozoal (Leishmania)	0,883	0,003
Phosphoinositide 5-phosphatase inhibitor	0,859	0,003
Mucinaminyserine mucinaminidase inhibitor	0,846	0,004
Immunostimulant	0,843	0,007
Membrane integrity antagonist	0,831	0,005
Antibacterial	0,816	0,002
Claritromicina		
CYP2H substrate	0,996	0,000
CYP3A1 substrate	0,993	0,000
CYP3A7 substrate	0,993	0,000
CYP3A2 substrate	0,991	0,000
CYP2B substrate	0,990	0,001
CYP2C11 substrate	0,987	0,001
Expectorant	0,982	0,001
Antiinfective	0,982	0,002

DFO: Desferroxamina; AMK: Amicacina; CLA: Claritromicina; P_a : provável atividade; P_i : provável inatividade; PASS: previsão de espectros de atividade para substâncias. Os dados foram obtidos por meio de predição computacional utilizando o servidor PASS Online, baseados em modelos de similaridade molecular e algoritmos de aprendizado de máquina.

Conforme demonstrado na análise de radar (Figura 7), a DFO assim

como a AMK e a CLA apresentaram um perfil de biodisponibilidade oral desfavorável (Tabela 3), posicionando-se fora da zona ideal de absorção (área sombreada em rosa) devido a parâmetros de alta polaridade e flexibilidade. Apesar dessas limitações de absorção gastrointestinal, os parâmetros de ADME reforçaram a segurança sistêmica e a baixa toxicidade do composto. Esta convergência de evidências computacionais e experimentais posiciona a DFO como um adjuvante promissor para o tratamento de infecções micobacterianas, fundamentando o uso de vias de administração alternativas para potencializar a eficácia de antibióticos e modular a resposta inflamatória do hospedeiro.

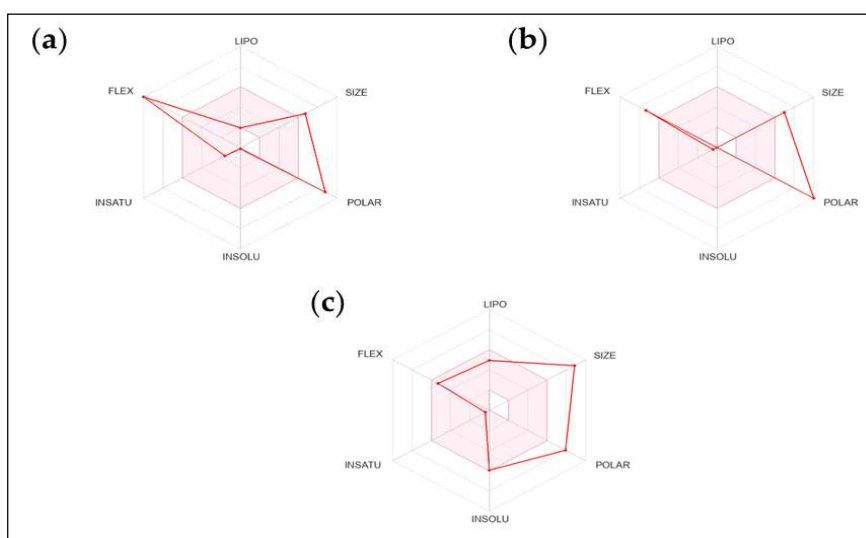


Figura 7. Análise de biodisponibilidade oral (radar plot). (a) Desferrioxamina; (b) Amicacina; (c) Claritromicina. A área sombreada em rosa representa a zona ideal para as propriedades físico-químicas de absorção oral. As extremidades representam: Lipofilicidade (LIPO); SIZE (Peso molecular); Polaridade (POLAR); insolubilidade em água por escala logS (INSOLU); insaturação conforme a fração no carbono na hibridação sp3 (INSATU); flexibilidade de acordo com ligações rotativa (FLEX). Os dados foram obtidos por meio de predição computacional utilizando o servidor SwissADME, baseados em modelos de similaridade molecular e algoritmos de aprendizado de máquina.

Tabela 3. Estimativas da biodisponibilidade oral, efeitos tóxicos previstos, absorção e solubilidade da desferrioxamina (DFO) em comparação com a amicacina (AMK) e claritromicina (CLA).

Biodisponibilidade Estimada	Oral	DFO	AMK	CLA
LogP		4.33	1.84	2.44
PM (g/mol)		560,68	585,60	747,95
TPSA Å ²		205,84	331,94	182,91
nDLH		6	13	4
nALH		9	17	14
RAM		142,48	128,99	194,09
nRB		28	11	8

Efeitos tóxicos previstos			
Carcinogenicidade	Não	Não	Não
Cardiotoxicidade	Não	Sim	Não
Citotoxicidade	Não	Não	Não
Ecotoxicidade	Não	Não	Não
Hepatotoxicidade	Não	Não	Sim
Imunotoxicidade	Não	Sim	Sim
Mutagenicidade	Sim	Não	Não
Neurotoxicidade	Não	Sim	Sim
Nefrotoxicidade	Sim	Sim	Sim
DL ₅₀ (mg/kg)	1.000	4.000	1.230
Toxicidade de Ames	Não	Não	Não
Toxicidade oral aguda	Baixa	Mínima	Baixa
Toxicidade aguda em ratos	2.062	1.750	2.723
Classe de toxicidade	4	5	4
Absorção estimada			
Absorção GI	Baixa	Baixa	Baixa
Permeabilidade BHE	Não	Não	Não
Log K _p (cm/s)	-11,22	-15,47	- 8,62
Solubilidade prevista			
LogS	-0,14	2,23	-5,94

DFO: Desferroxamina; AMK: Amicacina; CLA: Claritromicina; iLogP: coeficiente de partição água; PM: peso molecular; TPSA: área total da superfície polar; nDLH: número de doadores de ligações de hidrogênio; nALH: número de aceitadores de ligações de hidrogênio; RAM = refratividade molar; nRB = número de ligações rotativas; DL50: dose letal 50%; Absorção GI: gastrointestinal; BHE: barreira hematoencefálica; Log K_p: índice de permeação cutânea; Log S: solubilidade. Os dados foram obtidos por meio de predição computacional utilizando o servidor SwissADME, baseados em modelos de similaridade molecular e algoritmos de aprendizado de máquina.

3. Discussion

O presente estudo investigou o potencial antimicrobiano e adjuvante da DFO contra Mabs, combinando análises *in silico* e *in vitro* para elucidar seus possíveis mecanismos de ação e aplicabilidade clínica em terapias combinadas com AMK e CLA. Diferente de abordagens que buscam novos antibióticos isolados, este trabalho propõe a DFO como uma ferramenta estratégica para fragilizar o patógeno e potencializar a terapia convencional. Os resultados demonstraram que, embora a DFO apresente limitações farmacocinéticas importantes, ela exibe atividade bacteriostática significativa, potencial sinérgico com CLA, capacidade de inibição de biofilmes e modulação imunológica favorável. Dessa forma, a DFO exerce efeitos adjuvantes multialvo contra Mabs, associando restrição metabólica, atenuação da virulência e modulação da resposta do hospedeiro, o que sustenta seu potencial reposicionamento no tratamento de infecções por micobactérias não tuberculosas. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a demonstrar os efeitos antimicrobianos e imunomodulatórios combinados da deferrioxamina contra Mabs.

A viabilidade de qualquer nova estratégia terapêutica depende, primariamente, da ausência de toxicidade para o hospedeiro. Nossos resultados demonstraram que a DFO preserva a viabilidade de macrófagos e a integridade de eritrócitos humanos nas concentrações testadas. A ausência de atividade hemolítica significativa amplia a janela terapêutica e a segurança celular do composto, mitigando riscos críticos associados ao desenvolvimento de antimicrobianos intravenosos, como danos teciduais, liberação de hemoglobina pró-oxidante e complicações vasculares. Tal perfil é consistente com o histórico clínico estabelecido da DFO em terapias de quelação, reforçando sua viabilidade como um adjuvante seguro para o tratamento de infecções por Mabs [18,19]. Conforme evidenciado em pesquisa anterior, baixos índices de hemólise *in vitro* correlacionam-se a elevados índices de seletividade, um parâmetro determinante para a progressão pré-clínica de novos agentes [20].

A ausência de citotoxicidade da DFO reforça que a redução dose-dependente do óxido nítrico (NO) decorre de uma modulação bioquímica e não de perda de viabilidade celular. Esta inibição correlaciona-se com a quelação do ferro, que pode atenuar a ativação do fator HIF-1 α e a subsequente expressão da enzima iNOS. Sob a perspectiva da patologia, essa redução é favorável, visto que a produção excessiva de NO em infecções micobacterianas crônicas está associada ao estresse oxidativo e ao dano tecidual pulmonar exacerbado [21].

Entretanto, deve-se considerar a dicotomia desse efeito: embora a redução do NO minimize a imunopatologia, ela poderia, teoricamente, comprometer um dos mecanismos microbicidas centrais do hospedeiro. Contudo, observamos que essa modulação não resultou em prejuízo à eliminação bacteriana, conforme evidenciado pela redução significativa na carga intracelular. Isso sugere que o impacto antimicrobiano global não é prejudicado, pois a DFO exerce uma pressão seletiva direta sobre o patógeno através da "imunidade nutricional". Ao sequestrar o ferro essencial, a DFO compromete vias metabólicas vitais da Mabs, como a respiração celular e a síntese de DNA, compensando a menor disponibilidade de radicais de nitrogênio no ambiente intracelular [22,23]. Assim, a eficácia do tratamento reside em um equilíbrio homeostático: a atenuação da resposta oxidativa deletéria do hospedeiro ocorre simultaneamente à indução de uma vulnerabilidade metabólica na micobactéria, sensibilizando-a para a eliminação definitiva, especialmente quando em sinergia com antibióticos convencionais.

Diferente da amicacina (AMK) e claritromicina (CLA), que exibem potente ação bactericida, a DFO apresentou um perfil predominantemente bacteriostático. Essa moderação na potência direta é condizente com o seu mecanismo de "imunidade nutricional", onde o sequestro de ferro limita o metabolismo bacteriano e a replicação sem causar lise imediata [24,25]. Embora a DFO possua uma potência inferior aos antibióticos de primeira linha, seu papel clínico mais promissor reside na sua capacidade de atuar como um sensibilizador metabólico.

Visto que a potência isolada da DFO é moderada, o próximo passo lógico foi explorar sua capacidade de sensibilização em terapias

combinadas. Os ensaios de combinação mostraram a interação mais forte para a associação DFO + claritromicina, enquanto DFO + amicacina apresentou perfis de interação favoráveis, embora menos acentuados. Esse fenômeno reforça que a privação de ferro fragiliza a integridade da parede celular e o metabolismo energético da micobactéria, facilitando a ação dos antibióticos convencionais e ajudando a superar a resistência intrínseca [24,25].

A eficácia da DFO como sensibilizador metabólico estende-se ao compromisso de fenótipos cruciais para a patogênese de Mabs. Ao reduzir a formação de biofilmes e a secreção de vesículas extracelulares (EVs), a DFO ataca a virulência do patógeno em frentes onde os antibióticos isolados frequentemente falham. O efeito antibiofilme é particularmente relevante, visto que essa estrutura contribui para a persistência crônica e a redução da suscetibilidade aos antimicrobianos. Diferente de uma simples facilitação física da penetração do fármaco, a sinergia observada decorre da desestabilização da integridade estrutural da matriz e da indução de estresse metabólico nas células sésseis, tornando a comunidade bacteriana mais vulnerável à ação bactericida dos antibióticos convencionais [26,27]. Da mesma forma, a inibição de EVs representa uma estratégia crítica para mitigar a evasão imunológica e a disseminação bacteriana, sugerindo que a quelatação de ferro interfere em vias regulatórias essenciais para a biogênese vesicular [28,29].

A validação da DFO como ferramenta de sensibilização biológica foi consolidada no modelo de infecção em macrófagos. Enquanto os antibióticos de primeira linha promoveram uma redução drástica e rápida da carga bacteriana, a DFO apresentou um declínio mais modesto, atingindo $2,80 \pm 0,04 \log_{10}$ UFC/mL. Essa diferença de magnitude na atividade intracelular é esperada, visto que a DFO atua predominantemente através da privação nutricional de ferro (imunidade nutricional), retardando a replicação bacteriana sem induzir a lise celular imediata observada com os inibidores de síntese proteica [30,31]. No entanto, é precisamente essa capacidade de "enfraquecer" o patógeno através de um estado de estresse metabólico crônico, sem causar danos citotóxicos ao hospedeiro, que fundamenta o uso da DFO como um modulador capaz de fragilizar a micobactéria para a eliminação definitiva pela resposta imune ou por terapias combinadas.

Do ponto de vista mecanístico, as análises de docking molecular forneceram uma base teórica robusta para os efeitos biológicos observados, sugerindo que a eficácia da DFO como adjuvante decorre de interações multi-alvo com enzimas essenciais de Mabs. A elevada afinidade de ligação prevista para a acetiltransferase Eis2 ($-10,8$ kcal/mol) é particularmente relevante, pois esta proteína está diretamente implicada na resistência aos aminoglicosídeos e na modulação da resposta imune do hospedeiro. A interação da DFO com resíduos críticos de Eis2 sugere um potencial para interferir na inativação enzimática de fármacos, o que pode sustentar o efeito aditivo observado com a amicacina [32,33].

Adicionalmente, a forte interação com a enoil-ACP redutase InhA ($-10,3$ kcal/mol), enzima vital para a biossíntese de ácidos micólicos, indica que a DFO pode comprometer a integridade estrutural da parede celular

micobacteriana. Essa fragilização da barreira externa, somada à interferência no metabolismo energético via interação com a F-ATP sintase e a fumarase, corrobora o papel da DFO como um sensibilizador metabólico que facilita a ação de antibióticos convencionais como a claritromicina [34,35].

Quanto à viabilidade translacional, a análise PASS confirmou uma probabilidade de 91,1% ($P = 0,911$) de a DFO atuar como antagonista do ferro, o que é condizente com a interrupção da homeostase metálica necessária para o controle do patógeno. Embora o perfil farmacocinético *in silico* aponte para uma baixa absorção gastrointestinal, essa limitação é contornada na prática clínica pela administração intravenosa ou subcutânea, vias já estabelecidas para o tratamento de sobrecarga férrica [36–39]. Assim, a convergência entre as previsões computacionais e os dados experimentais reforça que a desferrioxamina é um candidato seguro e promissor para integrar terapias combinadas, agindo simultaneamente na restrição metabólica da bactéria e na preservação da viabilidade celular do hospedeiro.

É notório que a combinação da DFO com antibióticos oferece vantagens potenciais significativas no cenário clínico. Essa abordagem pode aumentar a eficácia antimicrobiana ao potencializar a ação dos antibióticos, auxiliando-os a superar a resistência bacteriana e a proteção conferida por biofilmes. Trata-se, de uma estratégia multifacetada que ataca a infecção por diferentes frentes, como a privação de nutrientes essenciais, a desestabilização de biofilmes, a potencial modulação da resposta imune do hospedeiro e a interferência em mecanismos de resistência, oferecendo uma terapêutica potencialmente mais efetiva que a monoterapia.

4. Materiais e Métodos

4.1 Microrganismo e Condições de Cultivo

Mycobacterium abscessus subsp. *massiliense* (BCCIPTSP Go01) foi utilizada em todas as análises *in vitro* e *in silico*. As culturas bacterianas foram mantidas em meio Middlebrook 7H9 suplementado com 10% OADC e 0,05% de Tween 80, incubadas a 37 °C sob condições aeróbias [7,12]. A utilização do isolado clínico foi autorizada mediante assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido, conforme aprovado pelo CAAE: 21357413.4.0000.5084.

4.2 Seleção dos Compostos para Análises Computacionais

As estruturas químicas da desferrioxamina (DFO; CID: 2973), amicacina (AMK; CID: 377768) e claritromicina (CLA; CID: 84029) foram obtidas do banco de dados PubChem (National Center for Biotechnology Information). As estruturas foram utilizadas nas análises *in silico*.

4.3 Preparação do Inóculo Bacteriano

Uma colônia isolada de Mabs foi suspensa em PBS contendo 0,05% Tween 80 em tubos contendo esferas de vidro estéreis e homogeneizada por vórtex até completa dispersão. A turbidez foi ajustada visualmente à escala 0,5 de McFarland ($\sim 1 \times 10^8$ UFC/mL) e confirmada por leitura espectrofotométrica a 625 nm (Densidade Óptica = 0,105). Após repouso

por 30 min, 50 µL da suspensão foram diluídos em 9,95 mL de caldo Mueller–Hinton, obtendo-se uma concentração final de 1×10^4 UFC/mL [14].

4.4 Ensaio de Citotoxicidade e Viabilidade celular em Macrófagos murinos RAW 264.7

A citotoxicidade da DFO foi avaliada em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 utilizando o método do MTT [brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-Δil) -2,5-difeniltetrazólio]. As células (1×10^5 células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços, cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) e suplementadas com 10% de soro fetal bovino e tratadas com diferentes concentrações de DFO (12,5–400 µM). A incubação foi realizada por 24 h a 37 °C em atmosfera de 5% CO₂, sem agitação. Como controle negativo, utilizou-se apenas o meio de cultura, enquanto o Triton X-100 (0,05%) serviu como controle positivo. A viabilidade celular foi quantificada por meio da leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm [40]. Todos os experimentos foram realizados em triplicata técnica de cada uma das três réplicas biológicas independentes.

4.5 Determinação da Atividade Hemolítica

Eritrócitos humanos foram obtidos a partir de concentrados de hemácias provenientes de bolsas de sangue (preservadas em CPDA-1) cedidas pelo Hemocentro do Maranhão. O uso do material biológico foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Ceuma (Parecer N° 1.570.437). As hemácias foram lavadas três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4) por centrifugação (2000 rpm, 10 min, 4 °C) antes de serem ressuspensas para os ensaios de hemólise. As hemácias foram isoladas e incubadas com DFO (12,5–400 µM) por 60 min a 37 °C. Foram utilizados como controles de 0% e 100% de lise o tampão PBS e o Triton X-100 (0,05%), respectivamente. A liberação de hemoglobina foi quantificada por leitura espectrofotométrica a 540nm. A atividade hemolítica foi expressa em relação ao Triton X-100 e calculada usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ hemolysis} = \left[\frac{(As - Ab) \times 100}{Ac - Ab} \right]$$

onde Ab é a absorbância do controle (branco sem extrato), As é a absorbância na presença do extrato e Ac é a absorbância na presença de Triton X-100 [14].

Todos os experimentos foram realizados em triplicata técnica de cada uma das três réplicas biológicas.

4.6 Quantificação da Produção de Óxido Nítrico (NO)

A produção de NO foi determinada pela quantificação de nitrito acumulado no sobrenadante das culturas através da reação de Griess. Macrófagos murinos RAW 264.7 foram infectados e ativados com lipopolissacarídeo LPS (1 µg/mL) e simultaneamente tratados com DFO (12,5–400 µM). Após o período de tratamento, alíquotas do sobrenadante

foram incubadas com o reagente de Griess e a absorbância foi medida a 540nm [23]. Todos os experimentos foram realizados em triplicata técnica de cada uma das três réplicas biológicas.

4.7 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC)

A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo Mueller–Hinton (Himedia, Mumbai, Índia) em placas de 96 poços. Foram testadas concentrações seriadas de DFO (10–4,87 µg/mL), AMK (128–0,06 µg/mL) e CLA (32–0,015 µg/mL). As MICs foram registradas após 5 dias de incubação a 37 °C. A determinação da MIC foi realizada pela observação da ausência de mudança de cor após a adição de resazurina a 0,01% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), seguida de incubação por 24 horas [41].

Para determinação da MBC, alíquotas dos poços sem crescimento visível foram subcultivadas em ágar Middlebrook 7H11. Após 5 dias de incubação a 37° C, as leituras das MBCs foram realizadas com base no crescimento dos controles, sendo considerada MBC, a menor concentração de DFO, AMK e CLA que impedir o crescimento micobacteriano (≥ 99.9% de morte celular) seguindo padrões CLSI/EUCAST [7,41]. Para um inóculo inicial de 10⁷ UFC/mL (log₁₀ = 7,00) que atingiu uma contagem final de 10⁴ UFC/mL (log₁₀ = 4,00), a redução foi de 3,00 log₁₀. A porcentagem de morte celular foi calculada através da variação relativa entre a carga inicial e final, utilizando a equação:

$$\% \text{ morte} = \frac{\text{UFC}_{\text{inicial}} - \text{UFC}_{\text{final}}}{\text{UFC}_{\text{inicial}}} \times 100$$

$$\text{Log}_{10} \text{redução} = \log_{10}(\text{UFC}_{\text{inicial}}) - \log_{10} \text{UFC}_{\text{final}}$$

Todos os experimentos foram realizados em triplicata técnica de cada uma das três réplicas biológicas.

4.8 Avaliação de Sinergismo (Método Checkerboard)

O potencial sinérgico entre desferrioxamina, amicacina e claritromicina contra *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* foi avaliado pelo método de microdiluição em caldo no formato checkerboard, conforme protocolos adaptados para micobactérias. A cepa foi cultivada em Middlebrook 7H9 suplementado com OADC e 0,05% de Tween 80, ajustada a ~1 × 10⁵ UFC/mL, e inoculada em placas de 96 poços contendo combinações seriadas dos antimicrobianos (0,25× a 4× MIC). As placas foram incubadas a 37 °C por 3–5 dias, sendo o crescimento bacteriano avaliado por inspeção visual [42]. Todos os experimentos foram realizados em triplicata técnica de cada uma das três réplicas biológicas.

A concentração inibitória mínima (MIC) para cada combinação foi determinada como a menor concentração onde não se observava turvação visível. Para cada combinação testada, foi calculado o Índice de

Concentração Inibitória Fracionada (FICI) [42]. As interações antimicrobianas foram quantificadas através do cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI), utilizando a seguinte equação:

$$FICI = \frac{A}{MIC_A} + \frac{B}{MIC_B}$$

onde: A: representa a concentração do composto A na combinação em que houve inibição do crescimento bacteriano (µg/mL). MIC_A: corresponde à Concentração Inibitória Mínima do composto A testado isoladamente (µg/mL). B: representa a concentração do composto B na combinação em que houve inibição do crescimento bacteriano (µg/mL). MIC_B: corresponde à Concentração Inibitória Mínima do composto B testado isoladamente (µg/mL). A interpretação dos resultados foi baseada nos critérios estabelecidos para o índice FICI, onde valores de FICI ≤ 0,5 indicam sinergismo, o intervalo 0,5 < FICI ≤ 1,0 representa efeito aditivo, valores situados entre 1,0 < FICI ≤ 4,0 indicam indiferença e valores de FICI > 4,0 caracterizam antagonismo entre os compostos testados.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata independente, e os valores finais de FICI foram expressos como média dos experimentos.

4.9 Formação de Biofilme e Produção de Vesículas Extracelulares

A inibição da formação de biofilme por Mabs tratada com DFO, AMK ou CLA (0,5×, 1× e 2× MIC) foi avaliada pelo método de cristal violeta em placas de 96 poços de fundo chato (poliestireno). As culturas foram mantidas em caldo Middlebrook 7H9 (Himedia, Mumbai, India) suplementado com OADC e sem a adição de Tween 80, a 37 °C por 5–7 dias em condições estáticas para permitir a adesão bacteriana [43].

Após a incubação, o conteúdo planctônico foi removido e os poços foram lavados três vezes com 200µL de PBS (pH 7,4) para a eliminação de células não aderidas. O biofilme remanescente foi fixado com 200µL de metanol (grau analítico) por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram coradas com 200µL de cristal violeta a 0,1% por 15 minutos em temperatura ambiente. Após nova lavagem em água destilada para remover o excesso de corante, a biomassa foi solubilizada em 200µL de etanol a 95% por 30 minutos. A densidade óptica (DO) foi mensurada a 570nm em leitor de microplacas. Os experimentos foram realizados em três réplicas biológicas independentes, com cada amostra testada em triplicata técnica.

As vesículas extracelulares (EVs) foram isoladas de culturas de Mabs tratadas em larga escala em meio Middlebrook 7H9 (Himedia, Mumbai, India). O sobrenadante livre de células foi obtido por centrifugação seriada (3.000× g e 15.000× g). As EVs foram coletadas por ultracentrifugação a 100.000× g por 2 h a 4 °C, utilizando uma ultracentrífuga Optima L-90K e rotor de ângulo fixo Type 70 Ti (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Após lavagem em PBS, as EVs foram quantificadas pelo método do ácido bicinonínico (BCA) a 562 nm, com os resultados normalizados pelo número de unidades formadoras de colônias (UFC) da cultura original [29]. Os experimentos foram realizados

em três experimentos biológicos independentes, com análises realizadas em triplicata técnica para garantir a precisão dos dados.

4.10 Infecção e Sobrevivência Intracelular em Macrófagos murinos RAW 264.7

Macrófagos murinos RAW 264.7 foram infectados com Mabs em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 10:1, representando a proporção de 10 bactérias para cada célula hospedeira. Esta proporção foi selecionada para assegurar uma eficiência de infecção de aproximadamente 100% das células, minimizando a interferência de macrófagos não infectados no resultado final, ao mesmo tempo em que previne a morte celular precoce por sobrecarga bacteriana [42,44].

Após eliminação das bactérias extracelulares com gentamicina 50 µg/mL (por 1 hora), as células foram tratadas com DFO, AMK ou CLA nas concentrações de 0,5×, 1× e 2× MIC. A carga bacteriana intracelular foi avaliada nos tempos 0, 4, 8, 12 e 24 h após lise celular com uma solução de Triton X-100 a 0,1% em água destilada estéril para a liberação das micobactérias intracelulares, o lisado celular obtido foi diluído seriadamente em PBS e plaqueado em meio sólido Middlebrook 7H10 suplementado com OADC. Os resultados foram expressos em log₁₀ UFC/mL [10,14].

Para a determinação da carga bacteriana, o lisado foi submetido a diluições seriadas 10⁻¹ a 10⁻⁸ em PBS. Alíquotas de 100 µL de cada diluição foram inoculadas na superfície de ágar Middlebrook 7H10 ou 7H11 suplementado com OADC. As placas foram incubadas a 37° C com 5% CO₂ por um período de 3 a 5 dias. Foram consideradas para contagem apenas as placas apresentando entre 30 e 300 colônias, sendo o resultado calculado pela fórmula:

$$\text{Log}_{10}\text{redução} = \log_{10}(\text{UFC}_{t=0}) - \log_{10}\text{UFC}_{t=24h}$$

A atividade antimicrobiana foi interpretada com base na redução logarítmica em relação ao inóculo inicial (t = 0 h). Seguindo os padrões internacionais do CLSI/EUCAST, a atividade bactericida foi definida como uma redução ≥ 3 log₁₀ UFC/mL, equivalente a uma eliminação de 99,9% da população bacteriana original. Reduções entre 1 e 3 log₁₀ foram categorizadas como atividade intermediária, enquanto reduções inferiores a 1 log₁₀ caracterizaram atividade bacteriostática [44]. Todos os experimentos foram realizados em triplicata técnica de cada uma das três réplicas biológicas.

4.11 Análise da Expressão Gênica de Citocinas

Macrófagos RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) foram cultivados em RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% penicilina/estreptomicina, mantidos a 37 °C e 5% CO₂. As células foram infectadas com *Mycobacterium abscessus* (MOI 10:1) e tratadas por 24 h com desferrioxamina (0,5×, 1× e 2× MIC: 4,875–19,5 µg/mL), amicacina (1 µg/mL) e claritromicina (0,007 µg/mL). A manutenção desta MOI é crítica para garantir que a modulação da expressão gênica reflita uma resposta celular homogênea ao patógeno [45]. O RNA total foi extraído com o

RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) e quantificado pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A pureza e integridade do RNA foram asseguradas por meio das razões de absorbância A260/A280 e A260/A230, considerando-se apenas amostras com valores entre 1,8 e 2,2 para normalização subsequente. Após a quantificação, o RNA foi tratado com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para eliminação de DNA genômico. A síntese de cDNA foi realizada com o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) [45,46].

A reação de qPCR foi conduzida usando SYBR Green PCR Master Mix no sistema QuantStudio 3 (Applied Biosystems), avaliando-se os genes: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ e TGF- β . As sequências dos iniciadores (primers) utilizados estão detalhadas na Tabela Suplementar S1 [40]. A eficiência de amplificação para todos os primers foi determinada por curvas de calibração, situando-se entre 95% e 105%. O gene da β -actina foi selecionado como controle endógeno (housekeeping gene) devido à sua estabilidade de expressão previamente validada para a linhagem RAW 264.7 sob condições de infecção micobacteriana. Para este cálculo, o grupo de macrófagos infectados e não tratados foi utilizado como calibrador (unidade de referência = 1,0), permitindo a quantificação do impacto da DFO, AMK e CLA sobre a modulação gênica [45,46].

As diferenças entre grupos foram analisadas por ANOVA seguida de pós-teste de Tukey, considerando $p < 0,05$ como significativo (*) e $p < 0,01$ como altamente significativo (**). Todos os experimentos foram realizados em triplicata técnica de cada uma das três réplicas biológicas ($n=3$).

4.12 Docking Molecular

O potencial de interação entre desferrioxamina, amicacina e claritromicina com a proteína Eis2 de *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* foi avaliado por estudos de docking molecular. As estruturas químicas dos ligantes foram obtidas no PubChem (CID: 2973, 37768 e 84029, respectivamente) e preparadas no Open Babel, com otimização conformacional em 3D pelo campo de força MMFF94 e conversão para o formato PDBQT [47].

A estrutura cristalográfica da proteína Eis2 complexada com Acetil-CoA (PDB ID: 6RFT) foi obtida no Protein Data Bank. O docking foi realizado com o AutoDock Vina, utilizando uma grid box centrada no sítio ativo identificado pelo PrankWeb (coordenadas $x = 29.5$, $y = 7.2$, $z = 59.7$). A afinidade ligante-receptor foi estimada pela variação da energia livre de Gibbs (ΔG), sendo valores mais negativos interpretados como interações mais favoráveis e estáveis (Tabela 4) [47,48]. As interações moleculares foram analisadas no BIOVIA Discovery Studio Visualizer 4.2, com identificação dos principais resíduos envolvidos e caracterização dos tipos de ligação (hidrogênio e interações hidrofóbicas) [47–49].

Tabela 4. Alvos moleculares de *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* utilizados para docking com a DFO

Alvo potencial	Proteína	Família	Modo de ação
Metabolismo lipídico	Enoil-CoA hidratase/isomerase	Hidratase tipo MaoC	Prejuízo à β -oxidação de intermediários derivados do colesterol
Metabolismo energético	Fumarase (Fumarato hidratase)	Líase	Interrupção do ciclo do ácido cítrico por competição com o substrato (malato)
Sobrevivência intracelular / Resistência	Proteína Eis2	N-acetiltransferase (família GNAT)	Bloqueio da acetilação de aminoglicosídeos e dos mecanismos de resistência
Metabolismo energético	Subunidade ϵ da F-ATP sintase (Mab ϵ)	ATP sintase (subunidade ϵ)	Inibição conformacional do acoplamento rotacional, afetando a síntese de ATP
Metabolismo energético	Fumarase (Fumarato hidratase)	Líase	Interrupção do ciclo do ácido cítrico por competição com o substrato (malato)

4.13 Análise ADME e Predição de Propriedades Toxicológicas (in silico)

As propriedades farmacocinéticas como absorção, distribuição, metabolismo e excreção foram avaliados utilizando o servidor SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php#>) [50]. Foram analisados descritores moleculares como massa molecular, número de aceptores e doadores de ligações de hidrogênio, lipofilicidade, refratividade molar, número de ligações rotativas e área de superfície polar topológica, aplicando-se a Regra dos Cinco de Lipinski para estimativa de semelhança com fármacos [51].

A toxicidade foi predita por meio dos servidores admetSAR (<https://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2>) e ProTox-II (https://tox.charite.de/protox3/?site=compound_input), utilizando modelos de similaridade molecular e aprendizado de máquina para prever DL₅₀ oral, hepatotoxicidade, carcinogenicidade, citotoxicidade, imunotoxicidade e mutagenicidade [52,53].

4.14 Predição de Atividades Biológicas (in silico)

As atividades biológicas foram avaliadas utilizando a plataforma PASS Online (Prediction of Activity Spectra for Substances), disponível

em: (www.way2drug.com/passonline). As estruturas químicas em formato SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) foram obtidas do PubChem. Atividades com probabilidade de atividade (P_a) superior à probabilidade de inatividade (P_i) foram consideradas relevantes. Para interpretação dos resultados obtidos pelo software, considerou-se o composto de maior atividade aquele com maior valor de P_a e menor valor de P_i . Estes resultados foram interpretados com base nos critérios: (1) apenas foram consideradas possíveis atividades cujo valor de P_a é maior que o valor de P_i ; (2) Se o valor de P_a for maior que 0,7 a chance de encontrar a atividade experimental é alta; (3) Se o valor de P_a estiver entre 0,5 e 0,7 a chance de encontrar esta atividade experimentalmente é intermediária; (4) se o valor de P_a for menor que 0,5 a chance de encontrar atividade experimental desta molécula é baixa. Atividades com probabilidade de atividade (P_a) superior à probabilidade de inatividade (P_i) foram consideradas relevantes [14,54,55].

4.15 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) de três experimentos biológicos independentes ($n = 3$), cada um realizado em triplicata técnica para assegurar a reprodutibilidade dos dados. A significância estatística das diferenças entre os grupos experimentais foi avaliada por meio da análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias (one-way ou two-way ANOVA), conforme a natureza das variáveis, seguida pelo pós-teste de Tukey para múltiplas comparações. Valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****) foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises estatísticas e a elaboração das representações gráficas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5. Conclusions

Este estudo fornece a primeira avaliação integrada da deferrioxamina (DFO) combinando análises *in silico*, antimicrobianas e imunomoduladoras contra a *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*. Nossos achados demonstram que a DFO atua como um agente de reposicionamento promissor, visando o metabolismo do ferro para fragilizar o patógeno e modular a resposta inflamatória do hospedeiro.

Em síntese, a deferrioxamina demonstrou atividade adjuvante contra Mabs ao restringir o crescimento bacteriano, potencializar a atividade antibiótica, reduzir características associadas à virulência e atenuar a sinalização inflamatória. Estes achados justificam a validação *in vivo* adicional de terapias combinadas baseadas na quelação de ferro.

Este estudo apresenta limitações que devem ser consideradas na interpretação dos resultados. Primeiramente, a ausência de ensaios de suplementação de ferro limita a confirmação direta de que todos os efeitos antimicrobianos observados são mediados exclusivamente pela quelação deste metal. Adicionalmente, o uso da linhagem celular de macrófagos murinos (RAW 264.7) pode não recapitular plenamente a complexidade das respostas imunes humanas.

O estudo baseou-se predominantemente em modelos *in vitro* e utilizou uma única cepa bacteriana, o que impede a generalização imediata para

outras linhagens clínicas ou a avaliação da farmacocinética sistêmica. A curta duração dos ensaios (24 horas) também restringe a extrapolação dos dados para o cenário de infecções micobacterianas crônicas. Investigações futuras são essenciais para validar a eficácia da DFO *in vivo*, particularmente em modelos de coinfeção ou fibrose cística, e para desenvolver formulações farmacêuticas que otimizem sua entrega no ambiente fagossomal.

Author Contributions: E.M.S. and R.C.C.; conceptualization. R.L.d.S.L., F.B.M., P.L.B.T.R., J.T.A.M.M.M.T., C.C.S.S., A.A.V., E.C.M.G., R.S.S.S., R.L.F., C.E.C.N., F.D.O.N., M.C.P.M., J.L.P.F., C.D.L.C., V.M.N., R.C.C and E.M.S.; data curation, investigation, formal analysis, methodology, methodology. R.L.d.S.L., R.C.C and E.M.S.; writing-original draft preparation. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) sob os números de concessão FAPEMA: ACT-02510/23, BEPP-02457/23, Universal-06536/22, PQ-C-12482/25, PPSUS-609/25 e Universidade CEUMA.

Conflicts of Interest: Os autores declaram não haver conflito de interesses financeiros.

Declaration of generative AI and AI-assisted technologies in the manuscript preparation process: During the preparation of this work the author(s) used NotebookLM to conduct the bibliographic and methodological review of the assays used in the article. After using this tool, the author(s) reviewed and edited the content as needed and take(s) full responsibility for the content of the published article.

Referencias

1. Marshall, J.E.; Mercaldo, R.A.; Lipner, E.M.; Prevots, D.R. Nontuberculous Mycobacteria Testing and Culture Positivity in the United States. *BMC Infect Dis* 2024, 24, 288, doi:10.1186/s12879-024-09059-9.
2. Ren, W.; Tan, Y.; Ma, Z.; Shang, Y.; Li, S.; Zhang, X.; Wang, W.; Yao, C.; Yuan, J.; Li, L.; et al. In Vitro Susceptibility of Nontuberculous Mycobacteria in China. *BMC Infectious Diseases* 2024, 24, 118, doi:10.1186/s12879-024-09016-6.
3. Tu, L.J.; Larrow, D.R.; Cohen, M.S. Nontuberculous Mycobacterial Mastoiditis: A Case Report and Literature Review. *Otolaryngology Case Reports* 2024, 30, 100569.
4. D'Sa, L.; Pezzuto, F.; Lunardi, F.; Scalvenzi, F.; Tinè, M.; Comacchio, G.; Giraudo, C.; Calabrese, F. A Complex Case of Pulmonary Silico-Tuberculosis and Review of Literature. *Diagnostics (Basel)* 2023, 13, 2728, doi:10.3390/diagnostics13172728.
5. Victoria, L.; Gupta, A.; Gómez, J.L.; Robledo, J. *Mycobacterium Abscessus* Complex: A Review of Recent Developments in an Emerging Pathogen. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021, 11, doi:10.3389/fcimb.2021.659997.
6. To, K.; Cao, R.; Yegiazaryan, A.; Owens, J.; Venketaraman, V. General Overview of Nontuberculous Mycobacteria Opportunistic Pathogens: *Mycobacterium Avium* and *Mycobacterium Abscessus*. *J Clin Med* 2020, 9, 2541, doi:10.3390/jcm9082541.
7. Cao, D.; Yuan, X.; Jiang, X.; Wu, T.; Xiang, Y.; Ji, Z.; Liu, J.; Dong, X.; Bi, K.; Tønjum, T.; et al. Antimicrobial and Antibiofilm Effects of Bithionol against *Mycobacterium Abscessus*. *Antibiotics (Basel)* 2024, 13, 529, doi:10.3390/antibiotics13060529.

8. Leon-Icaza, S.A.; Bagayoko, S.; Vergé, R.; Iakobachvili, N.; Ferrand, C.; Aydogan, T.; Bernard, C.; Sanchez Dafun, A.; Murris-Espin, M.; Mazières, J.; et al. Druggable Redox Pathways against *Mycobacterium Abscessus* in Cystic Fibrosis Patient-Derived Airway Organoids. *PLoS Pathog* 2023, 19, e1011559, doi:10.1371/journal.ppat.1011559.
9. Conyers, L.E.; Saunders, B.M. Treatment for Non-Tuberculous Mycobacteria: Challenges and Prospects. *Front. Microbiol.* 2024, 15, doi:10.3389/fmicb.2024.1394220.
10. Lanni, A.; Borroni, E.; Iacobino, A.; Russo, C.; Gentile, L.; Fattorini, L.; Giannoni, F. Activity of Drug Combinations against *Mycobacterium Abscessus* Grown in Aerobic and Hypoxic Conditions. *Microorganisms* 2022, 10, 1421, doi:10.3390/microorganisms10071421.
11. Pereira, M.M.R.; de Oliveira, F.M.; da Costa, A.C.; Junqueira-Kipnis, A.P.; Kipnis, A. Ferritin from *Mycobacterium Abscessus* Is Involved in Resistance to Antibiotics and Oxidative Stress. *Appl Microbiol Biotechnol* 2023, 107, 2577–2595, doi:10.1007/s00253-023-12420-8.
12. Kaur, P.; Krishnamurthy, R.V.; Shandil, R.K.; Mohan, R.; Narayanan, S. A Novel Inhibitor against the Biofilms of Non-Tuberculous Mycobacteria. *Pathogens* 2024, 13, 40, doi:10.3390/pathogens13010040.
13. Byrd, T.F.; Chan, E.D. Editorial: *Mycobacterium Abscessus*; The Paradox of Low Pathogenicity and High Virulence. *Front Microbiol* 2022, 13, 943694, doi:10.3389/fmicb.2022.943694.
14. Moraes-Neto, R.N.; Coutinho, G.G.; Ataíde, A.C.S.; de Oliveira Rezende, A.; Nascimento, C.E.C.; de Albuquerque, R.P.; da Rocha, C.Q.; Rêgo, A.S.; de Sousa Cartágenes, M. do S.; Abreu-Silva, A.L.; et al. Ethyl Acetate Fraction of Bixa Orellana and Its Component Ellagic Acid Exert Antibacterial and Anti-Inflammatory Properties against *Mycobacterium Abscessus* Subsp. *Massiliense*. *Antibiotics (Basel)* 2022, 11, 817, doi:10.3390/antibiotics11060817.
15. Boudehen, Y.-M.; Tasrini, Y.; Aguilera-Correa, J.J.; Alcaraz, M.; Kremer, L. Silencing Essential Gene Expression in *Mycobacterium Abscessus* during Infection. *Microbiol Spectr* 2023, 11, e0283623, doi:10.1128/spectrum.02836-23.
16. McQueen, C.F.; Groves, J.T. Toxicity of the Iron Siderophore Mycobactin J in Mouse Macrophages: Evidence for a Hypoxia Response. *J Inorg Biochem* 2022, 227, 111669, doi:10.1016/j.jinorgbio.2021.111669.
17. Origa, R.; Cinus, M.; Pilia, M.P.; Gianesin, B.; Zappu, A.; Orecchia, V.; Clemente, M.G.; Pitturru, C.; Denotti, A.R.; Corongiu, F.; et al. Safety and Efficacy of the New Combination Iron Chelation Regimens in Patients with Transfusion-Dependent Thalassemia and Severe Iron Overload. *J Clin Med* 2022, 11, 2010, doi:10.3390/jcm11072010.
18. Greco, I.; Molchanova, N.; Holmedal, E.; Jenssen, H.; Hummel, B.D.; Watts, J.L.; Håkansson, J.; Hansen, P.R.; Svenson, J. Correlation between Hemolytic Activity, Cytotoxicity and Systemic in Vivo Toxicity of Synthetic Antimicrobial Peptides. *Sci Rep* 2020, 10, 13206, doi:10.1038/s41598-020-69995-9.
19. Borgonovo, F.; Quici, M.; Gidaro, A.; Giustivi, D.; Cattaneo, D.; Gervasoni, C.; Calloni, M.; Martini, E.; La Cava, L.; Antinori, S.; et al. Physicochemical Characteristics of Antimicrobials and Practical Recommendations for Intravenous Administration: A Systematic Review. *Antibiotics (Basel)* 2023, 12, 1338, doi:10.3390/antibiotics12081338.
20. Baysal, E.; Monteiro, H.P.; Sullivan, S.G.; Stern, A. Desferrioxamine Protects Human Red Blood Cells from Hemin-Induced Hemolysis. *Free Radical Biology and Medicine* 1990, 9, 5–10.
21. Costa, D.L.; Amaral, E.P.; Namasivayam, S.; Mittereder, L.R.; Fisher, L.; Bonfim, C.C.; Sardinha-Silva, A.; Thompson, R.W.; Hieny, S.E.; Andrade, B.B. Heme Oxygenase-1 Inhibition Promotes IFN γ - and NOS2-Mediated Control of *Mycobacterium Tuberculosis* Infection. *Mucosal immunology* 2021, 14, 253–266.
22. Yaacoby-Bianu, K.; Gur, M.; Toukan, Y.; Nir, V.; Hakim, F.; Geffen, Y.; Bentur, L. Compassionate Nitric Oxide Adjuvant Treatment of Persistent Mycobacterium Infection in Cystic Fibrosis Patients. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2018, 37, 336–338.
23. Lee, J.-Y.; Lee, M.-S.; Kim, D.-J.; Yang, S.-J.; Lee, S.-J.; Noh, E.-J.; Shin, S.J.; Park, J.-H. Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2 Contributes to Limiting Growth of *Mycobacterium Abscessus* in the

- Lung of Mice by Regulating Cytokines and Nitric Oxide Production. *Frontiers in Immunology* 2017, 8, 1477.
24. Houghton, J.L.; Green, K.D.; Pricer, R.E.; Mayhoub, A.S.; Garneau-Tsodikova, S. Unexpected N-Acetylation of Capreomycin by Mycobacterial Eis Enzymes. *J Antimicrob Chemother* 2013, 68, 800–805, doi:10.1093/jac/dks497.
 25. Garzan, A.; Willby, M.J.; Ngo, H.X.; Gajadeera, C.S.; Green, K.D.; Holbrook, S.Y.L.; Hou, C.; Posey, J.E.; Tsodikov, O.V.; Garneau-Tsodikova, S. Combating Enhanced Intracellular Survival (Eis)-Mediated Kanamycin Resistance of *Mycobacterium Tuberculosis* by Novel Pyrrolo[1,5-a]Pyrazine-Based Eis Inhibitors. *ACS Infect Dis* 2017, 3, 302–309, doi:10.1021/acsinfecdis.6b00193.
 26. Abebe, G.M. The Role of Bacterial Biofilm in Antibiotic Resistance and Food Contamination. *International Journal of Microbiology* 2020, 2020, 1–10, doi:10.1155/2020/1705814.
 27. Basher, M.; Gur, M.; Meir, M. Insights on the Pathogenesis of *Mycobacterium Abscessus* Infection in Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Clinical Medicine* 2025, 14, 3492, doi:10.3390/jcm14103492.
 28. Chattopadhyay, M.K.; Jagannadham, M.V. Vesicles-Mediated Resistance to Antibiotics in Bacteria. *Frontiers in microbiology* 2015, 6, 758.
 29. Vermeire, C.A.; Tan, X.; Liang, Y.; Kotey, S.K.; Rogers, J.; Hartson, S.D.; Liu, L.; Cheng, Y. *Mycobacterium Abscessus* Extracellular Vesicles Increase Mycobacterial Resistance to Clarithromycin in Vitro. *Proteomics* 2024, 24, e2300332, doi:10.1002/pmic.202300332.
 30. Ferrell, K.C.; Johansen, M.D.; Triccas, J.A.; Counoupas, C. Virulence Mechanisms of *Mycobacterium Abscessus*: Current Knowledge and Implications for Vaccine Design. *Front. Microbiol.* 2022, 13, doi:10.3389/fmicb.2022.842017.
 31. Daley, C.L.; Iaccarino, J.M.; Lange, C.; Cambau, E.; Richard J. Wallace, J.; Andrejak, C.; Böttger, E.C.; Brozek, J.; Griffith, D.E.; Guglielmetti, L.; et al. Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease: An Official ATS/ERS/ESCMID/IDSA Clinical Practice Guideline. *European Respiratory Journal* 2020, 56, doi:10.1183/13993003.00535-2020.
 32. Kim, K.H.; An, D.R.; Song, J.; Yoon, J.Y.; Kim, H.S.; Yoon, H.J.; Im, H.N.; Kim, J.; Kim, D.J.; Lee, S.J.; et al. *Mycobacterium Tuberculosis* Eis Protein Initiates Suppression of Host Immune Responses by Acetylation of DUSP16/MKP-7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012, 109, 7729–7734, doi:10.1073/pnas.1120251109.
 33. Tseng, C.-Y.; Sun, M.-F.; Li, T.-C.; Lin, C.-T. Effect of *Coptis Chinensis* on Biofilm Formation and Antibiotic Susceptibility in *Mycobacterium Abscessus*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2020, 2020, 9754357, doi:10.1155/2020/9754357.
 34. Andries, K.; Verhasselt, P.; Guillemont, J.; Göhlmann, H.W.H.; Neefs, J.-M.; Winkler, H.; Van Gestel, J.; Timmerman, P.; Zhu, M.; Lee, E.; et al. A Diarylquinoline Drug Active on the ATP Synthase of *Mycobacterium Tuberculosis*. *Science* 2005, 307, 223–227, doi:10.1126/science.1106753.
 35. Haagsma, A.C.; Abdillahi-Ibrahim, R.; Wagner, M.J.; Krab, K.; Vergauwen, K.; Guillemont, J.; Andries, K.; Lill, H.; Koul, A.; Bald, D. Selectivity of TMC207 towards Mycobacterial ATP Synthase Compared with That towards the Eukaryotic Homologue. *Antimicrob Agents Chemother* 2009, 53, 1290–1292, doi:10.1128/AAC.01393-08.
 36. Abdalla, M.Y.; Switzer, B.L.; Goss, C.H.; Aitken, M.L.; Singh, P.K.; Britigan, B.E. Gallium Compounds Exhibit Potential as New Therapeutic Agents against *Mycobacterium Abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015, 59, 4826–4834, doi:10.1128/AAC.00331-15.
 37. Oh, J.; Choi, S.; Seo, H.; Kim, D.H.; Kim, H.; Lee, D.; Jang, J.; Jung, S.; Lee, J.-Y.; Kim, Z.; et al. VLX600, an Anticancer Iron Chelator, Exerts Antimicrobial Effects on *Mycobacterium Abscessus* Infections. *Microbiol Spectr* 2025, 13, e00719-25, doi:10.1128/spectrum.00719-25.
 38. Siegrist, M.S.; Steigedal, M.; Ahmad, R.; Mehra, A.; Dragset, M.S.; Schuster, B.M.; Philips, J.A.; Carr, S.A.; Rubin, E.J. Mycobacterial Esx-3 Requires Multiple Components for Iron Acquisition. *mBio* 2014, 5, e01073-14, doi:10.1128/mBio.01073-14.

39. Chao, A.; Sieminski, P.J.; Owens, C.P.; Goulding, C.W. Iron Acquisition in *Mycobacterium Tuberculosis*. *Chem. Rev.* 2019, 119, 1193–1220, doi:10.1021/acs.chemrev.8b00285.
40. Sousa, E.M.D.; Bortoli, F.B.D.; Amaral, E.P.; Batista, A.C.; Kipnis, T.L.; Cardoso, A.M.; Kipnis, A.; Junqueira-Kipnis, A.P. Acute Immune Response to *Mycobacterium Massiliense* in C57BL/6 and BALB/c Mice. *Infect Immun* 2010, 78, 1571–1581, doi:10.1128/IAI.00731-09.
41. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Recommendations for MIC Determination of Colistin (Polymyxin E) Available online: https://www.eucast.org/fileadmin/eucast/pdf/guidance_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf (accessed on 14 April 2026).
42. Takei, S.; Ihara, H.; Togo, S.; Nakamura, A.; Fujimoto, Y.; Watanabe, J.; Kurokawa, K.; Shibayama, K.; Sumiyoshi, I.; Ochi, Y.; et al. The Synergetic Effect of Imipenem-Clarithromycin Combination in the *Mycobacteroides Abscessus* Complex. *BMC Microbiology* 2020, 20, 316, doi:10.1186/s12866-020-02000-5.
43. Faboro, T.; Daniel, J. Biofilm Formation and Polar Lipid Biosynthesis in *Mycobacterium Abscessus* Are Inhibited by Naphthylmethylpiperazine. *PLoS One* 2024, 19, e0311669, doi:10.1371/journal.pone.0311669.
44. Athman, J.J.; Wang, Y.; McDonald, D.J.; Boom, W.H.; Harding, C.V.; Wearsch, P.A. Bacterial Membrane Vesicles Mediate the Release of *Mycobacterium Tuberculosis* Lipoglycans and Lipoproteins from Infected Macrophages. *J Immunol* 2015, 195, 1044–1053, doi:10.4049/jimmunol.1402894.
45. Cheng, Y.; Kiene, N.J.; Tatarian, A.; Eix, E.F.; Schorey, J.S. Host Cytosolic RNA Sensing Pathway Promotes T Lymphocyte-Mediated Mycobacterial Killing in Macrophages. *PLoS Pathog* 2020, 16, e1008569, doi:10.1371/journal.ppat.1008569.
46. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *methods* 2001, 25, 402–408.
47. O'Boyle, N.M.; Banck, M.; James, C.A.; Morley, C.; Vandermeersch, T.; Hutchison, G.R. Open Babel: An Open Chemical Toolbox. *J Cheminform* 2011, 3, 33, doi:10.1186/1758-2946-3-33.
48. Trott, O.; Olson, A.J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J Comput Chem* 2010, 31, 455–461, doi:10.1002/jcc.21334.
49. Dassault Systèmes Discovery Studio Visualizer, v. 4.2. Dassault Systèmes 2015.
50. Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Sci Rep* 2017, 7, 42717, doi:10.1038/srep42717.
51. Chen, X.; Li, H.; Tian, L.; Li, Q.; Luo, J.; Zhang, Y. Analysis of the Physicochemical Properties of Acaricides Based on Lipinski's Rule of Five. *Journal of Computational Biology* 2020, 27, 1397–1406, doi:10.1089/cmb.2019.0323.
52. Banerjee, P.; Eckert, A.O.; Schrey, A.K.; Preissner, R. ProTox-II: A Webserver for the Prediction of Toxicity of Chemicals. *Nucleic Acids Research* 2018, 46, W257–W263, doi:10.1093/nar/gky318.
53. Yang, H.; Lou, C.; Sun, L.; Li, J.; Cai, Y.; Wang, Z.; Li, W.; Liu, G.; Tang, Y. admetSAR 2.0: Web-Service for Prediction and Optimization of Chemical ADMET Properties. *Bioinformatics* 2019, 35, 1067–1069, doi:10.1093/bioinformatics/bty707.
54. Filimonov, D.A.; Lagunin, A.A.; Gloriovova, T.A.; Rudik, A.V.; Druzhilovskii, D.S.; Pogodin, P.V.; Poroikov, V.V. Prediction of the Biological Activity Spectra of Organic Compounds Using the Pass Online Web Resource. *Chem Heterocycl Comp* 2014, 50, 444–457, doi:10.1007/s10593-014-1496-1.
55. Kim, S.; Chen, J.; Cheng, T.; Gindulyte, A.; He, J.; He, S.; Li, Q.; Shoemaker, B.A.; Thiessen, P.A.; Yu, B.; et al. PubChem in 2021: New Data Content and Improved Web Interfaces. *Nucleic Acids Research* 2021, 49, D1388–D1395, doi:10.1093/nar/gkaa971.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo investigou a desferrioxamina (DFO) como uma abordagem terapêutica promissora contra *Mycobacterium abscessus subsp. massiliense*, um patógeno emergente e intrinsecamente resistente. A prevalência crescente de Mabs e a ineficácia dos tratamentos atuais, que são longos, tóxicos e frequentemente falham, sublinham a urgência de novas estratégias. A DFO, tradicionalmente utilizada como quelante de ferro, foi investigada neste estudo considerando a dependência do ferro para a virulência e patogênese das micobactérias.

As predições *in silico* corroboraram o papel da DFO como antagonista de ferro e indicaram sua afinidade de ligação com a enzima Eis2 de Mabs, uma N-acetiltransferase crucial para a resistência bacteriana. Essa interação molecular sugere um mecanismo de ação complementar, potencialmente interferindo na resistência mediada por acetilação, como a que afeta a amicacina. Os resultados *in vitro* demonstraram um efeito bacteriostático da DFO contra Mabs, com uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 9,75 µg/mL. Contudo, a ausência de Concentração Bactericida Mínima (CBM) nas concentrações testadas indica que a DFO, isoladamente, não exerceu atividade bactericida.

Apesar do potencial terapêutico, este estudo também destacou desafios relevantes, como a toxicidade e a baixa biodisponibilidade da DFO. As predições *in silico* confirmaram o perfil de segurança conhecido da DFO, que inclui toxicidades significativas em doses elevadas. Sua baixa absorção gastrointestinal e permeabilidade, juntamente com a hidrofobicidade do complexo DFO-ferro, podem limitar sua ação intracelular, um aspecto crítico para combater micobactérias intracelulares.

Os resultados obtidos, embora promissores e exigindo validação experimental mais aprofundada, estabelecem uma base sólida para futuras investigações. Para avançar, é fundamental que os próximos estudos priorizem a validação dos achados de forma mais precisa as condições *in vivo*, para otimizando regimes posológicos e vias de administração para maximizar a entrega ao sítio da infecção e mitigar a toxicidade.

O foco na utilização da DFO em terapia combinada com antimicrobianos de primeira linha contra Mabs é essencial, explorando o sinergismo. Igualmente importante é o desenvolvimento e a avaliação de novas formulações da DFO, como sistemas de liberação direcionada, que possam superar as limitações farmacocinéticas e de toxicidade, aprimorando sua biodisponibilidade e entrega intracelular.

Por fim, uma investigação mais aprofundada dos mecanismos moleculares pelos quais a DFO interfere no metabolismo do ferro bacteriano e interage com alvos bacterianos específicos. O objetivo final dessas pesquisas é desvendar completamente os mecanismos de ação da DFO, consolidando seu papel como uma terapia adjuvante eficaz no tratamento de infecções complexas e de difícil manejo causadas por Mabs, abrindo novas perspectivas para superar a resistência antimicrobiana e melhorar os desfechos clínicos.

Na perspectiva de manter a produtividade, os pesquisadores confeccionaram os três artigos científicos, e guiaram-se pelo Regime Interno do Programa de Pós Graduação da Universidade Federal do Maranhão, que garante a defesa na presença de publicação do aluno como autor ou co-autor juntamente ao orientador.

7 CONCLUSÃO

Este trabalho analisou, de forma abrangente, a atividade antimicrobiana e os possíveis mecanismos de ação da desferrioxamina (DFO) contra *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*, integrando evidências de estudos *in silico*, *in vitro* e discussões sobre potenciais aplicações *in vivo*. Ao longo dos três capítulos que compõem esta tese, foram exploradas diferentes dimensões do tema e identificados avanços relevantes, mas também desafios e limitações importantes que direcionam as investigações futuras.

No Capítulo I, por meio de uma revisão bibliométrica e crítica, evidenciou-se o crescente interesse científico em sideróforos e suas aplicações como agentes antimicrobianos, situando a DFO como uma alternativa promissora frente à resistência bacteriana. Esta revisão também destacou as lacunas existentes no conhecimento sobre as interações moleculares específicas da DFO com alvos bacterianos de Mabs, justificando os ensaios subsequentes.

No Capítulo II, foram detalhados aspectos fundamentais da biologia e patogenicidade de Mabs, incluindo a formação de biofilme e os desafios impostos pela resposta imune do hospedeiro. Estes elementos fornecem um pano de fundo essencial para a compreensão do papel potencial da DFO como agente coadjuvante na terapia antimicrobiana.

No Capítulo III, os ensaios *in silico* demonstraram alta afinidade da DFO por alvos enzimáticos críticos de Mabs, como a enzima Eis2, sugerindo um possível mecanismo de ação sinérgico com antibióticos como a amicacina. Nos ensaios *in vitro*, a DFO apresentou efeito bacteriostático, com uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 9,75 µg/mL, além de capacidade de modular a expressão de citocinas pró-inflamatórias em células infectadas. Contudo, não foram observados efeitos bactericidas isolados, indicando que a DFO, sozinha, pode não ser suficiente para erradicar a infecção em concentrações clínicas.

Apesar desses achados encorajadores, este estudo apresenta limitações importantes. Primeiramente, os experimentos *in vitro* não contemplam completamente a complexidade do ambiente infeccioso em modelos *in vivo*, onde fatores farmacocinéticos e farmacodinâmicos podem alterar significativamente a eficácia da DFO. Além disso, a toxicidade moderada da DFO e sua baixa biodisponibilidade sistêmica permanecem obstáculos relevantes, que devem ser mitigados antes de qualquer translação clínica. A ausência de ensaios em modelos animais impede, por ora, inferências diretas sobre a eficácia terapêutica em infecções pulmonares ou sistêmicas por Mabs.

Próximos passos fundamentais incluem a validação dos efeitos observados em modelos animais relevantes, avaliando regimes combinados com antibióticos padrão para verificar sinergismo terapêutico e mitigação da toxicidade. Igualmente, pesquisas sobre formulações farmacêuticas avançada, como sistemas de liberação controlada ou nanopartículas que poderão otimizar a entrega intracelular da DFO, ampliando seu potencial como terapia adjuvante. Estudos de farmacocinética e farmacodinâmica são imprescindíveis para estabelecer esquemas posológicos seguros e eficazes.

Em suma, esta tese estabelece uma base robusta e consistente para futuras investigações, consolidando a desferrioxamina como um candidato promissor na terapia combinada contra Mabs. O fortalecimento de estratégias que integrem conhecimento molecular, testes em modelos biológicos complexos e inovações farmacêuticas será crucial para enfrentar a resistência antimicrobiana e melhorar os desfechos clínicos em infecções de difícil manejo.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, M.; ALANZI, A. R.; SAHIBZADA, K. I.; NAWAZ, M.; FATIMA, G.; WEI, D.-Q. Identification of novel inhibitors targeting *Mycobacterium abscessus* InhA through virtual screening, docking, and molecular dynamic simulations. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 15, p. 12795, 14 abr. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-97513-2>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11997171/>. Acesso em: 16 abr. 2026.
- ABDELAAL, H. F. M.; CHAN, E. D.; YOUNG, L.; BALDWIN, S. L.; COLER, R. N. *Mycobacterium abscessus*: It's Complex. **Microorganisms**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 1454, 19 jul. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071454>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/10/7/1454>. Acesso em: 12 abr. 2026.
- ABDUL-HAMMED, M.; ADEDOTUN, I. O.; AKINBOADE, M. W.; ADEGBOYEGA, T. A.; SALAUDEEN, O. M. Antibacterial activities, PASS prediction and ADME analysis of phytochemicals from *Curcubita moschata*, *Curcubita maxima*, and *Irvingia gabonensis*: insights from in silico studies. **In Silico Pharmacology**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 65, 17 jul. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40203-024-00234-z>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11254879/>. Acesso em: 17 abr. 2026.
- ADEKAMBI, T.; SASSI, M.; VAN INGEN, J.; DRANCOURT, M. Reinstating *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* as species of the *Mycobacterium abscessus* complex. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 67, n. 8, p. 2726–2730, 1 ago. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002011>. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.002011>. Acesso em: 12 abr. 2026.
- ARAÚJO, R. V. D.; SANTOS, S. S.; SANCHES, L. M.; GIAROLLA, J.; EL SEOUD, O.; FERREIRA, E. I. Malaria and tuberculosis as diseases of neglected populations: state of the art in chemotherapy and advances in the search for new drugs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 115, p. e200229, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/0074-02760200229>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762020000100201&lng=en. Acesso em: 12 abr. 2026.
- ATHMAN, J. J.; WANG, Y.; MCDONALD, D. J.; BOOM, W. H.; HARDING, C. V.; WEARSCH, P. A. Bacterial membrane vesicles mediate the release of *Mycobacterium tuberculosis* lipoglycans and lipoproteins from infected macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [S. l.], v. 195, n. 3, p. 1044–1053, 1 ago. 2015. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402894>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4506856/>. Acesso em: 6 nov. 2025.
- AZIZ, D. B.; GO, M. L.; DICK, T. Rifabutin Suppresses Inducible Clarithromycin Resistance in *Mycobacterium abscessus* by Blocking Induction of whiB7 and erm41. **Antibiotics**, Basel, Switzerland, v. 9, n. 2, p. 72, 10 fev. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020072>.
- BABRAK, L.; DANELISHVILI, L.; ROSE, S. J.; BERMUDEZ, L. E. Microaggregate-associated protein involved in invasion of epithelial cells by *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*. **Virulence**, [S. l.], v. 6, n. 7, p. 694–703, 3 out. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1072676>. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1072676>. Acesso em: 17 abr. 2026.

BANERJEE, P.; ECKERT, A. O.; SCHREY, A. K.; PREISSNER, R. ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 46, n. W1, p. W257–W263, 2 jul. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gky318>. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/46/W1/W257/4990033>. Acesso em: 14 abr. 2026.

BANERJEE, S.; DATTA, R. Localized Leishmania major infection disrupts systemic iron homeostasis that can be controlled by oral iron supplementation. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 299, n. 8, 1 ago. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105064>. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(23\)02092-6/abstract](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(23)02092-6/abstract). Acesso em: 14 abr. 2026.

BAR-OZ, M.; MEIR, M.; BARKAN, D. Virulence-Associated Secretion in *Mycobacterium abscessus*. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 13, 8 jul. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.938895>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2022.938895/full>. Acesso em: 14 abr. 2026.

BELARDINELLI, J. M.; LI, W.; AVANZI, C.; ANGALA, S. K.; LIAN, E.; WIERSMA, C. J.; PALČEKOVÁ, Z.; MARTIN, K. H.; ANGALA, B.; DE MOURA, V. C. N.; KERNS, C.; JONES, V.; GONZALEZ-JUARRERO, M.; DAVIDSON, R. M.; NICK, J. A.; BORLEE, B. R.; JACKSON, M. Unique Features of *Mycobacterium abscessus* Biofilms Formed in Synthetic Cystic Fibrosis Medium. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 12, 29 out. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.743126>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2021.743126/full>. Acesso em: 14 abr. 2026.

BORN, S. E. M.; REICHLEN, M. J.; BARTEK, I. L.; BENOIT, J. B.; FRANK, D. N.; VOSKUIL, M. I. Population heterogeneity in *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium abscessus*. **Microbiology**, [S. l.], v. 169, n. 10, 20 out. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.001402>. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.001402>. Acesso em: 12 abr. 2026.

BRENNAN-KROHN, T.; KIRBY, J. E. When One Drug Is Not Enough: Context, Methodology, and Future Prospects in Antibacterial Synergy Testing. **Clinics in laboratory medicine**, [S. l.], v. 39, n. 3, p. 345–358, set. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cll.2019.04.002>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6686866/>. Acesso em: 14 abr. 2026.

BURIAN, J.; RAMÓN-GARCÍA, S.; SWEET, G.; GÓMEZ-VELASCO, A.; AV-GAY, Y.; THOMPSON, C. J. The Mycobacterial Transcriptional Regulator whiB7 Gene Links Redox Homeostasis and Intrinsic Antibiotic Resistance. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 287, n. 1, p. 299–310, jan. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.302588>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002192582053514X>. Acesso em: 13 abr. 2026.

BYRD, T. F.; CHAN, E. D. Editorial: *Mycobacterium abscessus*; The Paradox of Low Pathogenicity and High Virulence. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 13, 10 jun. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.943694>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2022.943694/full>. Acesso em: 13 abr. 2026.

BYTHROW, G. V.; FARHAT, M. F.; LEVENDOSKY, K.; MOHANDAS, P.; GERMAIN, G. A.; YOO, B.; QUADRI, L. E. N. *Mycobacterium abscessus* Mutants with a Compromised Functional Link between the Type VII ESX-3 System and an Iron Uptake Mechanism Reliant on an Unusual Mycobactin Siderophore. **Pathogens**, Basel, Switzerland, v. 11, n. 9, p. 953, 23 ago. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens11090953>.

CAHILL, C.; O'CONNELL, F.; GOGAN, K. M.; COX, D. J.; BASDEO, S. A.; O'SULLIVAN, J.; GORDON, S. V.; KEANE, J.; PHELAN, J. J. The Iron Chelator Desferrioxamine Increases the Efficacy of Bedaquiline in Primary Human Macrophages Infected with BCG. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 6, p. 2938, 13 mar. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22062938>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/6/2938>. Acesso em: 12 abr. 2026.

CAO, D.; YUAN, X.; JIANG, X.; WU, T.; XIANG, Y.; JI, Z.; LIU, J.; DONG, X.; BI, K.; TØNJUM, T.; XU, K.; ZHANG, Y. Antimicrobial and Antibiofilm Effects of Bithionol against *Mycobacterium abscessus*. **Antibiotics**, [S. l.], v. 13, n. 6, p. 529, 5 jun. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics13060529>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/13/6/529>. Acesso em: 12 abr. 2026.

CAPPELLINI, M. D. Long-term efficacy and safety of deferasirox. **Blood Reviews**, [S. l.], v. 22, p. S35–S41, 1 dez. 2008. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0268-960X\(08\)70007-9](https://doi.org/10.1016/S0268-960X(08)70007-9). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268960X08700079>. Acesso em: 16 abr. 2026.

CARNEIRO, M. dos S. **Perfil molecular e de suscetibilidade a claritromicina do complexo *Mycobacterium abscessus***. 2016. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2016. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/149494>. Acesso em: 16 abr. 2026.

CARNEIRO, M. dos S.; NUNES, L. de S.; DAVID, S. M. M. D.; DIAS, C. F.; BARTH, A. L.; UNIS, G. Nontuberculous mycobacterial lung disease in a high tuberculosis incidence setting in Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [S. l.], v. 44, p. 106–111, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1806-37562017000000213>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpneu/a/FNMxhMXRDVMYHHf4L8GKYfM/?lang=en>. Acesso em: 12 abr. 2026.

CHAKRABORTY, P.; BAJELI, S.; KAUSHAL, D.; RADOTRA, B. D.; KUMAR, A. Biofilm formation in the lung contributes to virulence and drug tolerance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Communications**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1606, 11 mar. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21748-6>.

CHAKRABORTY, P.; KUMAR, A. The extracellular matrix of mycobacterial biofilms: could we shorten the treatment of mycobacterial infections? **Microbial Cell**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 105–122, 4 fev. 2019. DOI: <https://doi.org/10.15698/mic2019.02.667>. Disponível em: <http://microbialcell.com/researcharticles/2019a-chakraborty-microbial-cell/>. Acesso em: 17 abr. 2026.

CHANDRASEKARAN, P.; SARAVANAN, N.; BETHUNAICKAN, R.; TRIPATHY, S. Malnutrition: Modulator of Immune Responses in Tuberculosis. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 8, p. 1316, 18 out. 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01316>. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01316/full>. Acesso em: 12 abr. 2026.

CHEN, X.; LI, H.; TIAN, L.; LI, Q.; LUO, J.; ZHANG, Y. Analysis of the Physicochemical Properties of Acaricides Based on Lipinski's Rule of Five. **Journal of Computational Biology**, [S. l.], v. 27, n. 9, p. 1397–1406, 1 set. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1089/cmb.2019.0323>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1089/cmb.2019.0323>. Acesso em: 14 abr. 2026.

CHENG, Y.; KIENE, N. J.; TATARIAN, A.; EIX, E. F.; SCHOREY, J. S. Host cytosolic RNA sensing pathway promotes T Lymphocyte-mediated mycobacterial killing in macrophages. **PLOS Pathogens**, [S. l.], v. 16, n. 5, p. e1008569, 28 maio 2020. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008569>. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1008569>. Acesso em: 14 abr. 2026.

CHENG, Y.; SCHOREY, J. S. Extracellular vesicles deliver Mycobacterium RNA to promote host immunity and bacterial killing. **The EMBO Reports**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. EMBR201846613, 25 jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.15252/embr.201846613>. Disponível em: <https://doi.org/10.15252/embr.201846613>. Acesso em: 16 abr. 2026.

CODD, R.; RICHARDSON-SANCHEZ, T.; TELFER, T. J.; GOTSBACHER, M. P. Advances in the Chemical Biology of Desferrioxamine B. **ACS Chemical Biology**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 11–25, 19 jan. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1021/acschembio.7b00851>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acschembio.7b00851>. Acesso em: 12 abr. 2026.

CONYERS, L. E.; SAUNDERS, B. M. Treatment for non-tuberculous mycobacteria: challenges and prospects. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 15, p. 1394220, 3 jun. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1394220>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2024.1394220/full>. Acesso em: 12 abr. 2026.

DAHL, V. N.; MØLHAVE, M.; FLØE, A.; VAN INGEN, J.; SCHÖN, T.; LILLEBAEK, T.; ANDERSEN, A. B.; WEJSE, C. Global trends of pulmonary infections with nontuberculous mycobacteria: a systematic review. **International Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 125, p. 120–131, 1 dez. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.10.013>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971222005513>. Acesso em: 12 abr. 2026.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, p. 42717, 3 mar. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep42717>.

DALEY, C. L.; IACCARINO, J. M.; LANGE, C.; CAMBAU, E.; RICHARD J. WALLACE, J.; ANDREJAK, C.; BÖTTGER, E. C.; BROZEK, J.; GRIFFITH, D. E.; GUGLIELMETTI, L.; HUITT, G. A.; KNIGHT, S. L.; LEITMAN, P.; MARRAS, T. K.; OLIVIER, K. N.; SANTIN, M.; STOUT, J. E.; TORTOLI, E.; INGEN, J. van; WAGNER, D.; WINTHROP, K. L. Treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: an official ATS/ERS/ESCMID/IDSA clinical practice guideline. **European Respiratory Journal**, [S. l.], v. 56, n. 1, Seção ERS Official Documents, 7 jul. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1183/13993003.00535-2020>. Disponível em: <https://publications.ersnet.org/content/erj/56/1/2000535>. Acesso em: 1 nov. 2025.

DASSAULT SYSTÈMES. Discovery Studio Visualizer, v. 4.2. **Dassault Systèmes**, San Diego, CA, USA, 2015.

DE OLIVEIRA, F. M.; CORRÊA, V. L. R.; CORRÊA, A. F.; DA COSTA, A. C.; PROCOPIO, V. O.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; KIPNIS, A. The mycma_1113 Gene from *Mycobacterium abscessus* subsp. massiliense is Related to Siderophore Synthesis. **Indian Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 59, n. 2, p. 180–187, jun. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12088-019-00788-z>. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12088-019-00788-z>. Acesso em: 13 abr. 2026.

DEGIACOMI, G.; SAMMARTINO, J. C.; CHIARELLI, L. R.; RIABOVA, O.; MAKAROV, V.; PASCA, M. R. *Mycobacterium abscessus*, an Emerging and Worrisome Pathogen among Cystic Fibrosis Patients. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 23, p. 5868, 22 nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20235868>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/23/5868>. Acesso em: 12 abr. 2026.

DING, Z.; ZHANG, Y.; GUO, P.; DUAN, T.; CHENG, W.; GUO, Y.; ZHENG, X.; LU, G.; LU, Q.; KAPLAN, D. L. Injectable Desferrioxamine-Laden Silk Nanofiber Hydrogels for Accelerating Diabetic Wound Healing. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 1147–1158, 8 mar. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c01502>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsbiomaterials.0c01502>. Acesso em: 12 abr. 2026.

DOKIC, A.; PETERSON, E.; ARRIETA-ORTIZ, M. L.; PAN, M.; DI MAIO, A.; BALIGA, N.; BHATT, A. *Mycobacterium abscessus* biofilms produce an extracellular matrix and have a distinct mycolic acid profile. **The Cell Surface**, [S. l.], v. 7, p. 100051, dez. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2021.100051>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468233021000049>. Acesso em: 17 abr. 2026.

DUBOIS, V.; PAWLIK, A.; BORIES, A.; MOIGNE, V. L.; SISMEIRO, O.; LEGENDRE, R.; VARET, H.; RODRÍGUEZ-ORDÓÑEZ, M. del P.; GAILLARD, J.-L.; COPPÉE, J.-Y.; BROSCHE, R.; HERRMANN, J.-L.; GIRARD-MISGUICH, F. *Mycobacterium abscessus* virulence traits unraveled by transcriptomic profiling in amoeba and macrophages. **PLOS Pathogens**, [S. l.], v. 15, n. 11, p. e1008069, 8 nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008069>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1008069>. Acesso em: 13 abr. 2026.

ERINMEZ, M.; ZER, Y. In vitro effects of deferrioxamine on antibiotic susceptibility in Gram-negative bacteria. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, [S. l.], v. 33, n. 5, p. 491–497, 2024. DOI: <https://doi.org/10.17219/acem/169794>. Disponível em: <https://advances.umw.edu.pl/en/article/2024/33/5/491/>. Acesso em: 16 abr. 2026.

FABORO, T.; DANIEL, J. Biofilm formation and polar lipid biosynthesis in *Mycobacterium abscessus* are inhibited by naphthylmethylpiperazine. **PloS One**, [S. l.], v. 19, n. 11, p. e0311669, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0311669>.

FARIA, S.; JOAO, I.; JORDAO, L. General Overview on Nontuberculous Mycobacteria, Biofilms, and Human Infection. **Journal of Pathogens**, [S. l.], v. 2015, p. 809014, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/809014>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4649093/>. Acesso em: 17 abr. 2026.

FENNELLY, K. P.; OJANO-DIRAIN, C.; YANG, Q.; LIU, L.; LU, L.; PROGULSKA-FOX, A.; WANG, G. P.; ANTONELLI, P.; SCHULTZ, G. Biofilm Formation by *Mycobacterium abscessus* in a Lung Cavity. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 193, n. 6, p. 692–693, 15 mar. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1164/rccm.201508->

1586IM. Disponível em: <https://doi.org/10.1164/rccm.201508-1586IM>. Acesso em: 17 abr. 2026.

FERREIRA, L. F. G. R. **Desenvolvimento e implementação de software para aplicação de grids computacionais em modelagem para inovação terapêutica**. 21 fev. 2013. 137 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE, 21 fev. 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/13193>. Acesso em: 16 abr. 2026.

FERRELL, K. C.; JOHANSEN, M. D.; TRICCAS, J. A.; COUNOUPAS, C. Virulence Mechanisms of *Mycobacterium abscessus*: Current Knowledge and Implications for Vaccine Design. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 13, 3 mar. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.842017>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2022.842017/full>. Acesso em: 12 abr. 2026.

FERRIS, R. A. Current understanding of bacterial biofilms and latent infections: A clinical perspective. **Rev. bras. reprod. anim**, [S. l.], v. 41, p. 74–80, 2017. Disponível em: [http://www.cbpa.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v41/n1/p074-080%20\(RB635\).pdf](http://www.cbpa.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v41/n1/p074-080%20(RB635).pdf). Acesso em: 17 abr. 2026.

FILIMONOV, D. A.; LAGUNIN, A. A.; GLORIOZOVA, T. A.; RUDIK, A. V.; DRUZHILOVSKII, D. S.; POGODIN, P. V.; POROIKOV, V. V. Prediction of the Biological Activity Spectra of Organic Compounds Using the Pass Online Web Resource. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, [S. l.], v. 50, n. 3, p. 444–457, jun. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10593-014-1496-1>. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10593-014-1496-1>. Acesso em: 17 abr. 2026.

FISHER, S. A.; BRUNSKILL, S. J.; DOREE, C.; GOODING, S.; CHOWDHURY, O.; ROBERTS, D. J. Desferrioxamine mesylate for managing transfusional iron overload in people with transfusion-dependent thalassaemia. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [S. l.], v. 2013, n. 8, 21 ago. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004450.pub3>. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD004450.pub3>. Acesso em: 14 abr. 2026.

FLORA, S. J. S.; PACHAURI, V. Chelation in Metal Intoxication. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [S. l.], v. 7, n. 7, p. 2745–2788, jul. 2010. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph7072745>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2922724/>. Acesso em: 14 abr. 2026.

FLORES, V. da C. **Resistência de biofilmes formados por micobactérias de crescimento rápido frente a antimicrobianos**. 28 mar. 2018. 91 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 28 mar. 2018. Disponível em: <http://repositorio.ufsm.br/handle/1/20207>. Acesso em: 16 abr. 2026.

FLYNN, J. L.; CHAN, J. Immunology of Tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 93–129, abr. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.93>. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.19.1.93>. Acesso em: 16 abr. 2026.

FONG, T. C.; SAW, W.-G.; MATHIYAZAKAN, V.; WONG, C. F.; GRÜBER, G. The *Mycobacterium abscessus* F-ATP synthase structure reveals mechanistic elements enabling

rational drug design to combat NTM lung disease. **Structure**, London, England : 1993, v. 34, n. 3, p. 508-520.e3, 5 mar. 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.str.2025.12.005>.

FOREMAN, M.; KOLODKIN-GAL, I.; BARKAN, D. A Pivotal Role for Mycobactin/mbtE in Growth and Adaptation of *Mycobacterium abscessus*. **Microbiology Spectrum**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. e02623-22, 2 nov. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1128/spectrum.02623-22>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.02623-22>. Acesso em: 13 abr. 2026.

GONÇALVES, R. M.; MONGES, B. E. D.; OSHIRO, K. G. N.; CÂNDIDO, E. de S.; PIMENTEL, J. P. F.; FRANCO, O. L.; CARDOSO, M. H. Advantages and Challenges of Using Antimicrobial Peptides in Synergism with Antibiotics for Treating Multidrug-Resistant Bacteria. **ACS Infectious Diseases**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 323–334, 14 fev. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00702>. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00702>. Acesso em: 14 abr. 2026.

HAMILTON, J. L.; IMRAN UL-HAQ, M.; ABBINA, S.; KALATHOTTUKAREN, M. T.; LAI, B. F. L.; HATEF, A.; UNNIAPPAN, S.; KIZHAKKEDATHU, J. N. In vivo efficacy, toxicity and biodistribution of ultra-long circulating desferrioxamine based polymeric iron chelator. **Biomaterials**, [S. l.], v. 102, p. 58–71, 1 set. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.06.019>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961216302733>. Acesso em: 16 abr. 2026.

HERMANN, P. B. **Ação de desferoxamina e deferasirox em eritrócitos de portadores de anemias dependentes de transfusão, com sobrecarga oxidativa, in vitro**. 2011. 131 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Pr, 2011. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/26877>. Acesso em: 17 abr. 2026.

HILPERT, K.; MUNSHI, T.; LÓPEZ-PÉREZ, P. M.; SEQUEIRA-GARCIA, J.; HOFMANN, S.; BULL, T. J. Discovery of Antimicrobial Peptides That Can Accelerate Culture Diagnostics of Slow-Growing Mycobacteria Including *Mycobacterium tuberculosis*. **Microorganisms**, [S. l.], v. 11, n. 9, p. 2225, 2 set. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092225>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/9/2225>. Acesso em: 13 abr. 2026.

HØIBY, N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. **APMIS**, [S. l.], v. 125, n. 4, p. 272–275, abr. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/apm.12686>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/apm.12686>. Acesso em: 17 abr. 2026.

HOLBEIN, B. E.; ANG, M. T. C.; ALLAN, D. S.; CHEN, W.; LEHMANN, C. Iron-withdrawing anti-infectives for new host-directed therapies based on iron dependence, the Achilles' heel of antibiotic-resistant microbes. **Environmental Chemistry Letters**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 2789–2808, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01242-7>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8062846/>. Acesso em: 12 abr. 2026.

HUNT-SERRACIN, A. C.; PARKS, B. J.; BOLL, J.; BOUTTE, C. C. *Mycobacterium abscessus* Cells Have Altered Antibiotic Tolerance and Surface Glycolipids in Artificial Cystic Fibrosis Sputum Medium. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 63, n. 7, p. e02488-18, jul. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.02488-18>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.02488-18>. Acesso em: 12 abr. 2026.

JACOBO-DELGADO, Y. M.; RODRÍGUEZ-CARLOS, A.; SERRANO, C. J.; RIVAS-SANTIAGO, B. *Mycobacterium tuberculosis* cell-wall and antimicrobial peptides: a mission impossible? **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 14, 17 maio 2023. DOI:

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1194923>. Disponível em:
<https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2023.1194923/full>.
 Acesso em: 13 abr. 2026.

JOLLIFFE, D. A.; CAMARGO, C. A.; SLUYTER, J. D.; AGLIPAY, M.; ALOIA, J. F.; BERGMAN, P.; BISCHOFF-FERRARI, H. A.; BORZUTZKY, A.; BUBES, V. Y.; DAMSGAARD, C. T.; DUCHARME, F. M.; DUBNOV-RAZ, G.; ESPOSITO, S.; GANMAA, D.; GILHAM, C.; GINDE, A. A.; GOLAN-TRIPTO, I.; GOODALL, E. C.; GRANT, C. C.; GRIFFITHS, C. J.; HIBBS, A. M.; JANSSENS, W.; KHADILKAR, A. V.; LAAKSI, I.; LEE, M. T.; LOEB, M.; MAGUIRE, J. L.; MAJAK, P.; MANASEKI-HOLLAND, S.; MANSON, J. E.; MAUGER, D. T.; MURDOCH, D. R.; NAKASHIMA, A.; NEALE, R. E.; PHAM, H.; RAKE, C.; REES, J. R.; ROSENDAHL, J.; SCRAGG, R.; SHAH, D.; SHIMIZU, Y.; SIMPSON-YAP, S.; KUMAR, G. T.; URASHIMA, M.; MARTINEAU, A. R. Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory infections: systematic review and meta-analysis of stratified aggregate data. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 307–320, 1 abr. 2025. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(24\)00348-6](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(24)00348-6). Disponível em: <https://www.thelancet.com/journals/landia/article/PIIS2213-8587%2824%2900348-6/fulltext>. Acesso em: 13 abr. 2026.

JONG, T.; BAIRD, T.; BARR, H. L.; BELL, S.; BIGIRUMURAME, T.; BRADY, K.; BURKE, A.; BYRNES, J.; CAUDRI, D.; CLARK, J. E.; COIN, L. J. M.; GOH, F.; GRIMWOOD, K.; HICKS, D.; JAYAWARDANA, K.; JOSHI, S.; LEE, K.; QVIST, T.; REID, D.; RICE, M.; ROBERTS, J. A.; ROGERS, G.; SHACKLETON, C.; SLY, P. D.; SMYTH, A. R.; STEVENS, L.; STOCKWELL, R.; TARIQUE, A.; TAYLOR, S.; THOMSON, R.; TIDDENS, H. A. W. M.; WANG, X. F.; WASON, J.; WAINWRIGHT, C. Finding the optimal regimen for *Mycobacteroides abscessus* treatment (FORMaT) in people with *Mycobacteroides abscessus* pulmonary disease: a multicentre, randomised, multi-arm, adaptive platform trial. **BMJ Open**, [S. l.], v. 15, n. 9, p. e096188, 21 set. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2024-096188>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12458872/>. Acesso em: 16 abr. 2026.

KAM, J. Y.; HORTLE, E.; KROGMAN, E.; WARNER, S. E.; WRIGHT, K.; LUO, K.; CHENG, T.; MANUNEEDHI CHOLAN, P.; KIKUCHI, K.; TRICCAS, J. A.; BRITTON, W. J.; JOHANSEN, M. D.; KREMER, L.; OEHLERS, S. H. Rough and smooth variants of *Mycobacterium abscessus* are differentially controlled by host immunity during chronic infection of adult zebrafish. **Nature Communications**, [S. l.], v. 13, p. 952, 17 fev. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28638-5>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8854618/>. Acesso em: 14 abr. 2026.

KANATANI, M. S.; GUGLIELMO, B. J. The new macrolides. Azithromycin and clarithromycin. **Western journal of medicine**, [S. l.], v. 160, n. 1, p. 31, 1994. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1022251/>. Acesso em: 16 abr. 2026.

KANIA, K.; WÓJCIK, K.; SKÓRKOWSKA, A.; KLESIEWICZ, K. Evaluation of the In Vitro Activity of Bedaquiline, Delamanid, and Clofazimine Against *Mycobacterium abscessus* Complex and Their Antibiofilm Potential. **Pathogens**, [S. l.], v. 14, n. 6, p. 582, 11 jun. 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens14060582>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12195664/>. Acesso em: 13 abr. 2026.

KATIF, C.; CHILCZUK, T.; SABOUR, B.; BELATTMANIA, Z.; HILMI, A.; BARAKATE, M.; TIMO HORST JOHANNES NIEDERMEYER. Isolation and Structure Elucidation of Desferrioxamine B and the New Desferrioxamine B2 Antibiotics from a Brown Marine Macroalga *Carpodesmia tamariscifolia* Associated *Streptomyces* Isolate. **Biointerface**

Research in Applied Chemistry, [S. l.], v. 12, n. 4, p. 5647–5662, 21 out. 2021. DOI: <https://doi.org/10.33263/BRIAC124.56475662>. Disponível em: <https://biointerfaceresearch.com/wp-content/uploads/2021/10/20695837124.56475662.pdf>. Acesso em: 14 abr. 2026.

KAUR, P.; KRISHNAMURTHY, R. V.; SHANDIL, R. K.; MOHAN, R.; NARAYANAN, S. A Novel Inhibitor against the Biofilms of Non-Tuberculous Mycobacteria. **Pathogens**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 40, jan. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens13010040>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-0817/13/1/40>. Acesso em: 1 nov. 2025.

KIM, B.-R.; KIM, B.-J.; KOOK, Y.-H.; KIM, B.-J. Phagosome Escape of Rough *Mycobacterium abscessus* Strains in Murine Macrophage via Phagosomal Rupture Can Lead to Type I Interferon Production and Their Cell-To-Cell Spread. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 10, 31 jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00125>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2019.00125/full>. Acesso em: 14 abr. 2026.

KIM, S.; CHEN, J.; CHENG, T.; GINDULYTE, A.; HE, J.; HE, S.; LI, Q.; SHOEMAKER, B. A.; THIESSEN, P. A.; YU, B.; ZASLAVSKY, L.; ZHANG, J.; BOLTON, E. E. PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 49, n. D1, p. D1388–D1395, 8 jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa971>. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/49/D1/D1388/5957164>. Acesso em: 14 abr. 2026.

KIM, S. Y.; KIM, C.-K.; BAE, I. K.; JEONG, S. H.; YIM, J.-J.; JUNG, J. Y.; PARK, M. S.; KIM, Y. S.; KIM, S. K.; CHANG, J.; KANG, Y. A. The drug susceptibility profile and inducible resistance to macrolides of *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense* in Korea. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [S. l.], v. 81, n. 2, p. 107–111, 1 fev. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.10.007>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889314004167>. Acesso em: 16 abr. 2026.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature reviews Drug discovery**, [S. l.], v. 3, n. 11, p. 935–949, 2004. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrd1549/boxes/bx2>. Acesso em: 16 abr. 2026.

KOLPEN, M.; JENSEN, P. Ø.; QVIST, T.; KRAGH, K. N.; RAVNHOLT, C.; FRITZ, B. G.; JOHANSEN, U. R.; BJARNSHOLT, T.; HØIBY, N. Biofilms of *Mycobacterium abscessus* Complex Can Be Sensitized to Antibiotics by Disaggregation and Oxygenation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 64, n. 2, p. e01212-19, 27 jan. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.01212-19>.

KOTEY, S. K.; TAN, X.; FLEMING, O.; KASIRAJU, R. R.; DAGNELL, A. L.; VAN PELT, K. N.; ROGERS, J.; HARTSON, S. D.; THADATHIL, N.; SELVARANI, R.; RANJIT, R.; LOGAN, S.; DEEPA, S. S.; RICHARDSON, A.; CHENG, Y. Intracellular iron accumulation facilitates mycobacterial infection in old mouse macrophages. **GeroScience**, [S. l.], v. 46, n. 2, p. 2739–2754, 30 dez. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11357-023-01048-1>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10828278/>. Acesso em: 13 abr. 2026.

LANNI, A.; BORRONI, E.; IACOBINO, A.; RUSSO, C.; GENTILE, L.; FATTORINI, L.; GIANNONI, F. Activity of Drug Combinations against *Mycobacterium abscessus* Grown in Aerobic and Hypoxic Conditions. **Microorganisms**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 1421, 14 jul. 2022.

DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071421>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/10/7/1421>. Acesso em: 12 abr. 2026.

LANZAFAME, M.; VENTO, S. Mini-review: Silico-tuberculosis. **Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases**, [S. l.], v. 23, p. 100218, maio 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jctube.2021.100218>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405579421000073>. Acesso em: 12 abr. 2026.

LEE, J.-Y.; LEE, M.-S.; KIM, D.-J.; YANG, S.-J.; LEE, S.-J.; NOH, E.-J.; SHIN, S. J.; PARK, J.-H. Nucleotide-binding oligomerization domain 2 contributes to limiting growth of *Mycobacterium abscessus* in the lung of mice by regulating cytokines and nitric oxide production. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 8, p. 1477, 2017. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2017.01477/full>. Acesso em: 6 nov. 2025.

LIMA VIANA, J.; ZAGMIGNAN, A.; LIMA LOBATO, L. F.; GOMES ABREU, A.; DA SILVA, L. C. N.; SÁ, J. C. D.; MONTEIRO, C. D. A.; LAGO, J. H. G.; GONÇALVES, L. M.; CARVALHO, R. C.; NETO, L. G. L.; DE SOUSA, E. M. Hydroalcoholic Extract and Ethyl Acetate Fraction of *Bixa orellana* Leaves Decrease the Inflammatory Response to *Mycobacterium abscessus* Subsp. *massiliense*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [S. l.], v. 2018, n. 1, p. 6091934, jan. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/6091934>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2018/6091934>. Acesso em: 12 abr. 2026.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. **methods**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202301912629>. Acesso em: 7 nov. 2025.

LOPEMAN, R. C.; HARRISON, J.; RATHBONE, D. L.; DESAI, M.; LAMBERT, P. A.; COX, J. A. G. Effect of Amoxicillin in combination with Imipenem-Relebactam against *Mycobacterium abscessus*. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 928, 27 jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57844-8>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-57844-8>. Acesso em: 14 abr. 2026.

LORÈ, N. I.; SALIU, F.; SPITALERI, A.; SCHÄFLE, D.; NICOLA, F.; CIRILLO, D. M.; SANDER, P. The aminoglycoside-modifying enzyme Eis2 represents a new potential in vivo target for reducing antimicrobial drug resistance in *Mycobacterium abscessus* complex. **The European Respiratory Journal**, [S. l.], v. 60, n. 6, p. 2201541, dez. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1183/13993003.01541-2022>.

MHLONGO, J. T.; WADDAD, A. Y.; ALBERICIO, F.; DE LA TORRE, B. G. Antimicrobial Peptide Synergies for Fighting Infectious Diseases. **Advanced Science**, [S. l.], v. 10, n. 26, p. 2300472, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1002/advs.202300472>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/advs.202300472>. Acesso em: 14 abr. 2026.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Recomendações para o diagnóstico e tratamento das doenças causadas por micobactérias não tuberculosas no Brasil**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 10 dez. 2021.

MORAES-NETO, R. N.; COUTINHO, G. G.; ATAÍDE, A. C. S.; DE OLIVEIRA REZENDE, A.; NASCIMENTO, C. E. C.; DE ALBUQUERQUE, R. P.; DA ROCHA, C. Q.; RÊGO, A. S.; DE SOUSA CARTÁGENES, M. D. S.; ABREU-SILVA, A. L.; DOS SANTOS, I. V. F.; DOS SANTOS, C. B. R.; GUERRA, R. N. M.; RIBEIRO, R. M.; MONTEIRO-NETO, V.; DE

SOUSA, E. M.; CARVALHO, R. C. Ethyl Acetate Fraction of *Bixa orellana* and Its Component Ellagic Acid Exert Antibacterial and Anti-Inflammatory Properties against *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*. **Antibiotics**, [S. l.], v. 11, n. 6, p. 817, 17 jun. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11060817>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/11/6/817>. Acesso em: 12 abr. 2026.

MORI, M.; STELITANO, G.; CAZZANIGA, G.; GELAIN, A.; TRESOLDI, A.; COCORULLO, M.; ROVERSI, M.; CHIARELLI, L. R.; TOMAIUOLO, M.; DELRE, P.; MANGIATORDI, G. F.; GRIEGO, A.; RIZZELLO, L.; CASSETTA, A.; COVACEUSZACH, S.; VILLA, S.; MENEGHETTI, F. Targeting Siderophore-Mediated Iron Uptake in *M. abscessus*: A New Strategy to Limit the Virulence of Non-Tuberculous Mycobacteria. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 502, 2 fev. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020502>.

MUKHERJEE, S.; REDDY, A.; DUTTA, N.; VAIPHEI, K. K.; Vivek; KUMAR, A.; GULBAKE, A. Exploring the potential of repurposed deferoxamine: bridging challenges and novel formulation opportunities. **Nanomedicine**, [S. l.], v. 20, n. 16, p. 2117–2141, 18 ago. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1080/17435889.2025.2534318>. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/17435889.2025.2534318>. Acesso em: 17 abr. 2026.

NAIRZ, M.; WEISS, G. Iron in infection and immunity. **Molecular Aspects of Medicine**, [S. l.], v. 75, p. 100864, 1 out. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2020.100864>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098299720300224>. Acesso em: 14 abr. 2026.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Deferoxamine. 2025. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2973>. Acesso em: 14 abr. 2026.

NEUFELD, E. J. Oral chelators deferasirox and deferiprone for transfusional iron overload in thalassemia major: new data, new questions. **Blood**, [S. l.], v. 107, n. 9, p. 3436–3441, 1 maio 2006. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-002394>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1895765/>. Acesso em: 16 abr. 2026.

NGUYEN, T. Q.; HEO, B. E.; JEON, S.; ASH, A.; LEE, H.; MOON, C.; JANG, J. Exploring antibiotic resistance mechanisms in *Mycobacterium abscessus* for enhanced therapeutic approaches. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 15, 6 fev. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1331508>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2024.1331508/full>. Acesso em: 13 abr. 2026.

NGUYEN, V. L.; EICK, K. L.; GAN, M.; MINER, T. A.; FRIEDLAND, A. E.; CAREY, A. F.; OLIVIER, K. N.; LIU, Q. Macrolide resistance in *Mycobacterium abscessus*: current insights and future perspectives. **JAC-Antimicrobial Resistance**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. dlaf047, 1 abr. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlaf047>. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlaf047>. Acesso em: 13 abr. 2026.

NOVARTIS PHARMA STEIN. **Desferal. Mesilato de desferroxamina**. [S. l.]: Novartis Biociências SA, 2018. Disponível em: https://uploads.consultaremedios.com.br/drug_leaflet/pro/Bula-Desferal-Profissional-Consulta-Remedios.pdf. Acesso em: 1 nov. 2025.

NOVOSAD, S. A.; BEEKMANN, S. E.; POLGREEN, P. M.; MACKEY, K.; WINTHROP, K. L. Treatment of *Mycobacterium abscessus* infection. **Emerging infectious diseases**, [S. l.], v.

22, n. 3, p. 511, 2016. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4766900/>. Acesso em: 13 abr. 2026.

O'BOYLE, N. M.; BANCK, M.; JAMES, C. A.; MORLEY, C.; VANDERMEERSCH, T.; HUTCHISON, G. R. Open Babel: An open chemical toolbox. **Journal of Cheminformatics**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 33, dez. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>. Disponível em: <https://jcheminf.biomedcentral.com/articles/10.1186/1758-2946-3-33>. Acesso em: 14 abr. 2026.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S. l.], v. 52, n. 1, p. 1, 1 jul. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkg301>. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dkg301>. Acesso em: 14 abr. 2026.

OLIVEIRA, F. M.; DA COSTA, A. C.; PROCOPIO, V. O.; GARCIA, W.; ARAÚJO, J. N.; DA SILVA, R. A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; KIPNIS, A. *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* mycma_0076 and mycma_0077 Genes Code for Ferritins That Are Modulated by Iron Concentration. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 9, p. 1072, 1 jun. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01072>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5992710/>. Acesso em: 16 abr. 2026.

O'NEILL, L. A. J.; ARTYOMOV, M. N. Itaconate: the poster child of metabolic reprogramming in macrophage function. **Nature Reviews. Immunology**, [S. l.], v. 19, n. 5, p. 273–281, maio 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0128-5>.

PALMIERI, E. M.; GOW, A. Editorial: Spotlight on nitric oxide: integrative approaches to study NO and RNS in physiology and disease. **Frontiers in Physiology**, [S. l.], v. 17, p. 1779024, 2026. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2026.1779024>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12895426/>. Acesso em: 17 abr. 2026.

PANDEY, R.; RODRIGUEZ, G. M. IdeR is required for iron homeostasis and virulence in *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Microbiology**, [S. l.], v. 91, n. 1, p. 98–109, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/mmi.12441>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/mmi.12441>. Acesso em: 13 abr. 2026.

PARASURAMAN, S. Prediction of activity spectra for substances. **Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 52–53, jan. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0976-500X.77119>.

PAWLACZYK, M.; SCHROEDER, G. Deferoxamine-Modified Hybrid Materials for Direct Chelation of Fe(III) Ions from Aqueous Solutions and Indication of the Competitiveness of In Vitro Complexing toward a Biological System. **ACS Omega**, [S. l.], v. 6, n. 23, p. 15168–15181, 15 jun. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c01411>. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c01411>. Acesso em: 14 abr. 2026.

PEREIRA, M. M. R.; DE OLIVEIRA, F. M.; DA COSTA, A. C.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; KIPNIS, A. Ferritin from *Mycobacterium abscessus* is involved in resistance to antibiotics and oxidative stress. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 107, n. 7–8, p. 2577–2595, abr. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12420-8>. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s00253-023-12420-8>. Acesso em: 12 abr. 2026.

PETRIK, M.; UMLAUFOVA, E.; RACLAVSKY, V.; PALYZOVA, A.; HAVLICEK, V.; PFISTER, J.; MAIR, C.; NOVY, Z.; POPPER, M.; HAJDUCH, M.; DECRISTOFORO, C. 68Ga-labelled

desferrioxamine-B for bacterial infection imaging. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, [S. l.], v. 48, n. 2, p. 372–382, fev. 2021. DOI:

<https://doi.org/10.1007/s00259-020-04948-y>. Disponível em:

<https://link.springer.com/10.1007/s00259-020-04948-y>. Acesso em: 12 abr. 2026.

PHELAN, James J.; BASDEO, S. A.; TAZOLL, S. C.; MCGIVERN, S.; SABORIDO, J. R.; KEANE, J. Modulating Iron for Metabolic Support of TB Host Defense. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 9, 15 out. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02296>.

Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2018.02296/full>.

Acesso em: 12 abr. 2026.

PHELAN, James Joseph; MCQUAID, K.; KENNY, C.; GOGAN, K. M.; COX, D. J.; BASDEO, S. A.; O'LEARY, S.; TAZOLL, S. C.; Ó MAOLDOMHNAIGH, C.; O'SULLIVAN, M. P.; O'NEILL, L. A.; O'SULLIVAN, M. J.; KEANE, J. Desferrioxamine Supports Metabolic Function in Primary Human Macrophages Infected With *Mycobacterium tuberculosis*. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 11, 13 maio 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00836>.

Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2020.00836/full>.

Acesso em: 16 abr. 2026.

PRIMM, T. P.; LUCERO, C. A.; FALKINHAM, J. O. Health Impacts of Environmental Mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 98–106, jan. 2004. DOI:

<https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.98-106.2004>. Disponível em:

<https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.17.1.98-106.2004>. Acesso em: 12 abr. 2026.

PRYJMA, M.; BURIAN, J.; KUCHINSKI, K.; THOMPSON, C. J. Antagonism between Front-Line Antibiotics Clarithromycin and Amikacin in the Treatment of *Mycobacterium abscessus* Infections Is Mediated by the whiB7 Gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 61, n. 11, p. e01353-17, 24 out. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.01353-17>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5655113/>. Acesso em: 13 abr. 2026.

QVIST, T.; EICKHARDT, S.; KRAGH, K. N.; ANDERSEN, C. B.; IVERSEN, M.; HØIBY, N.; BJARNSHOLT, T. Chronic pulmonary disease with *Mycobacterium abscessus* complex is a biofilm infection. **European Respiratory Journal**, [S. l.], v. 46, n. 6, p. 1823–1826, dez. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1183/13993003.01102-2015>. Disponível em:

<https://publications.ersnet.org/lookup/doi/10.1183/13993003.01102-2015>. Acesso em: 17 abr. 2026.

RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Amikacin: Uses, Resistance, and Prospects for Inhibition. **Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, [S. l.], v. 22, n. 12, p. 2267, 19 dez. 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules22122267>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5889950/>. Acesso em: 16 abr. 2026.

RATLEDGE, C. Iron, mycobacteria and tuberculosis. **Tuberculosis**, Edinburgh, Scotland, v. 84, n. 1–2, p. 110–130, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2003.08.012>.

RODRIGUEZ, G. M.; SMITH, I. Mechanisms of iron regulation in mycobacteria: role in physiology and virulence. **Molecular Microbiology**, [S. l.], v. 47, n. 6, p. 1485–1494, mar. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03384.x>.

ROUX, A.-L.; VILJOEN, A.; BAH, A.; SIMEONE, R.; BERNUT, A.; LAENCINA, L.; DERAMAUDT, T.; ROTTMAN, M.; GAILLARD, J.-L.; MAJLESSI, L.; BROSCHE, R.; GIRARD-MISGUICH, F.; VERGNE, I.; DE CHASTELLIER, C.; KREMER, L.; HERRMANN, J.-L. The distinct fate of smooth and rough *Mycobacterium abscessus* variants inside macrophages.

Open Biology, [S. l.], v. 6, n. 11, p. 160185, 30 nov. 2016. DOI:

<https://doi.org/10.1098/rsob.160185>. Disponível em:

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5133439/>. Acesso em: 14 abr. 2026.

RUNYON, E. H. Anonymous Mycobacteria in Pulmonary Disease. **Medical Clinics of North America**, [S. l.], v. 43, n. 1, p. 273–290, jan. 1959. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(16\)34193-1](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(16)34193-1). Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025712516341931>. Acesso em: 12 abr. 2026.

RUTH, M. M.; VAN ROSSUM, M.; KOEKEN, V. A. C. M.; PENNING, L. J.; SVENSSON, E. M.; RUESEN, C.; BOWLES, E. C.; WERTHEIM, H. F. L.; HOEFSLOOT, W.; VAN INGEN, J. Auranofin Activity Exposes Thioredoxin Reductase as a Viable Drug Target in *Mycobacterium abscessus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 63, n. 9, p. e00449-19, set. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.00449-19>.

SALGUEIRO, V. C.; PASSEMAR, C.; VÁZQUEZ-INIESTA, L.; LERMA, L.; FLOTO, A.; PRADOS-ROSALES, R. Extracellular vesicles in mycobacteria: new findings in biogenesis, host-pathogen interactions, and diagnostics. **mBio**, [S. l.], v. 15, n. 5, p. e02552-23, 3 abr. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.02552-23>. Disponível em:

<https://journals.asm.org/doi/10.1128/mbio.02552-23>. Acesso em: 16 abr. 2026.

SANTOS, A. F.; BALDANZI, G.; LEONART, M. S. S.; NASCIMENTO, A. J. Protective action of deferiprone and deferoxamine in erythrocytes isolated from patients with β -thalassemias.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, [S. l.], v. 31, p. 444–448, 2009. DOI:

<https://doi.org/10.1590/S1516-84842009005000091>. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rbhh/a/ZcJMpBV59vdGc75rszTkYmH/?lang=en>. Acesso em: 17 abr. 2026.

SAVASTANO, M.; BAZZICALUPI, C.; FERRARO, G.; FRATINI, E.; GRATTERI, P.; BIANCHI, A. Tales of the Unexpected: The Case of Zirconium(IV) Complexes with Desferrioxamine.

Molecules, [S. l.], v. 24, n. 11, p. 2098, 2 jun. 2019. DOI:

<https://doi.org/10.3390/molecules24112098>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/11/2098>. Acesso em: 12 abr. 2026.

SCHMALSTIG, A. A.; WIGGINS, A.; BADILLO, D.; WETZEL, K. S.; HATFULL, G. F.; BRAUNSTEIN, M. Bacteriophage infection and killing of intracellular *Mycobacterium abscessus*.

mBio, [S. l.], v. 15, n. 1, p. e0292423, 16 jan. 2024. Disponível em:

<https://doi.org/10.1128/mbio.02924-23>.

SENHAJI-KACHA, A.; ESTEBAN, J.; GARCIA-QUINTANILLA, M. Considerations for Phage Therapy Against *Mycobacterium abscessus*. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 11, p. 609017, 18 jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.609017>. Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.609017/full>. Acesso em: 12 abr. 2026.

SHTAINBERG, M.; STEIN, N.; ADIR, Y.; KEN-DROR, S.; SHITRIT, D.; BENDAYAN, D.; FUKS, L.; SALIBA, W. Prevalence, risk factors and prognosis of nontuberculous mycobacterial infection among people with bronchiectasis: a population survey.

European Respiratory Journal, [S. l.], v. 51, n. 5, 2018. Disponível em:

https://publications.ersnet.org/content/erj/51/5/1702469?ctkey=shareline&utm_campaign=_E

European Respiratory Journal TrendMD_0&utm_medium=cpc&utm_source=TrendMD.
Acesso em: 13 abr. 2026.

SINGH, G.; KUMAR, A.; MAAN, P.; KAUR, J. Cell Wall Associated Factors of *Mycobacterium tuberculosis* as Major Virulence Determinants: Current Perspectives in Drugs Discovery and Design. **Current Drug Targets**, [S. l.], v. 18, n. 16, p. 1904–1918, 1 dez. 2017. DOI: <https://doi.org/10.2174/1389450118666170711150034>. Disponível em: <https://www.benthamdirect.com/content/journals/cdt/10.2174/1389450118666170711150034>. Acesso em: 13 abr. 2026.

SIZAR, O.; RAHMAN, S.; SUNDARESHAN, V. Amikacin. **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430908/>. Acesso em: 16 abr. 2026.

SOTIROPOULOU, A.; LOUKOU, I.; VLIORA, C.; DOUROS, K.; MOUSTAKI, M. The Epidemiology of Nontuberculous Mycobacteria in Cystic Fibrosis. **Children**, [S. l.], v. 12, n. 9, p. 1270, 22 set. 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/children12091270>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12468492/>. Acesso em: 13 abr. 2026.

SOUSA, E. M. D.; BORTOLI, F. B. D.; AMARAL, E. P.; BATISTA, A. C.; KIPNIS, T. L.; CARDOSO, A. M.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. Acute Immune Response to *Mycobacterium massiliense* in C57BL/6 and BALB/c Mice. **Infection and Immunity**, [S. l.], v. 78, n. 4, p. 1571–1581, abr. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.00731-09>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/IAI.00731-09>. Acesso em: 14 abr. 2026.

SRITHARAN, M. Iron Homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis*: Mechanistic Insights into Siderophore-Mediated Iron Uptake. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 198, n. 18, p. 2399–2409, 25 ago. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.00359-16>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.00359-16>. Acesso em: 13 abr. 2026.

STELITANO, G.; BETTONI, C.; MORI, M.; COCORULLO, M.; TRESOLDI, A.; MENEGHETTI, F.; VILLA, S.; CHIARELLI, L. R. Repurposing of FDA-Approved Drugs to Disrupt Iron Uptake in *Mycobacterium abscessus*: Targeting Salicylate Synthase as a Novel Approach. **Chemical Biology & Drug Design**, [S. l.], v. 106, n. 2, p. e70162, ago. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1111/cbdd.70162>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12305296/>. Acesso em: 13 abr. 2026.

TAHERI-ARAGHI, S. Synergistic action of antimicrobial peptides and antibiotics: current understanding and future directions. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 15, 31 jul. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1390765>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2024.1390765/full>. Acesso em: 14 abr. 2026.

TAKEI, S.; IHARA, H.; TOGO, S.; NAKAMURA, A.; FUJIMOTO, Y.; WATANABE, J.; KUOKAWA, K.; SHIBAYAMA, K.; SUMIYOSHI, I.; OCHI, Y.; IWAI, M.; OKABE, T.; CHONAN, M.; MISAWA, S.; OHSAKA, A.; TAKAHASHI, K. The synergetic effect of Imipenem-clarithromycin combination in the Mycobacteroides abscessus complex. **BMC Microbiology**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 316, 19 out. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-020-02000-5>. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12866-020-02000-5>. Acesso em: 1 nov. 2025.

TEIXEIRA, H. C.; DIAS, L. da S.; BIZARRO, H. D. da S.; CASTRO, J. M. de A. Efeitos contrastantes da vitamina D sobre a resposta imune inata e adquirida e seu impacto na

recuperação da tuberculose. **HU Revista**, [S. l.], v. 44, n. 3, p. 369–378, 2018. DOI: <https://doi.org/10.34019/1982-8047.2018.v44.22232>. Disponível em: <https://periodicos.ufff.br/index.php/hurevista/article/view/22232>. Acesso em: 13 abr. 2026.

TEMEL, A.; AKSOYALP, Z. Ş. A preliminary study on the effect of deferoxamine on the disruption of bacterial biofilms and antimicrobial resistance. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 267, 2024. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11589088/>. Acesso em: 16 abr. 2026.

TO, K.; CAO, R.; YEGIAZARYAN, A.; OWENS, J.; VENKETARAMAN, V. General Overview of Nontuberculous Mycobacteria Opportunistic Pathogens: *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium abscessus*. **Journal of Clinical Medicine**, [S. l.], v. 9, n. 8, 5 ago. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm9082541>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2077-0383/9/8/2541>. Acesso em: 12 abr. 2026.

TORTOLI, E.; KOHL, T. A.; BROWN-ELLIOTT, B. A.; TROVATO, A.; LEÃO, S. C.; GARCIA, M. J.; VASIREDDY, S.; TURENNE, C. Y.; GRIFFITH, D. E.; PHILLEY, J. V.; BALDAN, R.; CAMPANA, S.; CARIANI, L.; COLOMBO, C.; TACCETTI, G.; TERI, A.; NIEMANN, S.; WALLACE JR., R. J.; CIRILLO, D. M. Emended description of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* and *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* and designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 66, n. 11, p. 4471–4479, 1 nov. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001376>. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.001376>. Acesso em: 12 abr. 2026.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, [S. l.], v. 31, n. 2, p. 455–461, 30 jan. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.

TUNESI, S.; ZELAZNY, A.; AWAD, Z.; MOUGARI, F.; BUYCK, J. M.; CAMBAU, E. Antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium abscessus* and treatment of pulmonary and extra-pulmonary infections. **Clinical Microbiology and Infection**, [S. l.], v. 30, n. 6, p. 718–725, 1 jun. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2023.09.019>. Disponível em: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.org/article/S1198-743X\(23\)00482-2/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.org/article/S1198-743X(23)00482-2/fulltext). Acesso em: 13 abr. 2026.

VAKSER, I. A. Protein-Protein Docking: From Interaction to Interactome. **Biophysical Journal**, [S. l.], v. 107, n. 8, p. 1785–1793, 21 out. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.08.033>. Disponível em: [https://www.cell.com/biophysj/abstract/S0006-3495\(14\)00938-2](https://www.cell.com/biophysj/abstract/S0006-3495(14)00938-2). Acesso em: 16 abr. 2026.

VALVERDE, T. L.; SILVA, L. L.; MICHELETTI, D. F.; CARDOSO, R. F.; CALEFFI-FERRACIOLI, K. R.; SIQUEIRA, V. L. D.; TEIXEIRA, J. J. V.; DE LIMA SCODRO, R. B. *Mycobacterium abscessus* complex infection is associated with poor treatment outcome. **Future Microbiology**, [S. l.], v. 20, n. 17, p. 1199–1208, dez. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/17460913.2025.2600222>.

VELASQUEZ, J.; WRAY, A. A. Deferoxamine. **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557654/>. Acesso em: 14 abr. 2026.

VERMEIRE, C. A.; TAN, X.; LIANG, Y.; KOTEY, S. K.; ROGERS, J.; HARTSON, S. D.; LIU, L.; CHENG, Y. *Mycobacterium abscessus* extracellular vesicles increase mycobacterial resistance to clarithromycin in vitro. **PROTEOMICS**, [S. l.], v. 24, n. 10, p. 2300332, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1002/pmic.202300332>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pmic.202300332>. Acesso em: 16 abr. 2026.

VICHINSKY, E.; ONYEKWERE, O.; PORTER, J.; SWERDLOW, P.; ECKMAN, J.; LANE, P.; FILES, B.; HASSELL, K.; KELLY, P.; WILSON, F.; BERNAUDIN, F.; FORNI, G. L.; OKPALA, I.; RESSAYRE-DJAFER, C.; ALBERTI, D.; HOLLAND, J.; MARKS, P.; FUNG, E.; FISCHER, R.; MUELLER, B. U.; COATES, T.; DEFERASIROX IN SICKLE CELL INVESTIGATORS. A randomised comparison of deferasirox versus deferoxamine for the treatment of transfusional iron overload in sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, [S. l.], v. 136, n. 3, p. 501–508, fev. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.06455.x>.

VICTORIA, L.; GUPTA, A.; GÓMEZ, J. L.; ROBLEDÓ, J. *Mycobacterium abscessus* complex: A Review of Recent Developments in an Emerging Pathogen. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 11, p. 659997, 26 abr. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.659997>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.659997/full>. Acesso em: 12 abr. 2026.

VILLOUTREIX, B. O.; BASTARD, K.; SPERANDIO, O.; FAHRAEUS, R.; POYET, J.-L.; CALVO, F.; DÉPREZ, B.; MITEVA, M. A. In silico-in vitro screening of protein-protein interactions: towards the next generation of therapeutics. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 103–122, abr. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/138920108783955218>.

WILLE, D. F. **Análise da atividade dos sais de ferro e desferroxamina na maturação de biofilme de micobactérias de crescimento rápido**. 3 fev. 2022. 57 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 3 fev. 2022. Disponível em: <http://repositorio.ufsm.br/handle/1/24398>. Acesso em: 14 abr. 2026.

XIA, S.; ZHANG, W.; HUANG, L.; JIANG, H. Comparative efficacy and safety of deferoxamine, deferiprone and deferasirox on severe thalassemia: a meta-analysis of 16 randomized controlled trials. **PloS One**, [S. l.], v. 8, n. 12, p. e82662, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082662>.

XIANG, X.; DENG, W.; LIU, M.; XIE, J. *Mycobacterium* Biofilms: Factors Involved in Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies Against Biofilm-Relevant Pathogens. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, [S. l.], v. 24, n. 3, p. 269–279, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2014010545>. Disponível em: <http://www.dl.begellhouse.com/journals/6dbf508d3b17c437,1b76396516230e0f,77b54ea4079b648f.html>. Acesso em: 17 abr. 2026.

XU, J.; SUN, T.; ZHONG, R.; YOU, C.; TIAN, M. PEGylation of Deferoxamine for Improving the Stability, Cytotoxicity, and Iron-Overload in an Experimental Stroke Model in Rats. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 8, 25 set. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.592294>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/bioengineering-and-biotechnology/articles/10.3389/fbioe.2020.592294/full>. Acesso em: 17 abr. 2026.

YANG, H.; LOU, C.; SUN, L.; LI, J.; CAI, Y.; WANG, Z.; LI, W.; LIU, G.; TANG, Y. admetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties.

Bioinformatics, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 1067–1069, 15 mar. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty707>. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/35/6/1067/5085368>. Acesso em: 14 abr. 2026.

YANG, J.; BANAS, V. S.; RIVERA, G. S. M.; WENCEWICZ, T. A. Siderophore Synthetase DesD Catalyzes N-to-C Condensation in Desferrioxamine Biosynthesis. **ACS Chemical Biology**, [S. l.], v. 18, n. 6, p. 1266–1270, 16 jun. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1021/acscchembio.3c00167>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscchembio.3c00167>. Acesso em: 12 abr. 2026.

YAO, L.; HE, Y.; YANG, J.; ZHENG, X.; SHI, X.; WEI, W.; YANG, G.; YING, R.; SHA, W. Bedaquiline combined with clofazimine as salvage therapy for 11 patients with nontuberculous mycobacterial lung disease. **BMC Infectious Diseases**, [S. l.], v. 25, p. 1203, 29 set. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-025-11605-y>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12481766/>. Acesso em: 13 abr. 2026.

YOSHIDA, S.; TSUYUGUCHI, K.; KOBAYASHI, T.; KURAHARA, Y.; SHIMATANI, Y.; ARAI, T. Reassessment of the relevance between microbiological macrolide-induced resistance and diagnosis and treatment outcome of *Mycobacterium abscessus*-related pulmonary disease. **Respiratory Investigation**, [S. l.], v. 62, n. 6, p. 1142–1148, 1 nov. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resinv.2024.09.012>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212534524001515>. Acesso em: 13 abr. 2026.

APÊNDICE A – USO DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL

DECLARAÇÃO DE ACORDO PARA UTILIZAÇÃO DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL

(Art. 12, inciso I, da Resolução nº 374/2025 – CONSAD)

Eu, **Roseane Lustosa de Santana Lira**, discente regularmente matriculada no Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, declaro que fui devidamente autorizada pelo **Prof. Dr. Eduardo Martins de Sousa**, orientador do estudo intitulado: “**AValiação DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA DESFERRIOXAMINA in sílico e in vitro CONTRA *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense***” a utilizar ferramentas de **Inteligência Artificial**, no desenvolvimento das atividades acadêmicas relacionadas a este trabalho.

O uso da Inteligência Artificial foi realizado de forma **ética, responsável e transparente**, com finalidade de apoio à **organização de ideias, revisão textual, esclarecimento conceitual e aprimoramento da escrita**, não substituindo a autoria intelectual, a análise crítica ou a responsabilidade acadêmica da discente.

Este acordo está em conformidade com o disposto no **Art. 12, inciso I, da Resolução nº 374/2025 – CONSAD**, que estabelece a necessidade de acordo prévio entre discente e docente, com registro da autorização para uso de IA no contexto acadêmico.

Declaro, ainda, que todas as informações, análises, interpretações e conclusões apresentadas no trabalho são de minha inteira responsabilidade, respeitando os princípios da integridade acadêmica e da originalidade.

Por ser verdade, firmamos a presente declaração.

Prompts / Comandos Utilizados (Art. 12, inciso III)

- i. **Prompt 1 – Diagnóstico geral do capítulo:** “*Atue como revisor acadêmico de doutorado na área biomédica. Avalie o capítulo abaixo quanto a clareza, coerência, estrutura, rigor científico e adequação ao estilo acadêmico. Aponte problemas principais e sugira melhorias estruturais antes de qualquer reescrita*”.
- ii. **Prompt 2 – Revisão estrutural:** “*Avalie o texto abaixo para melhorar organização lógica, progressão de ideias e encadeamento entre parágrafos, mantendo o conteúdo científico. Sugira reorganização de trechos se necessário*”.
- iii. **Prompt 3 – Revisão gramatical e normativa:** “*Revise o texto quanto a gramática, ortografia, pontuação, concordância e regência, garantindo conformidade com norma culta formal*”.

- iv. **Prompt 4 – Consistência científica e terminológica:** “Verifique consistência no uso de termos técnicos, siglas e nomenclatura ao longo do texto. Aponte inconsistências e sugira padronização”.
- v. **Prompt 5 – Revisão crítica tipo peer review:** “Atue como revisor de periódico internacional. Identifique fragilidades na redação, trechos pouco claros, excesso de generalização ou problemas que possam comprometer a publicação”.
- vi. **Prompt 6 – Tradução científica:** “Avalie o texto em inglês, conforme nível acadêmico, adequação a periódicos biomédicos internacionais, com precisão técnica”.
- vii. **Prompt 7 – Revisão final integrada:** “Faça uma revisão final integrada do texto, garantindo clareza, coesão, consistência terminológica, correção gramatical e adequação ao estilo acadêmico de alto impacto”.

Assinatura do discente: 

Assinatura do docente: 