

ANDRÉ PINHO DE PINA

Licenciado em Biologia

Identificação de novos fármacos para *Neisseria gonorrhoeae* através de uma estratégia de reposicionamento *in silico*

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

Universidade NOVA de Lisboa

novembro, 2021

ANDRÉ PINHO DE PINA

Licenciado em Biologia

Identificação de novos fármacos para *Neisseria gonorrhoeae* através de uma estratégia de reposicionamento *in silico*

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

Universidade NOVA de Lisboa

novembro, 2021

Identificação de novos fármacos para *Neisseria gonorrhoeae* através de uma estratégia de reposicionamento *in silico*

ANDRÉ PINHO DE PINA

Licenciado em Biologia

Orientador: Liliana Rodrigues, Professora
Auxiliar, IHMT-NOVA
Coorientador: Filomena Martins Pereira, Professora Catedrática,
IHMT-NOVA

Júri:

Presidente: Rita Sobral, Professora Auxiliar,
FCT-NOVA
Arguente: Marta Martins, Professora Auxiliar,
Trinity College Dublin
Orientador: Liliana Rodrigues, Professora
Auxiliar, IHMT-NOVA

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

Universidade NOVA de Lisboa

novembro, 2021

Identificação de novos fármacos para *Neisseria gonorrhoeae* através de uma estratégia de reposicionamento *in silico*

Copyright © André Pinho de Pina, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Os resultados apresentados nesta Dissertação foram objeto de apresentação em co-autoria das seguintes comunicações sob a forma de Poster:

- **André Pina**, Filomena Pereira, Liliana Rodrigues. Identification of new drugs for *Neisseria gonorrhoeae* using an *in silico* repurposing strategy. Congresso de Microbiologia e Biotecnologia 2021 (Microbiotec21), online 23-26 de novembro de 2021.

- **André Pina**, Filomena Pereira, Liliana Rodrigues. Identification of new drugs for *Neisseria gonorrhoeae* using an *in silico* repurposing strategy. Congresso Europeu de Microbiologia Clínica e Doenças Infeciosas (ECCMID), online 9-12 de julho de 2021.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostava de agradecer à minha orientadora Professora Doutora Liliana Rodrigues por me ter dado a oportunidade de realizar este trabalho no seu laboratório, por me ter ajudado sempre que precisei, por ter esclarecido todas as minhas dúvidas e por todo o tempo que, no geral, dispensou da sua muito preenchida agenda para que este trabalho tivesse sido possível de fazer.

Gostava também de agradecer à minha coorientadora Professora Doutora Filomena Pereira pelos “feedbacks” dados durante a realização deste trabalho e que foram preciosos para o seu constante aperfeiçoamento.

Um obrigado ao Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) por me ter acolhido e proporcionado um local de trabalho acolhedor, rodeado de pessoas bem-dispostas e com as quais foi um prazer conviver ao longo deste ano.

À minha família no geral e aos meus pais em particular, um sincero agradecimento do fundo do meu coração pelo apoio constante, pelo incentivo infindável e por sempre me terem proporcionado a oportunidade de prosseguir nos meus estudos ao longo de todos estes anos. Sem eles não seria possível ter chegado até aqui. Não posso deixar de falar do meu irmão, que não vive sem me chatear a cabeça diariamente, mas a quem agradeço pelo apoio e amizade constante.

Ao Gonçalo, Henrique, Daniel e Francisco, os amigos de sempre e para sempre, agradeço a amizade sem fim ao longo de todos estes anos e o apoio que nunca faltou em todos os momentos. São sem dúvida um pilar essencial em todos os aspetos da minha vida. Um grande abraço para vocês.

Por último, mas definitivamente não menos importante, quero agradecer à Raquel, a minha namorada, por todo o apoio, amor, carinho e por estar sempre presente nos bons e maus momentos. És também um pilar essencial na minha vida. Quero agradecer-te ainda pela grande ajuda que me deste na formatação da tese e no trabalho em Excel.

“Quit, don’t quit. Noodles, don’t noodles... You are too concerned with what was and what will be. There’s a saying: Yesterday is history, tomorrow is a mystery, but today is a gift. That is why it is called the present.”

Master Oogway

RESUMO

A gonorreia, causada pelo agente etiológico *Neisseria gonorrhoeae*, é a segunda infecção sexualmente transmissível mais notificada na Europa. Em 2016, registraram-se aproximadamente 87 milhões de infecções em todo o mundo. Desde a introdução do primeiro antibiótico contra a gonorreia, a sulfanilamida em 1935, praticamente todas as abordagens terapêuticas desenvolvidas foram sucessivamente abandonadas devido à emergência de estirpes de *N. gonorrhoeae* resistentes. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o tratamento atual recomendado para a gonorreia consiste no uso de ceftriaxona ou cefixima em monoterapia ou em terapia dupla com azitromicina. No entanto, a emergência de estirpes com suscetibilidade reduzida às cefalosporinas de 3ª geração, aliada à ausência de novos antimicrobianos eficazes, tem motivado a utilização da terapia combinada destes antibióticos com a azitromicina. Em 2017, a OMS divulgou uma lista de bactérias resistentes aos antibióticos que devem ter prioridade no que toca à pesquisa, descoberta e desenvolvimento de novas opções terapêuticas. *N. gonorrhoeae* foi considerada como “prioridade 2: alta”. Assim, urge desenvolver novas estratégias que permitam identificar novos fármacos que possam ser utilizados no tratamento destas infecções de uma forma mais rápida e menos dispendiosa relativamente ao processo clássico de desenvolvimento de novos medicamentos.

Nesta Dissertação, utilizou-se uma estratégia de reposicionamento *in silico* para identificar fármacos que atuem ao nível do metabolismo energético e dos transportadores de membrana em *N. gonorrhoeae*.

No final da análise *in silico*, obteve-se um total de 100 alvos preditivos em *N. gonorrhoeae* associados a 681 fármacos. Após a aplicação de critérios seletivos, escolheram-se 11 fármacos para avaliação da sua atividade *in vitro* contra um conjunto de estirpes de *N. gonorrhoeae*. Os fármacos acetazolamida, atovaquone, dequalinio, doxorrubicina, amlodipina e clomipramina apresentaram os resultados mais promissores e deverão ser explorados em estudos futuros como potenciais antimicrobianos, ou adjuvantes de antibióticos atualmente utilizados contra *N. gonorrhoeae*.

Palavras-chave: *Neisseria gonorrhoeae*, Resistência aos antimicrobianos, Bombas de efluxo, Reposicionamento *in silico* de fármacos.

ABSTRACT

Gonorrhea, caused by the etiological agent *Neisseria gonorrhoeae*, is the second most notified Sexually Transmitted Infection in Europe. In 2016, there were approximately 87 million cases described worldwide. Since the introduction of the first antibiotic against gonorrhea, sulfanilamide in 1935, almost every therapeutic approach developed since then were successively abandoned due to the emergence of *N. gonorrhoeae* resistant strains. According to the World Health Organization (WHO), the current recommended treatment for gonorrhea consists of ceftriaxone or cefixime in single therapy or in dual therapy with azithromycin. However, the emergence of strains with decreased susceptibility to 3rd generation cephalosporins, associated with the absence of new effective antimicrobials, has motivated the use of dual therapy regimen. In 2017, the WHO published a list of antibiotic-resistant bacteria whose research, discovery and development of new therapeutics should be prioritized. *N. gonorrhoeae* was considered as "priority 2: high". Therefore, it is urgent to develop new strategies that identify new drugs that can be used in the treatment of these infections in a way that saves time and money when compared to the conventional drug discovery process.

In this Dissertation, an *in silico* drug repurposing strategy was used to identify drugs that target energy metabolism and membrane transporters of *N. gonorrhoeae*. At the end of the *in silico* analysis, a total of 100 predicted targets, associated with 681 drugs, were found in *N. gonorrhoeae*. Using selective criteria, 11 drugs were chosen for *in vitro* activity evaluation against a panel of *N. gonorrhoeae* strains. The drugs acetazolamide, atovaquone, dequalinium, doxorubicin, amlodipine and clomipramine presented promising results and should be further explored in future studies, as potential antimicrobials, or as adjuvants of currently used antibiotics against *N. gonorrhoeae*.

Keywords: *Neisseria gonorrhoeae*, Antimicrobial resistance, Efflux pumps, *In silico* drug repurposing.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	XI
RESUMO.....	XV
ABSTRACT.....	XVII
ÍNDICE.....	XIX
ÍNDICE DE FIGURAS	XXIII
ÍNDICE DE TABELAS.....	XXV
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XXVII
LISTA DE UNIDADES	XXXI
1 Introdução.....	1
1.1 <i>Neisseria gonorrhoeae</i> : Características fisiológicas e estruturais.....	1
1.2 Epidemiologia	2
1.3 Transmissão e sintomas.....	5
1.4 Diagnóstico.....	6
1.4.1 Identificação presuntiva.....	7
1.4.2 Identificação confirmatória	8
1.5 Terapêutica para infecções por <i>N. gonorrhoeae</i>	11
1.6 Resistência aos antimicrobianos.....	11
1.6.1 História do desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos	12
1.7 Mecanismos de ação e resistência aos antimicrobianos	16
1.7.1 Sulfonamidas	17
1.7.2 Tetraciclina.....	18
1.7.3 Aminoglicosídeos.....	18
1.7.4 Macrólidos.....	19
1.7.5 Fluoroquinolonas.....	20
1.7.6 Penicilina e Cefalosporinas	20
1.8 Bombas de efluxo.....	22
1.9 Descoberta e desenvolvimento de novos fármacos	23

1.9.1	Novos fármacos para <i>N. gonorrhoeae</i>	24
1.9.1.1	Solitromicina	25
1.9.1.2	Zoliflodacina	26
1.9.1.3	Gepotidacina.....	27
1.9.2	Reposicionamento de fármacos	27
1.10	Objetivos	29
1.10.1	Objetivo geral	29
1.10.2	Objetivos específicos.....	29
2	Material e Métodos.....	30
2.1	Estratégia de reposicionamento <i>in silico</i> de fármacos.....	30
2.1.1	Compilação de genes envolvidos no metabolismo energético e transporte membranar	30
2.1.1.1	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)	30
2.1.1.2	Uniprot.....	31
2.1.2	Criação de uma biblioteca virtual de fármacos aprovados, com potencial atividade contra <i>N. gonorrhoeae</i>	32
2.1.2.1	DrugBank	32
2.1.2.2	STITCH 5.0	32
2.1.3	Triagem seletiva dos fármacos identificados através da comparação de domínios funcionais conservados.....	33
2.1.4	Construção da lista final de fármacos com potencial atividade contra <i>N. gonorrhoeae</i>	35
2.2	Estratégias experimentais <i>in vitro</i>	36
2.2.1	Crescimento e manutenção das estirpes de <i>N. gonorrhoeae</i>	36
2.2.2	Meios de cultura	37
2.2.3	Fármacos e Antibióticos	38
2.2.4	Determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMIs) dos fármacos selecionados pelo método de reposicionamento <i>in silico</i>	40
2.2.5	Determinação da CMI de antibióticos na presença de fármacos selecionados pelo método de reposicionamento <i>in silico</i>	41
2.2.6	Ensaios de sinergismo pelo método de “Checkerboard”	43

2.2.7	Determinação da atividade de efluxo por fluorometria em tempo real	45
2.2.7.1	Ensaio de acumulação de brometo de etídio	46
2.2.7.2	Ensaio de acumulação de brometo de etídio na presença de fármacos selecionados pelo método de reposicionamento <i>in silico</i>	47
3	Resultados	49
3.1	Reposicionamento <i>in silico</i> de fármacos	49
3.1.1	Compilação de proteínas envolvidas no metabolismo energético e transporte membranar	49
3.1.2	Criação de uma biblioteca virtual de fármacos aprovados, com potencial atividade contra <i>N. gonorrhoeae</i>	49
3.1.3	Triagem seletiva dos fármacos identificados através da comparação de domínios funcionais conservados	51
3.1.4	Construção da lista final de fármacos com potencial atividade contra <i>N. gonorrhoeae</i>	60
3.2	Validação experimental <i>in vitro</i>	61
3.2.1	Determinação de concentrações mínimas inibitórias dos fármacos selecionados pelo método de reposicionamento <i>in silico</i>	61
3.2.2	Avaliação do efeito dos fármacos selecionados pelo método de reposicionamento <i>in silico</i> sobre o valor de CMI de antibióticos	62
3.2.3	Ensaio de sinergismo pelo método de “Checkerboard”	65
3.2.4	Avaliação da atividade dos fármacos selecionados pelo método de reposicionamento <i>in silico</i> em isolados clínicos de <i>N. gonorrhoeae</i>	66
3.2.4.1	Determinação dos valores de CMIs dos fármacos selecionados pelo método de reposicionamento <i>in silico</i> em isolados clínicos de <i>N. gonorrhoeae</i>	66
3.2.4.2	Avaliação do efeito dos fármacos selecionados pelo método de reposicionamento <i>in silico</i> sobre o valor de CMI de antibióticos em isolados clínicos de <i>N. gonorrhoeae</i>	68
3.2.5	Avaliação da atividade de efluxo de <i>N. gonorrhoeae</i> por fluorometria em tempo real	68
3.2.5.1	Avaliação do efeito dos fármacos selecionados pelo método de reposicionamento <i>in silico</i> sobre o valor de CMI do brometo de etídio em <i>N. gonorrhoeae</i>	70
3.2.5.2	Ensaio de acumulação de brometo de etídio	70

3.2.5.3	Ensaios de acumulação de brometo de etídio na presença de fármacos identificados pelo método de reposicionamento <i>in silico</i>	73
4	Discussão	76
4.1	Identificação de fármacos com atividade potencial contra <i>N. gonorrhoeae</i> através de uma estratégia de reposicionamento <i>in silico</i>	77
4.2	Avaliação da atividade <i>in vitro</i> dos fármacos selecionados pela estratégia de reposicionamento <i>in silico</i>	78
4.2.1	Acetazolamida.....	79
4.2.2	Atovaquone	80
4.2.3	Dequalinio	81
4.2.4	Doxorrubicina.....	81
4.2.5	Amlodipina.....	83
4.2.6	Clomipramina.....	83
4.2.7	Metformina.....	84
4.2.8	Topiramato	84
4.2.9	Sulpirida	85
4.2.10	Tiabendazol	85
4.2.11	Benzotiazida	86
4.2.12	Verapamil, tioridazina e clorpromazina	86
5	Conclusão	88
6	Referências.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estrutura do invólucro celular de <i>N. gonorrhoeae</i>	2
Figura 1.2. Incidência global de gonorreia em 2016.....	3
Figura 1.3. Distribuição de casos confirmados de gonorreia por 100 000 habitantes de acordo com a idade e o género na Europa.	4
Figura 1.4. Percentagem de casos de gonorreia por categoria de transmissão e género (n=85 858) na UE	5
Figura 1.5. Cronologia da descoberta de antibióticos utilizados no tratamento da gonorreia e mecanismos de resistência correspondentes em <i>N. gonorrhoeae</i>	17
Figura 1.6. Linha temporal do processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos.....	25
Figura 2.1. Exemplo de resultado da análise ConSurf das regiões funcionais da proteína V-type proton ATPase subunit B, brain isoform, alvo aprovado (com fármaco aprovado), homólogo da proteína X de <i>N. gonorrhoeae</i>	34
Figura 2.2. Representação esquemática de uma microplaca de 96 poços para determinação de CMI.	41
Figura 2.3. Representação esquemática de uma microplaca de 96 poços para determinação do efeito dos fármacos em estudo na CMI de antibióticos.....	43
Figura 2.4. Representação esquemática de uma microplaca de 96 poços para ensaios de sinergismo pelo método de “Checkerboard”.	45
Figura 2.5. Representação esquemática de uma microplaca de 96 poços para ensaios de acumulação com concentrações crescentes de brometo de etídio.	47
Figura 2.6. Representação esquemática de uma microplaca de 96 poços para ensaios de acumulação de brometo de etídio na presença de fármacos.....	48
Figura 3.1. Fluxograma da estratégia de reposicionamento <i>in silico</i> de fármacos e resultados correspondentes.....	50
Figura 3.2. Análise ConSurf das regiões funcionais de um alvo de fármaco aprovado e o alvo correspondente em <i>N. gonorrhoeae</i>	52
Figura 3.3. Acumulação de concentrações crescentes de brometo de etídio na estirpe <i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 49226 (0,06 a 8 µg/mL) e nos isolados clínicos 10214 e 12245 (0,125 a 16 µg/mL).	72
Figura 3.4. Acumulação de brometo de etídio na presença de fármacos na estirpe <i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 49226 e nos isolados clínicos 10214 e 12245.	74

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Estirpe e isolados clínicos de <i>N. gonorrhoeae</i> utilizados neste trabalho.....	37
Tabela 2.2. Composição dos meios de cultura e suplemento utilizados para crescimento de <i>N. gonorrhoeae</i> neste trabalho.....	38
Tabela 2.3. Preparação das soluções “stock” de antibióticos, fármacos identificados pelo método de reposicionamento <i>in silico</i> e EtBr utilizados neste trabalho.....	39
Tabela 3.1. Descrição dos 57 fármacos resultantes da análise ConSurf: classe a que pertencem, respectivos alvos preditivos nas estirpes estudadas e informação sobre testagem prévia em <i>N. gonorrhoeae</i>	53
Tabela 3.2. Valores de CMI dos fármacos selecionados pelo método de reposicionamento <i>in silico</i> para <i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 49226.....	63
Tabela 3.3. Valores de CMI de antibióticos na presença dos fármacos selecionados <i>in silico</i> e de clorpromazina, tioridazina e verapamil a $\frac{1}{4}$ da CMI em <i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 49226.	64
Tabela 3.4. Valores de FICI correspondentes ao efeito de atovaquone, acetazolamida, doxorrubicina, amlodipina e sulpirida na CMI de antibióticos na estirpe <i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 49226.	65
Tabela 3.5. Valores de CMI dos 11 fármacos selecionados <i>in silico</i> , clorpromazina, tioridazina e verapamil para a estirpe <i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 49226 e para os 10 isolados clínicos.	67
Tabela 3.6. Valores de CMI de antibióticos na presença de fármacos selecionados, a $\frac{1}{4}$ da CMI, em isolados clínicos de <i>N. gonorrhoeae</i>	69
Tabela 3.7. Valores de CMI do brometo de etídio na presença dos 11 fármacos selecionados na análise <i>in silico</i> e de clorpromazina, tioridazina e verapamil a $\frac{1}{4}$ da CMI para a estirpe <i>N. gonorrhoeae</i> ATCC49226 e para os isolados clínicos 10214 e 12245.....	71
Tabela 3.8. Valores de RFF dos fármacos testados nos ensaios de acumulação de brometo de etídio para as três estirpes de <i>N. gonorrhoeae</i> estudadas.	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC – “ATP-binding cassette”

AC- Anidrase carbónica

Aml – Amlodipina

Aceto - Acetazolamida

Atv - Atovaquone

Azn – Azitromicina

Benz - Benzotiazida

CDC - Centro de Controlo e Prevenção de Doenças

Cfm – Cefixima

Cip – Ciprofloxacina

Clo - Clomipramina

CLSI - “Clinical and Laboratory Standards Institute”

CMI - Concentração mínima inibitória

Cpz - Clorpromazina

Cro – Ceftriaxona

Deq - Dequalinio

DHPS - Dihidropteroato sintetase

DMSO – Dimetil Sulfóxido

Dox - Doxorrubicina

ECDC - Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças

ESC - Cefalosporinas de espectro alargado (do inglês “Extended spectrum cephalosporins”)

EtBr – Brometo de Etídio

EUA - Estados Unidos da América

EUCAST - “European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing”

FDA - “Food and Drug Administration”

FMP – Força motriz de protões

FR – Fumarato redutase

GARDP - “The Global Antibiotic Research and Development Partnership”

Gtm - Gentamicina

HSH - Homens que fazem sexo com homens

IST - Infecções sexualmente transmissíveis

KEGG - “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”

Km - Canamicina

MATE- “Multidrug and toxic compound extrusion”

MDR - Multirresistente (do inglês “multidrug resistant”)

Met - Metformina

MFS - “Major facilitator superfamily”

NAAT- Testes de amplificação de ácidos nucleicos

NASDAQ:ETTX - “Entasis Therapeutics”

NEB - Nova Entidade Biológica

NEM - Nova Entidade Molecular

Ofl - Ofloxacina

OMS - Organização Mundial da Saúde

PABA - Ácido para-aminobenzóico

PBP - Proteínas de ligação à penicilina

PBS - “Phosphate-buffered saline”

Pen - Penicilina

RND - “Resistance-nodulation-cell division”

ROS – Radicais livres de oxigénio

SD – Succinato desidrogenase

Sh - Espectinomicina

SMR - “Small multidrug resistance”

SNP - “Single nucleotide polymorphism”

Sul - Sulpirida

Tbz – Tiabendazol

Tet – Tetraciclina

Top - Topiramato

TSA - Teste de suscetibilidade aos antibióticos

Tz - Tioridazina

UE - União Europeia

Vp - Verapamil

XDR - Extensivamente resistente (do inglês “extensively drug resistant”)

LISTA DE UNIDADES

μg – Micrograma

μm - Micrómetros

μM - Micromolar

g – Gramas

h- horas

L - Litros

mg – Miligramas

min – Minutos

mL – Mililitro

$^{\circ}\text{C}$ – Graus celsius

s – Segundos

1 Introdução

1.1 *Neisseria gonorrhoeae*: Características fisiológicas e estruturais

Neisseria gonorrhoeae pertence à família *Neisseriaceae* e ao género *Neisseria*. Morfologicamente, *N. gonorrhoeae* apresenta-se sob a forma de cocos com diâmetro entre 0,6 e 1,0 µm, organizados em pares (diplococos) com os seus lados achatados adjacentes (1). São bactérias aeróbias de coloração de Gram negativa, imóveis, não formadoras de esporos, oxidase positivas e catalase positivas. Produzem ainda ácido através da oxidação de hidratos de carbono, uma característica que foi historicamente usada para distinguir as espécies de *Neisseria* (2, 3). Ao contrário das espécies não patogénicas pertencentes a este género que podem crescer em meio simples, *N. gonorrhoeae* é uma espécie fastidiosa que requer meios complexos para o seu crescimento. Além disso, apresenta melhor crescimento a temperaturas entre os 35 e os 37 °C numa atmosfera com cerca de 5% de dióxido de carbono (2, 3).

Em termos estruturais, possui um invólucro celular que consiste numa membrana interna, um espaço periplasmático que contem o peptidoglicano da parede celular e uma membrana externa que contem o lipo-oligossacárido. Este invólucro celular possui ainda um conjunto de estruturas à superfície responsáveis pela adesão e invasão das células, evasão ao sistema imunitário, efluxo de compostos tóxicos e aquisição de ferro (Figura 1.1):

- Pili - Em *N. gonorrhoeae*, os pili, nomeadamente o pilus tipo IV, são essenciais na colonização e desempenham um conjunto de funções tais como a iniciação da adesão às células e tecidos do hospedeiro, a auto aderência e aderência a outras células de *N. gonorrhoeae*, a proteção contra a ação dos neutrófilos e transferência genética horizontal por transformação de ácido desoxirribonucleico (ADN).
- Proteínas Opa - Estas proteínas atuam principalmente como adesinas que se ligam a um variado conjunto de recetores nas células e tecidos do hospedeiro.
- Porina PorB - É a proteína mais abundante na membrana externa de *N. gonorrhoeae* e tem sido associada com: (i) a desgranulação dos neutrófilos, protegendo a bactéria da resposta inflamatória do hospedeiro; (ii) o aumento da adesão celular; (iii) a invasão das células epiteliais; (iv) a modulação da apoptose; (v) a resistência aos antibióticos; (vi) a expressão de alguns antígenos que permitem que a bactéria escape à ação dos fatores do complemento.
- Proteínas Rmp - Estimulam a produção de anticorpos que bloqueiam a atividade bactericida do soro.
- Bombas de efluxo - *N. gonorrhoeae* produz pelo menos cinco sistemas de bombas de efluxo: MtrC–MtrD–MtrE, MacA–MacB–MtrE, NorM, FarA–FarB–MtrE e MtrF64.

Estas bombas de efluxo desempenham um papel tanto na patogénese como na remoção de moléculas tóxicas e de antimicrobianos.

- Sistemas de aquisição de ferro - O ferro é essencial para o crescimento e metabolismo de *N. gonorrhoeae*. As bactérias têm a capacidade de competir com o hospedeiro humano pelo ferro através de três sistemas que conseguem removê-lo de proteínas humanas. Em *N. gonorrhoeae*, foram descritos sistemas de aquisição de ferro associado à transferrina (TbpA-TbpB), à lactoferrina (LbpA-LbpB) e ao heme (HpuA-HpuB) (2–4).

Além do que foi descrito anteriormente, é ainda importante realçar que os epítomos antigénicos dos pili expostos à superfície podem variar, a expressão do pilus pode ser perdida, o número e tipo de proteínas Opa que são expressas varia e o tipo de açúcares nas moléculas do lipooligossacárido pode mudar. Esta variabilidade é importante na evasão ao sistema imunológico e pode permitir reinfeções, inclusive com a mesma estirpe de *N. gonorrhoeae*. Além disso, a variabilidade destas moléculas de superfície faz com que nenhuma delas seja candidata como alvo para a criação de uma vacina o que tem dificultado e até impossibilitado o seu desenvolvimento até aos dias de hoje (5).

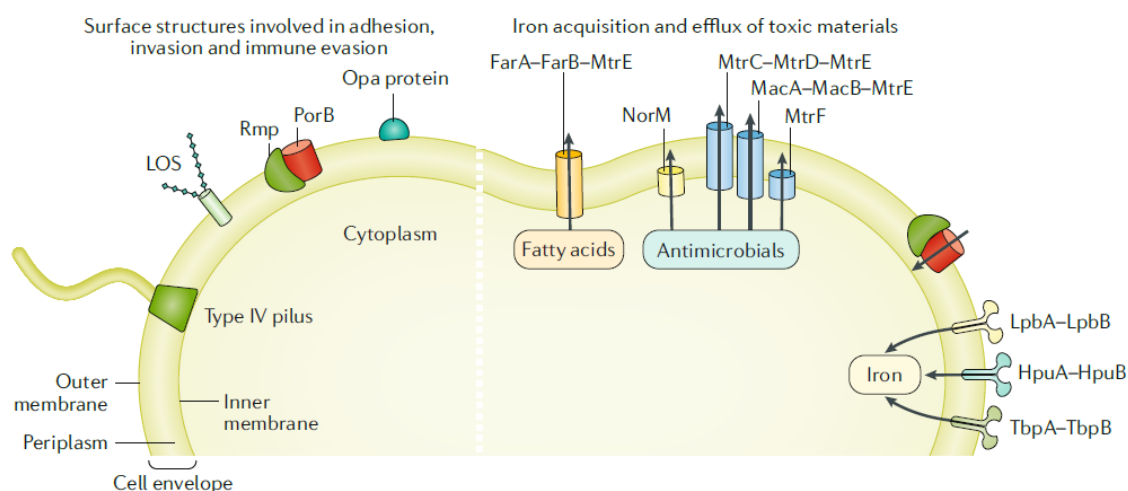


Figura 1.1. Estrutura do invólucro celular de *N. gonorrhoeae* (4).

1.2 Epidemiologia

Quando vários países, especialmente os industrializados, se dedicaram à prevenção e tratamento de infeções sexualmente transmissíveis (IST), verificaram-se declínios das taxas de infeção gonocócicas durante o final dos anos oitenta do século XX. Contudo, este decréscimo não durou muito e no final dos anos noventa já se verificava um novo aumento do número destas infeções. Alguns fatores como a origem étnica, a sexualidade e preferências sexuais, a promiscuidade sexual, as disparidades nas situações económicas e no acesso a serviços e as características

intrínsecas do organismo patogénico foram apontados como sendo responsáveis por este aumento. Outras razões para o recente aumento na incidência de gonorreia incluem mudanças do comportamento sexual na era do tratamento antirretroviral para a infeção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) (isto é, devido à disponibilidade de tratamento antirretroviral e à percepção de que a infeção por VIH já não é tão ameaçadora para a vida, as pessoas são menos cautelosas e fazem sexo com parceiros novos e casuais sem usar preservativos), maior conectividade eletrónica (por exemplo, o uso de aplicações online para encontrar parceiros sexuais), maior número de parceiros desconhecidos, maiores redes sexuais e aumento do número de viagens (4). Além disto, a implementação de sistemas de vigilância mais eficazes e o uso de testes de diagnóstico mais sensíveis contribuem igualmente para o aumento da deteção de novos casos de gonorreia (6).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a taxa de incidência, definida como o número de novas infeções ou diagnósticos num período específico, foi de 20/1000 nas mulheres e 26/1000 nos homens em 2016 o que se traduz num total de 86,9 milhões de novos casos (Figura 1.2). Foi também estimado, no mesmo ano, que a prevalência global de gonorreia urogenital foi de 0,9% nas mulheres e 0,7% nos homens o que corresponde a um total de 30,6 milhões de casos deste tipo de gonorreia (7).

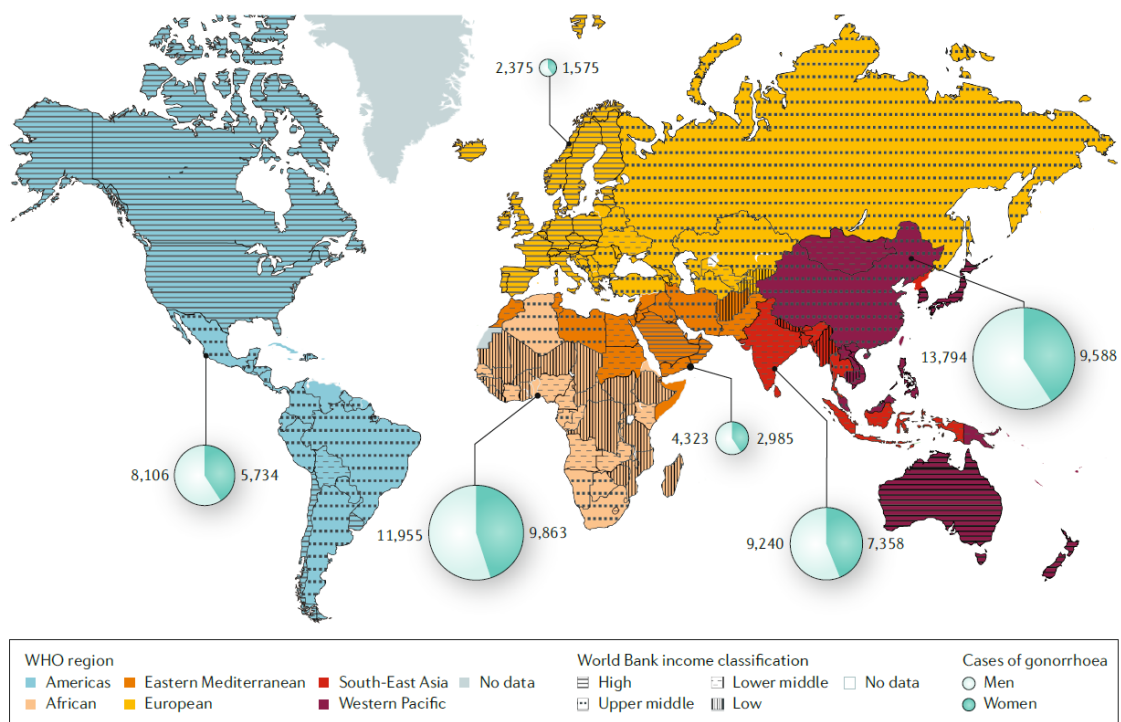


Figura 1.2. Incidência global de gonorreia em 2016. Número estimado (em milhões) de novos casos de gonorreia em adultos dos 15-49 anos. (4).

De acordo com o Centro de Controlo e Prevenção de Doenças (CDC), nos Estados Unidos da América (EUA), houve um total de 616 392 novas infeções em 2019 o que representa um aumento de 92% desde 2009 (8). Foi igualmente verificado aumento da incidência de gonorreia na Austrália (80,2%) e no Canadá (65,4%) (7).

Na última década, na Europa, verificou-se uma tendência para o aumento de casos reportados em todos os grupos de risco, principalmente em homens que fazem sexo com homens (HSH; 586%). No entanto, o número de casos em mulheres também tem vindo a aumentar de forma continuada e acentuada ao longo da década (230%) e chegou inclusive a ultrapassar, em 2018, o número de casos reportados para homens heterossexuais onde esse aumento foi menos acentuado ao longo dos últimos anos (108%) (6).

Pela primeira vez desde que o Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças (ECDC) coordena o programa europeu de vigilância das IST, foram reportados mais de 100 000 casos num único ano. Houve um total de 100 673 casos em 28 países em 2018 o que representa um aumento de 12% em relação a 2017. A gonorreia é a segunda IST mais notificada na Europa, perdendo apenas para infeções por *Chlamydia trachomatis*, e o número de casos reportados tem vindo a aumentar todos os anos, particularmente em mulheres e nos HSH. A maior parte dos casos reportados em 2018 são das faixas etárias dos 25 aos 34 anos (37% dos casos) e dos 15 aos 24 anos (34% dos casos). No grupo etário dos 15 aos 19 anos a taxa de casos notificados é mais elevada nas mulheres (66/100 000) do que nos homens (47/100 000). Nos restantes grupos etários essa taxa é maior nos homens e menor nas mulheres (Figura 1.3) (6).

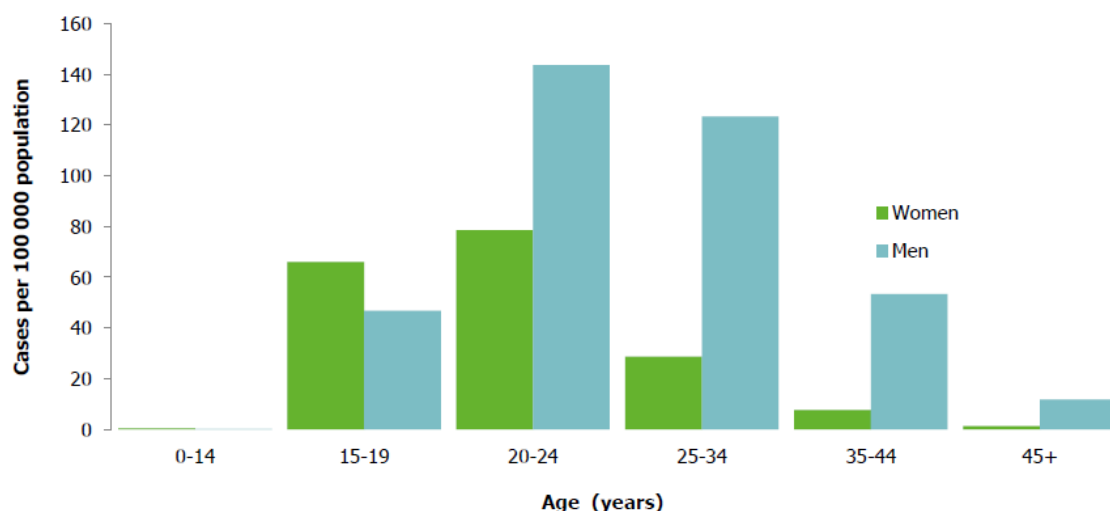


Figura 1.3. Distribuição de casos confirmados de gonorreia por 100 000 habitantes de acordo com a idade e o género na Europa (6).

Relativamente à transmissão, em 2018, dados de 17 dos 28 países da União Europeia (UE) indicam que 48% dos casos reportados eram de HSH, 43% eram de pessoas heterossexuais e os restantes 9% foram reportados como “desconhecido” (Figura 1.4). Dos casos referentes à população masculina 70% eram de HSH (6).

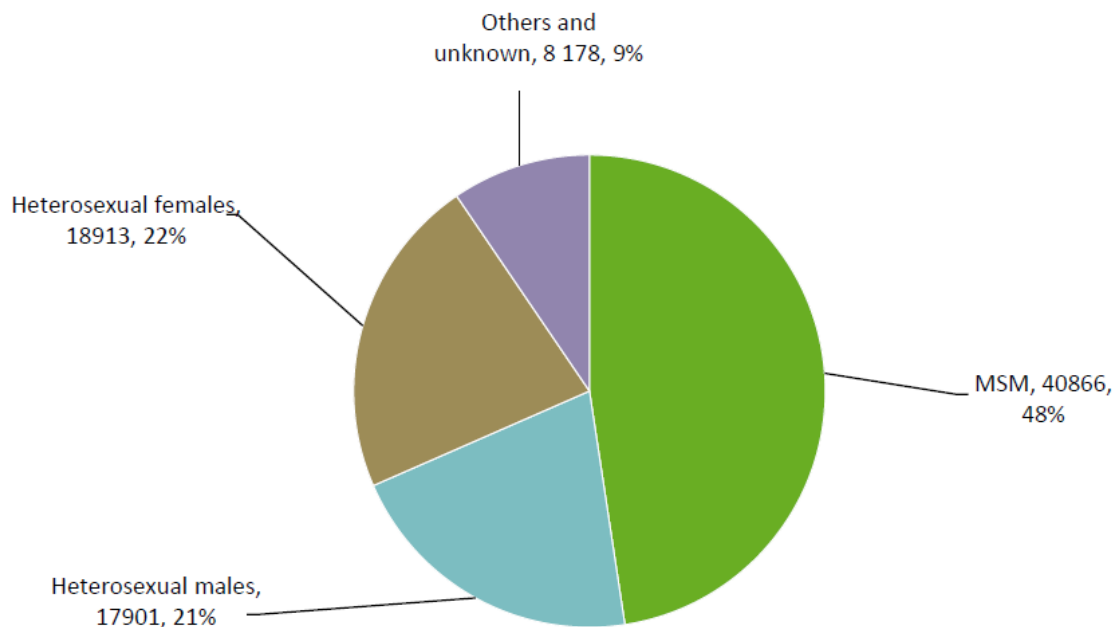


Figura 1.4. Percentagem de casos de gonorreia por categoria de transmissão e género (n=85 858) na UE (6). MSM, Homens que fazem sexo com homens

Apesar de serem elevados e preocupantes, estes números não representam ainda a total extensão desta epidemia, pois muitos casos não são diagnosticados (por exemplo, pessoas assintomáticas) ou não são reportados (6).

1.3 Transmissão e sintomas

A transmissão de gonorreia ocorre através de relações sexuais e causa uretrite aguda nos homens e cervicite nas mulheres. Dependendo das práticas sexuais podem também ocorrer infeções retais e faríngeas que são, geralmente, assintomáticas (9).

No caso do homem, a uretrite é maioritariamente sintomática ($\geq 90\%$ dos casos) e manifesta-se através de um corrimento uretral purulento, disúria e polaquiúria, podendo também, caso a infeção não seja detetada ou corretamente tratada, ascender ao trato genital superior e causar complicações como prostatite, orquite, epididimite e abscessos periuretrais (2, 3, 9).

Nas mulheres, a cervicite é maioritariamente assintomática ($\geq 50\%$ dos casos), mas nos casos em que a sintomatologia está presente esta caracteriza-se por um corrimento vaginal purulento, dor abdominal, disúria, hemorragias e uretrite. Se a infeção se disseminar para os ovários e trompas de Falópio pode originar abscessos nos tubos ovarianos e salpingite que, caso se estenda para a cavidade peritoneal, dá origem a doença inflamatória pélvica. Em casos mais graves, a infeção pode levar a esterilidade devido à obstrução das trompas de Falópio (2, 3, 9).

Pode ainda ocorrer conjuntivite, que apesar de se poder manifestar em adultos, está essencialmente presente nos recém-nascidos (através da transmissão da infeção da mãe para o filho durante o parto) e que se manifesta como uma conjuntivite purulenta cerca de um a três dias após o parto (3, 9).

Por último, pode ocorrer uma infeção disseminada originando artrite, endocardite ou infeção gonocócica disseminada (artrite, eritema cutâneo e febre). No entanto, estas manifestações são raras nos dias de hoje (3, 9).

1.4 Diagnóstico

Devido à variedade de sintomas e à sua não especificidade para a gonorreia, torna-se importante a realização de testes laboratoriais oportunos e precisos, para doentes sintomáticos, incluindo testes de suscetibilidade a antimicrobianos que permitam a realização de um tratamento adequado. É também importante fazer rastreios em populações chave para identificar e tratar infeções assintomáticas de forma a reduzir a transmissão da infeção e controlar a dispersão das resistências aos antibióticos. Assim, a realização de testes laboratoriais deve ser realizada nas seguintes circunstâncias: após avaliação diagnóstica de sintomas clínicos, na monitorização do tratamento, caso o parceiro sexual tenha sido diagnosticado com *N. gonorrhoeae*, caso haja um novo parceiro sexual ou uma troca frequente de parceiros sexuais e em casos de abuso sexual (10). Em locais com poucos recursos onde o diagnóstico laboratorial não pode ser efetuado, a infeção é geralmente diagnosticada com base nas manifestações clínicas e no historial médico. Contudo, como já foi referido, os sintomas clínicos não são específicos podendo muitas vezes levar a diagnósticos incorretos sendo assim essencial tornar os testes laboratoriais disponíveis nestes locais.

O diagnóstico laboratorial da infeção gonocócica é feito pela deteção direta do organismo patogénico em amostras de esfregaço urogenital, anorretal, faríngea, conjuntival ou em amostras da primeira urina. Atualmente um conjunto variado de diferentes técnicas está disponível para a deteção de *N. gonorrhoeae* das quais a cultura e os testes de amplificação de ácidos nucleicos

(NAATs do inglês “Nucleic Acid Amplification Test”) são os mais adequados. A microscopia de amostras urogenitais coradas também pode ser usada em certos casos. Ensaaios com sondas de ADN, testes antigénicos e testes sorológicos não são recomendados devido a terem uma sensibilidade e especificidade insuficientes (11).

1.4.1 Identificação presuntiva

Os isolados bacterianos obtidos a partir da cultura de amostras clínicas em meio seletivo e que são Gram-negativos e oxidase positivos podem ser presumivelmente identificados como *N. gonorrhoeae*. Uma identificação presuntiva indica apenas que um diplococo Gram-negativo, positivo para oxidase, pode ser isolado de tais amostras não permitindo, no entanto, a identificação específica do organismo em causa. Assim sendo, a identificação presuntiva é apenas suficiente para iniciar a terapia antimicrobiana, mas testes adicionais devem ser realizados para confirmar a identidade de um isolado como sendo realmente *N. gonorrhoeae* (12).

- **Microscopia**

Dependendo do quadro clínico, a microscopia direta pode ser uma ferramenta diagnóstica válida em locais com recursos limitados. Para a microscopia direta são usados dois métodos de coloração diferentes: coloração com azul de metileno e coloração de Gram. A coloração com azul de metileno deve apenas ser usada como critério de diagnóstico para a uretrite sintomática (purulenta) não complicada em homens e apenas quando a coloração de Gram não está disponível. Para as restantes manifestações da doença é necessário realizar a coloração de Gram na qual *N. gonorrhoeae* se apresenta como diplococos Gram-negativos (coloração vermelha) (4) (13). Na uretrite sintomática em homens a sensibilidade da coloração de Gram é superior a 95% e a especificidade é superior a 99% pelo que este método pode por si só ser utilizado para o diagnóstico. Para amostras endocervicais, a sensibilidade desce para 40 a 60% sendo ainda mais baixa em doentes assintomáticos e em amostras faríngeas e retais, pelo que nestes casos a aplicação isolada deste método não é recomendável (12).

- **Cultura**

N. gonorrhoeae é um microrganismo fastidioso que não tolera a desidratação e deve ser inoculado imediatamente no meio de cultura após a colheita da amostra. As placas de cultura devem ser incubadas a uma temperatura entre os 35 e os 37°C, com elevada humidade (70 a 80%), pH entre 6,75 e 7,5 e numa atmosfera com cerca de 5% de CO₂ durante 24 a 48 horas (12).

As amostras de locais normalmente não estéreis (por exemplo, faringe e reto) são semeadas em meio seletivo (por exemplo, Thayer-Martin ou Martin-Lewis) e as amostras de locais estéreis (por

exemplo, urina) são semeadas em meio não seletivo (por exemplo, agar chocolate). Os meios seletivos diferem dos meios de cultura de rotina porque contêm agentes antimicrobianos (ex. vancomicina, colistina e nistatina ou outro agente antifúngico) que inibem o crescimento de outras bactérias e fungos. O uso de meios seletivos pode melhorar o isolamento se a fonte anatômica da amostra contiver outras espécies bacterianas. No entanto, algumas estirpes de *N. gonorrhoeae* demonstraram ser inibidas em meios seletivos (12).

O desempenho de uma cultura depende de vários fatores como o local anatômico de colheita da amostra, o método de colheita, o meio e as condições de transporte usados, o uso ou não de meio seletivo e as condições de incubação. A sensibilidade da cultura para uma amostra urogenital varia de 72 a 95% podendo, no entanto, variar entre 95 e 100% em laboratórios com experiência no manuseamento e cultura desta bactéria. A sensibilidade da cultura apresenta valores muito inferiores aos das amostras urogenitais em amostras faríngeas e retais (14) (4).

- **Teste da oxidase**

O teste de oxidase é utilizado para detetar a presença da enzima citocromo c oxidase na cadeia respiratória de um organismo bacteriano, através da reação com o reagente N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilenodiamina-dihidrocloreto. Este reagente ao entrar em contacto com as colónias de bactérias, e caso a enzima esteja presente, irá originar um composto de cor púrpura. Como *N. gonorrhoeae* produz a enzima citocromo c oxidase é de esperar que esta reação ocorra e que o teste da oxidase seja positivo (15).

1.4.2 Identificação confirmatória

Apesar de, como já referido, uma identificação presuntiva ser suficiente para iniciar a terapêutica, deve-se confirmar o diagnóstico recorrendo a testes laboratoriais bioquímicos e/ou enzimáticos a partir de uma cultura pura (15).

- **Teste da utilização dos açúcares**

Este teste foi introduzido por Kellog e Turner em 1973 e depende de enzimas produzidas durante o crescimento bacteriano e que têm a capacidade de degradar hidratos de carbono como a glucose, sacarose, maltose e lactose. Neste teste utiliza-se uma suspensão bacteriana que é adicionada a uma solução contendo cada um destes açúcares. Caso haja utilização dos açúcares e consequente acidificação do meio este irá mudar de cor para amarelo. As várias espécies de *Neisseria* utilizam diferentes hidratos de carbono sendo que *N. gonorrhoeae* utiliza apenas a glucose, pelo que apenas se espera uma alteração de cor no meio contendo este açúcar (16).

- **Testes bioquímicos comerciais Analytical Profile Index (API)**

Um teste bioquímico comercial muito utilizado é o API® NH (bioMérieux) que permite a identificação de *Neisseria*, *Haemophilus* e *Branhamella catarrhalis*. Este teste contém treze poços (dos quais quatro são para a utilização dos hidratos de carbono, oito são para as reações enzimáticas e um para detetar a produção de penicilinase) nos quais se inocula *N. gonorrhoeae* durante 2 horas a 35°C. Após este período de incubação, é feita a comparação dos resultados obtidos nos treze poços com a tabela de interpretação do teste comercial que utiliza um sistema numérico. A soma final dos valores obtidos leva à identificação do microrganismo presente na amostra em estudo (17).

- **Testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT)**

Os testes NAATs para deteção de *N. gonorrhoeae* tornaram-se disponíveis no início da década de noventa e são, atualmente, recomendados para o seu diagnóstico em países com recursos para tal. Estes testes são feitos para amplificar e detetar sequências de ácidos nucleicos que são específicas para o organismo em estudo. No caso de *N. gonorrhoeae* algumas das sequências usadas são por exemplo sequências no gene *opa*, regiões específicas do ARNr 16S e sequências cromossomais (18). Embora ofereçam várias vantagens em relação aos métodos de deteção tradicionais, como uma maior sensibilidade e especificidade em relação à cultura e uma maior rapidez e facilidade na sua realização, os NAATs possuem algumas limitações que incluem o custo, o risco de contaminação residual e a incapacidade de fornecer dados sobre a resistência a antibióticos. Além disso, existem limitações relacionadas com as sequências que são exclusivas dos NAATs de *N. gonorrhoeae*. Em particular, é importante ter em conta os falsos positivos que se originam principalmente através da troca genética horizontal que ocorre frequentemente dentro do género *Neisseria* e que faz com que as espécies comensais de *Neisseria* adquiram genes de *N. gonorrhoeae*. Além disso, alguns subtipos de *N. gonorrhoeae* podem não ter as sequências específicas que são alvo de um NAAT, originando neste caso falsos negativos (4).

Os NAAT são recomendados para a deteção de infeções urogenitais causadas por *N. gonorrhoeae* em homens e mulheres com ou sem sintomas e para o diagnóstico de infeções retais e faríngeas visto serem os testes mais sensíveis para infeções extragenitais. Semelhante a outros testes não culturais, os NAATs não requerem organismos viáveis. O aumento da sensibilidade destes testes é atribuível à sua capacidade teórica de produzir um sinal positivo a partir de apenas uma única cópia do ADN ou ARN alvo. Esta alta sensibilidade permite o uso de amostras recolhidas de formas menos invasiva, como a primeira urina e esfregaços vaginais para detetar *N. gonorrhoeae*. Estes testes apresentam no geral uma elevada sensibilidade (>90%) e especificidade (≥99%) mas que variam consoante o local de recolha das amostras e o NAAT utilizado (10) (12).

- **Teste de Suscetibilidade aos Antibióticos**

O teste de suscetibilidade aos antibióticos é um dos procedimentos mais importantes durante o diagnóstico laboratorial de *N. gonorrhoeae*, pois permite avaliar a eficácia de um determinado antibiótico. Geralmente, o teste é realizado de forma a indicar uma concentração mínima inibitória (CMI) para determinado antibiótico em µg/mL ou mg/L. Os resultados obtidos são interpretados por comparação com valores de “breakpoint” de referência. Esses valores estão disponíveis em diretrizes e recomendações elaboradas por grupos de especialistas como o “European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing” (EUCAST) e o Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI). Visto que os “breakpoints” por vezes não são idênticos em ambas as diretrizes, é sempre importante indicar qual delas se está a utilizar na interpretação dos resultados (10).

Para *N. gonorrhoeae*, existem três opções principais de testes de suscetibilidade aos antibióticos: método de diluição em agar, método de difusão em disco e método epsilométrico (Etest®) (10).

- **Método de diluição em agar:** este é o método “gold standard” recomendado pela OMS para testes de suscetibilidade aos antibióticos em *N. gonorrhoeae*. Consiste na preparação de uma gama definida de concentrações de um antibiótico que são incorporadas separadamente em placas de Petri distintas com meio de cultura. A placa com a concentração mais baixa que inibe o crescimento corresponde à CMI para esse antibiótico. No entanto, este método é complexo de realizar por ser muito trabalhoso principalmente na preparação das placas de meio com antibiótico (19).
- **Método de difusão em disco:** neste método, discos contendo concentrações definidas de antibióticos são colocados na superfície do agar, difundindo-se e inibindo o crescimento. Após incubação, o diâmetro da área à volta do disco que não apresenta crescimento é medida em milímetros sendo esse valor posteriormente comparado com os “breakpoints” definidos e obtendo-se assim o padrão de suscetibilidade aos antibióticos em estudo. Este método só é recomendado quando a determinação da CMI não pode ser realizada e os resultados que apresentem relevância clínica devem ser sempre que possível complementados por testes de confirmação utilizando outros métodos (20) (21).
- **Método epsilométrico (Etest®):** Devido às limitações do método de diluição em agar, o método epsilométrico é atualmente o método de preferência. Neste teste, uma tira com um gradiente crescente de concentrações para um determinado antibiótico é colocada na placa e o antibiótico difunde-se no meio de cultura. Após incubação, o valor mais baixo de concentração que inibe o crescimento bacteriano é considerada como a CMI para esse antibiótico. Esse valor é depois comparado com o “breakpoint” de referência e o padrão de suscetibilidade ao antibiótico é obtido (22).

1.5 Terapêutica para infeções por *N. gonorrhoeae*

Devido ao desenvolvimento de resistências aos antibióticos, as opções terapêuticas para tratar infeções por *N. gonorrhoeae* têm vindo a diminuir ao longo dos anos e são atualmente muito limitadas, existindo inclusive estirpes para as quais já não restam praticamente opções de tratamento disponíveis (23).

De acordo com as diretrizes de 2016 da OMS, o tratamento recomendado para infeções genitais e retais é:

- Terapia combinada de 250 mg de ceftriaxona intramuscular e 1g de azitromicina oral, ambas em dose única ou 400 mg de cefixima oral e 1g de azitromicina oral, ambas em dose única.
- Monoterapia (baseado em dados locais que confirmem suscetibilidade ao antimicrobiano) de 250 mg de ceftriaxona intramuscular ou 400 mg de cefixima oral ou 2 g de espectinomicina intramuscular, todas em dose única (24).

Para infeções orofaríngeas as recomendações são:

- Terapia combinada de 250 mg de ceftriaxona intramuscular e 1 g de azitromicina oral, ambas em dose única ou 400 mg de cefixima oral e 1g de azitromicina oral, ambas em dose única.
- Monoterapia (baseado em dados locais que confirmem suscetibilidade ao antimicrobiano) de 250 mg de ceftriaxona intramuscular em dose única (24).

A justificação para a introdução da terapia combinada foi abordar o problema da coinfeção por *C. trachomatis*, que ocorre em 10-40% dos indivíduos com gonorreia urogenital, bem como um benefício hipotético de reduzir a emergência e/ou disseminação de resistências aos antimicrobianos (em particular, resistência à ceftriaxona) em *N. gonorrhoeae* (9).

1.6 Resistência aos antimicrobianos

A gonorreia é cada vez mais uma preocupação de saúde pública a nível global que requer atenção internacional urgente. A carga global desta infeção está a aumentar e cresce a ameaça de *N. gonorrhoeae* se tornar numa “super bactéria”, o que poderá reduzir significativamente as opções de tratamento. De facto, apesar da terapêutica antimicrobiana altamente eficaz dos últimos 70 a 80 anos, existe atualmente uma alta prevalência de estirpes de *N. gonorrhoeae* com resistência à maioria dos antimicrobianos que têm vindo a ser introduzidos para o seu tratamento (por exemplo, sulfonamidas, penicilinas, cefalosporinas, tetraciclina, macrólidos e fluoroquinolonas). Em muitos locais do mundo a ceftriaxona é já a última opção de tratamento para uma monoterapia

empírica de primeira linha o que leva a temer que a gonorreia se possa tornar impossível de tratar recorrendo apenas à monoterapia com cefalosporinas de 3ª geração (9) (25).

A aquisição de um novo mecanismo de resistência por clones epidémicos na maioria das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas ocorre como resultado da aquisição, geralmente por conjugação, de elementos genéticos móveis (plasmídeo, transposição, ilhas de resistência genómica, etc.). A capacidade única entre as bactérias do género *Neisseria* de adquirir ADN cromossómico com alta frequência através de transformação a partir de outros géneros de *Neisseria* permite acumular muitas mutações em genes cromossómicos. Ao contrário da maioria das bactérias que precisa de adquirir o estado de competência para captar ADN por meio da transformação, as bactérias do género *Neisseria* permanecem constantemente neste estado (devido à existência do pilus tipo IV), o que facilita a ocorrência deste fenómeno (26).

O uso excessivo e frequentemente não controlado de antimicrobianos, o controlo e monitorização sub-ótimos da resistência antimicrobiana, as falhas no tratamento, a atualização lenta das diretrizes de tratamento e a extraordinária capacidade de *N. gonorrhoeae* de desenvolver, adquirir e reter mecanismos de resistência indicam que, se nada for feito, o problema da resistência aos antimicrobianos agravará ainda mais no futuro (9).

1.6.1 História do desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos

- **Era Pré-Antimicrobiana**

Durante a era pré-antimicrobiana, o tratamento da gonorreia consistia principalmente em viver um estilo de vida saudável, com ar fresco, alimentação adequada e repouso, abstenção de álcool e atividades sexuais em simultâneo com um tratamento com diferentes tipos de bálsamos, irrigações uretrais, compostos químicos e hipertermia. Durante a segunda metade do século XIX um novo método surgiu na qual a infeção era tratada com um tipo de pimenta da Indonésia (cubebs) e com bálsamo extraído de uma árvore da América do Sul (copaíba). Enemas com água e sabão, láudano oral (tintura de ópio) e banhos mornos eram usados para facilitar a retenção de urina e, se necessário, realizava-se cateterismo. A uretrite aguda também podia ser tratada por irrigação uretral anterior com diluições de permanganato de potássio quente durante várias semanas. No final do século XIX, iniciou-se a procura de novos compostos antimicrobianos o que levou à investigação de muitos compostos metálicos como o arsénio, antimónio, bismuto, ouro, prata e mercúrio. Durante a primeira guerra mundial, os soldados recebiam pacotes profiláticos que além de preservativos continham produtos à base destes compostos metálicos. Depois da guerra muitos compostos de mercúrio eram usados no tratamento destas infeções, como por exemplo o mercurocromo-220 que era usado como um antisséptico do trato urinário. Para além

da utilização destes compostos, também eram praticados métodos como a diatermia e hipertermia. Para estes últimos, eram utilizadas “cabines da febre” onde os indivíduos tinham apenas a cabeça no exterior e no interior se mantinham temperaturas acima dos 41°C durante 4 a 6 horas sendo necessários 5 ou 6 tratamentos de 3 em 3 dias para se conseguir curar o doente. Com estes métodos conseguiam-se curar até 80 a 90% dos casos de uretrite gonocócica tendo-se descoberto, mais tarde, que um pré-tratamento com mercurocromo em glucose hipertónica aumentava a eficácia da hipertermia. Além disso, para diminuir o número de tratamentos necessários até à cura do paciente, realizava-se o aquecimento pélvico através da inserção de elementos de aquecimento no reto em homens e na vagina em mulheres durante 2 horas, o que resultava em temperaturas locais de até 44°C (27) (28) (29) (30).

- **Era antimicrobiana**

Em 1935, Gerhard Domagk descobriu a sulfanilamida (uma sulfonamida) que se tornou no primeiro antimicrobiano usado no tratamento da gonorreia e que, durante os primeiros anos da sua utilização, curava entre 80 e 90% destas infeções. Em 1940, a sulfapiramide foi introduzida no mercado e tinha a capacidade de curar a maioria dos casos onde a sulfanilamida falhava. De seguida, surgiu o sulfatiazol que tinha uma eficácia semelhante à sulfapiramide, mas era mais tolerável. Contudo, durante a década de quarenta começaram a surgir elevados níveis de resistência e, em 1944, já se verificavam taxas de 75% de falha terapêutica com sulfatiazol e sulfapiramide entre os soldados italianos e sicilianos da segunda guerra mundial e acima de 30% na população em geral. No final da década de quarenta, mais de 90% das estirpes de *N. gonorrhoeae* demonstrava resistência *in vitro* às sulfonamidas. Para tentar contornar este problema e para se poder continuar a usar as sulfonamidas, foi proposta, na década de sessenta, uma terapia combinada com trimetopim que foi utilizada em doses elevadas no tratamento da gonorreia até aos anos setenta (9) (31) (32).

Em 1943, oito anos após a introdução das sulfonamidas e quando começaram a surgir resistências às mesmas, foi introduzida a penicilina (descoberta em 1928 por Alexander Fleming) para o tratamento da gonorreia. A penicilina era inicialmente usada para tratar os casos em que as sulfonamidas falhavam, mas após a sua introdução rapidamente ultrapassou as sulfonamidas como tratamento preferencial de primeira linha pois tinha a capacidade de curar mais de 95% dos casos de gonorreia recorrendo a pequenas doses de 45 mg. Contudo, em 1946 foram reportados quatro casos de elevado nível de resistência à penicilina e durante as duas décadas seguintes verificou-se um aumento gradual do número destes casos. De facto, vários investigadores reportaram ser necessária uma CMI de penicilina mais elevada para inibir o crescimento *in vitro* de *N. gonorrhoeae*. Apesar disto, a penicilina era ainda eficaz no tratamento da gonorreia e continuou a ser usada durante vários anos. No entanto, após a “epidemia” de gonorreia nos EUA

e em muitos outros países associados à “revolução sexual” da década de sessenta, o nível de penicilina necessária para tratar a gonorreia não complicada aumentou substancialmente e foram relatados vários casos de falha terapêutica. No decorrer dos anos, a quantidade de penicilina recomendada para o tratamento da gonorreia aumentou cem vezes e os mecanismos de resistência cromossômica levaram ao aumento da CMI da penicilina para os 4 µg/mL que corresponde ao dobro da CMI reportada em infecções apenas tratáveis com elevadas doses do antibiótico. Assim, para aumentar a eficácia da penicilina, foi demonstrado no início dos anos setenta que a coadministração de probenecida aumentava os níveis séricos de penicilina e retardava a sua excreção, podendo aumentar as taxas de cura até perto dos 100%. Contudo, durante esta década os aumentos da dose de probenecida tornaram-se problemáticos devido ao desconforto provocado pelas injeções e às reações secundárias e a CMI da penicilina em vários isolados aumentou até 128 µg/mL o que pôs um ponto final na era da penicilina como tratamento para a gonorreia (9) (31) (32) (33).

Durante a década de cinquenta, a tetraciclina, que tinha sido descoberta em 1945 por Benjamin Duggar, foi introduzida como tratamento para a gonorreia especialmente para doentes alérgicos à penicilina. Segundo um estudo de monitorização de terapia da gonorreia, um tratamento de quatro dias com tetraciclina era eficaz em 96,2% dos casos de gonorreia não complicada. Contudo, tal como tinha acontecido com a penicilina, começaram também a surgir gradualmente resistências à tetraciclina (devido a determinantes de resistência cromossômicos) levando ao aumento da CMI deste antibiótico. A emergência do determinante *tetM* no plasmídeo conjugativo (que causa alto nível de resistência à tetraciclina), em meados da década de oitenta, resultou na exclusão da tetraciclina das diretrizes de tratamento nos EUA e em muitos países no mundo (9) (32).

No início dos anos sessenta (1962), a espectinomicina foi sintetizada e comercializada especificamente para o tratamento de gonorreia e destinava-se a tratar os casos em que havia resistência ou em que os doentes eram alérgicos à penicilina. Em 1967, cinco anos após a sua introdução, foi reportada resistência a este antibiótico em estirpes suscetíveis à penicilina nos Países Baixos e, em 1981, foram identificados isolados resistentes à espectinomicina com alto nível de resistência (mediada por plasmídeos) à penicilina nas Filipinas. No mesmo ano, a Coreia do Sul introduziu a espectinomicina como antibiótico de primeira linha para os militares e apenas quatro anos mais tarde já se verificavam falhas nos tratamentos em 8,2% dos casos. Além disto, em 1983 foram reportados muitos casos de isolados resistentes à espectinomicina em Londres o que levou ao abandono deste antibiótico como monoterapia empírica de primeira linha em todo o mundo. Atualmente, a resistência à espectinomicina é rara, contudo este antibiótico não está disponível em muitos países e teme-se que se fosse reintroduzido rapidamente as resistências

seriam selecionadas. Além disso, a espectinomicina é sub-ótima para o tratamento de gonorreia faríngea apresentando uma eficácia que ronda os 80% (9) (32).

Com as resistências que se foram desenvolvendo aos antibióticos acima descritos, surgiu a necessidade, no final dos anos setenta, de desenvolver novos antimicrobianos para o combate à gonorreia. Assim, entramos na era das quinolonas, descobertas por George Lesher e colegas como um subproduto do fabrico de cloroquina na década de sessenta. O ácido nalidíxico foi o primeiro antibiótico desta classe a surgir e foi o predecessor de todas as quinolonas e quinolonas de espectro alargado também conhecidas como fluoroquinolonas e que foram utilizadas no tratamento da gonorreia (9). No início dos anos oitenta, surgiram várias descrições que apontavam esta classe de antibióticos como tendo uma boa eficácia e tolerabilidade após a toma de doses orais únicas. Assim sendo, as fluoroquinolonas começaram a ser amplamente utilizadas no tratamento da gonorreia e a ciprofloxacina em particular (mas também a ofloxacina) foi a mais usada em todo o mundo a partir da segunda metade da década de oitenta. No início da utilização da ciprofloxacina, doses únicas de 250 mg eram suficientes para curar os doentes, mas rapidamente surgiram casos de suscetibilidade reduzida o que levou o CDC, em 1990, a aumentar a dose recomendada para 500 mg (31). Contudo, as resistências surgiram, inicialmente na Região Ocidental do Pacífico Asiático, e depois espalharam-se ao longo dos anos por todo o mundo. Assim, nesta região asiática, a ciprofloxacina deixou de ser usada como tratamento empírico de primeira linha na segunda metade dos anos noventa, apenas dez anos após o início da sua utilização. À entrada do século XXI, começaram a emergir estirpes resistentes à ciprofloxacina na Europa e nos EUA, o que levou a Europa a abandonar o seu uso no início do século e o CDC, em 2007, a retirar o antibiótico da lista de tratamentos recomendados para a gonorreia nos EUA (32) (33).

Com o fim da era das quinolonas, o tratamento da gonorreia começou a ser realizado recorrendo às cefalosporinas de terceira geração, especialmente ceftriaxona e cefixima, mas também à azitromicina, um macrólido usado em terapia combinada com as cefalosporinas. Quanto à azitromicina, este antibiótico já tinha sido incluído como possível tratamento para a gonorreia no início da década de oitenta, altura em que foi desenvolvido sinteticamente como um antibiótico derivado da eritromicina. A meio dos anos noventa, começaram a ser reportados casos de suscetibilidade reduzida à azitromicina na América Latina onde este antibiótico era usado não só no tratamento de gonorreia, mas também no tratamento de outras IST e, rapidamente, emergiram estirpes resistentes em vários países sendo que o primeiro caso de alto nível de resistência à azitromicina foi detetado na Argentina em 2001 (34). Apesar de ter sido amplamente utilizada, a azitromicina não é recomendada para uso em monoterapia devido à possibilidade de desenvolvimento de resistência, mas também devido aos possíveis efeitos adversos resultantes da

toma de doses orais de 2 gramas. Assim, apesar de não ser usada em monoterapia, a azitromicina é usada atualmente em terapia combinada com cefalosporinas de terceira geração (9) (31) (33).

Devido às resistências que surgiram aos variados antibióticos usados no tratamento da gonorreia, mas essencialmente devido ao fim da era das quinolonas, as cefalosporinas de terceira geração, nomeadamente a ceftriaxona (intramuscular) e a cefixima (oral), tornaram-se nos únicos antibióticos recomendados para o tratamento da gonorreia em 2007 pelo CDC (33). No entanto, rapidamente se verificaram casos de suscetibilidade reduzida à cefixima e por volta do ano 2000 a taxa de resistência em seis hospitais do Japão rondava os 30% (31). Mais tarde foram também reportadas falhas na monoterapia com cefixima na Europa e este antibiótico passou a ser recomendado em regime de monoterapia apenas em locais onde haja suscetibilidade confirmada ao mesmo (24).

Quanto à ceftriaxona, em 2017, apesar de a deteção de isolados resistentes a este antibiótico ser ainda rara, já se tinham detetado alguns casos no Japão, França e Espanha levando ao aparecimento de estirpes (H041) extensivamente resistentes (XDR), ou seja, estirpes com resistência a duas ou mais classes de antibióticos na categoria I e a três ou mais na categoria II.

Felizmente, até 2020, baseado em programas de vigilância intensos, a estirpe H041 não se espalhou pela comunidade, e não foram detetadas estirpes semelhantes noutros locais o que pode indicar um baixo “fitness” biológico da mesma (33). Assim, a OMS recomenda também o uso de ceftriaxona em regime de monoterapia apenas em locais onde haja suscetibilidade confirmada ao mesmo (24). O surgimento da resistência às cefalosporinas de espectro alargado (ESC do inglês “Extended Spectrum Cephalosporin”) e a ausência de novos tratamentos têm motivado a utilização de terapias combinadas com ceftriaxona e azitromicina ou cefixima e azitromicina. De acordo com as entidades responsáveis que realizam programas de vigilância, esta estratégia pode desacelerar o aumento das taxas de resistência a estes antimicrobianos (9) (32) (35).

O número cada vez mais reduzido de opções terapêuticas eficazes para gonorreia torna urgente a criação de novos antibióticos para o combate a esta doença. Atualmente existem alguns antibióticos em desenvolvimento em diferentes fases de testagem (36). A descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos será abordada com mais detalhe na seção 1.8 desta dissertação.

1.7 Mecanismos de ação e resistência aos antimicrobianos

N. gonorrhoeae tem uma capacidade extraordinária de alterar o seu material genético, visto que é naturalmente competente para a transformação (transferência de genes parciais ou completos)

durante todo o seu ciclo de vida e pode, também, alterar o seu genoma através de mutações. Em *N. gonorrhoeae*, a maioria dos determinantes de resistência aos antimicrobianos estão localizados nos cromossomas, e apenas os genes do tipo *bla*_{TEM} e *tetM*, que resultam em alto nível de resistência à penicilina e à tetraciclina, respetivamente, são transmitidos por plasmídeos. A resistência às diferentes classes de antibióticos pode ocorrer por vários mecanismos (Figura 1.5), nomeadamente, destruição ou modificação do antibiótico por meios enzimáticos, modificação ou proteção do alvo que se traduz numa redução da afinidade pelo antibiótico, diminuição do influxo e aumento do efluxo (9).

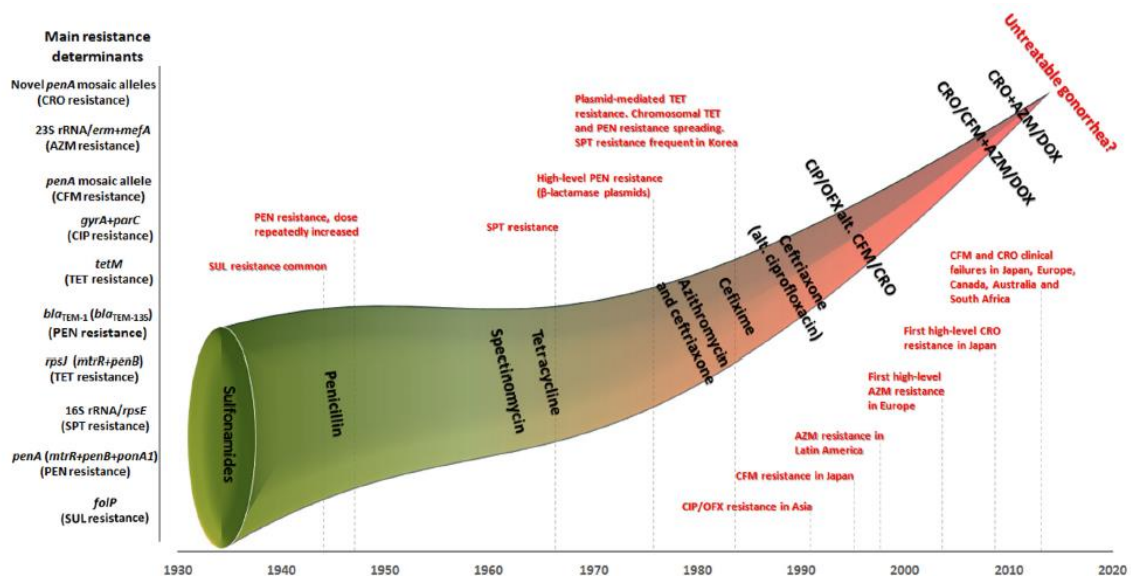


Figura 1.5. Cronologia da descoberta de antibióticos utilizados no tratamento da gonorreia e mecanismos de resistência correspondentes em *N. gonorrhoeae* (9).

1.7.1 Sulfonamidas

- **Mecanismo de ação**

As sulfonamidas são compostos antimicrobianos, competitivos da dihidropteroato sintetase (DHPS), a enzima bacteriana responsável pela incorporação do ácido para-aminobenzóico (PABA) no ácido dihidropteroico, o precursor imediato do ácido fólico. Ao serem análogos estruturais do PABA, as sulfonamidas competem com este pela ligação à DHPS, impedindo que as bactérias utilizem normalmente esta enzima para sintetizar ácido fólico, que é essencial para o microrganismo (37).

- **Mecanismo de resistência**

A resistência a estes antibióticos surgiu em *N. gonorrhoeae* através de dois mecanismos: (i) a bactéria pode hiperproduzir PABA, o que leva a uma disponibilidade deste composto muito superior à do antibiótico; ou (ii) a bactéria pode produzir uma DHPS mutante (através de alterações no gene *folP*) com baixa afinidade para as sulfonamidas (9) (31).

1.7.2 Tetraciclina

- **Mecanismo de ação**

As tetraciclinas inibem a ligação do aminoacil-ARNt ao complexo ARNm-ribossoma, principalmente pela ligação à subunidade 30S do ribossoma e, consequentemente, inibem a síntese de proteínas (9).

- **Mecanismo de resistência**

Resistência mediada por plasmídeos. Elevados níveis de resistência à tetraciclina mediados por plasmídeos são devidos ao gene *tetM*. As proteínas TetM ligam-se ao ribossoma na subunidade 30S libertando a tetraciclina, protegendo-o e impedindo a sua ligação a outras moléculas de tetraciclina, permitindo assim a continuidade da síntese proteica (9) (26).

Resistência codificada cromossomicamente. A resistência à tetraciclina codificada cromossomicamente resulta de mutações que modificam a estrutura da proteína ribossômica. Em particular, estas mutações ocorrem no gene *rpsJ* onde o aminoácido Val57 é substituído por Met57, codificando assim para uma forma alterada da proteína ribossomal S10. Esta mutação encontra-se perto da região aminoacil-ARNt que forma o local de ligação à tetraciclina, o que reduz a afinidade deste antibiótico para o ribossoma (9).

1.7.3 Aminoglicosídeos

- **Mecanismo de ação**

Os aminoglicosídeos inibem a síntese de proteínas pela ligação, com alta afinidade, ao sítio A do ARN ribossômico 16S do ribossoma 30S. Embora os vários membros da classe dos aminoglicosídeos tenham uma especificidade diferente para regiões diferentes no sítio A, todos eles levam a uma alteração da sua conformação. Como resultado dessa interação, o antibiótico promove uma tradução incorreta do ARNm causada por uma leitura errada dos códons. Isso resulta numa síntese proteica propensa a erros, permitindo que aminoácidos incorretos se agrupem

num polipeptídeo que é subsequentemente libertado para a célula onde pode causar vários danos (38).

A espectinomicina, em particular, liga-se à subunidade 30S do ribossoma inibindo a tradução. Este antibiótico interage com o ARNr 16S e durante o alongamento do polipeptídeo bloqueia a translocação catalisada pelo fator de alongamento G (EF-G) do peptido-ARNt do local A para o local P (33).

- **Mecanismo de resistência**

A resistência aos aminoglicosídeos pode surgir através de modificações enzimáticas, modificações do local alvo através de uma enzima ou mutação cromossômica e efluxo (38).

No caso da resistência à espectinomicina, esta ocorre através da modificação do seu alvo. O polimorfismo de nucleótido único (“Single Nucleotide Polymorphism”, SNP) C1192U na região de ligação à espectinomicina na hélice 34 do ARNr 16S causa elevados níveis de resistência a este antibiótico (CMI >1024 µg/mL). Recentemente, verificou-se que uma deleção de Val25 e uma alteração K26E no gene *rpsE* que codifica a proteína ribossomal S5, resulta também em elevada resistência à espectinomicina (9).

1.7.4 Macrólidos

- **Mecanismo de ação**

O mecanismo de ação dos macrólidos é baseado na inibição da síntese das proteínas bacterianas como resultado da ligação ao domínio V do ARNr 23S, dentro da subunidade 50S do ribossoma fazendo com que este liberte proteínas incompletas (9) (26).

- **Mecanismo de resistência**

A resistência bacteriana aos macrólidos pode resultar de um conjunto de mecanismos: (i) mutações no gene que codifica o domínio V do ARNr 23S - as duas mutações descritas, mutação C2611T e mutação A2059G podem causar baixo nível de resistência ou alto nível de resistência, respetivamente; (ii) sobre-expressão dos genes que codificam para a bomba de efluxo MtrCDE ou MacAB - esta sobre-expressão está também associada à diminuição da suscetibilidade aos macrólidos, mas não causa resistência de alto nível, contribuindo apenas para o aumento da CMI. Pode ser causada por alterações da região promotora do gene *mtrR* ou por mutações no próprio gene *mtrR*; (iii) síntese de metilases do ARNr ErmBFCa. Estas metilases bloqueiam a ligação dos macrólidos ao ARNr 23S por metilação de um resíduo de adenosina na posição 2058, que está localizado no domínio da peptidil transferase V (9) (26) (33).

1.7.5 Fluoroquinolonas

- **Mecanismo de ação**

A topoisomerase II (ADN girase) e a topoisomerase IV são enzimas altamente conservadas, essenciais para o metabolismo do ADN. Estas enzimas podem provocar o super enrolamento ou o relaxamento do ADN circular, processos que são essenciais à sobrevivência da bactéria (a ADN girase é a única capaz de realizar super enrolamento negativo tornando o ADN compacto e biologicamente ativo). Estas reações são acopladas à hidrólise de ATP. As quinolonas atuam inibindo a ADN girase e a topoisomerase IV, impedindo assim o desenvolvimento destes processos e levando à morte das bactérias (9).

- **Mecanismo de resistência**

N. gonorrhoeae desenvolve resistência às quinolonas através de mutações que alteram o reconhecimento das topoisomerases pelas quinolonas. A ADN girase consiste num hétero tetrâmero de duas subunidades GyrA e duas GyrB e a topoisomerase IV é um tetrâmero de duas subunidades ParC e duas ParE. As mutações mais frequentes são S91F ou T, A92P, D95N ou A ou G, I97M e Q102H na subunidade GyrA. Apesar de o alvo primário ser GyrA, isolados de *N. gonorrhoeae* com elevado nível de resistência requerem adicionalmente a existência de SNPs específicas em ParC onde as substituições mais comuns são D86N, S87N ou I ou R, S88P, E91K ou G ou A e L106I. Geralmente, as estirpes mais resistentes possuem uma combinação de três ou quatro destas mutações (9) (26) (33).

1.7.6 Penicilina e Cefalosporinas

- **Mecanismo de ação**

Tanto a penicilina como as cefalosporinas inibem a síntese da parede celular bacteriana por ligação a transpeptidases chamadas proteínas de ligação à penicilina (PBPs do inglês “Penicillin-binding proteins”), que estão presentes no periplasma e são essenciais na formação da parede celular através da criação de ligações cruzadas de peptidoglicano (9).

- **Mecanismo de resistência**

Resistência mediada por plasmídeos. Estirpes com elevado nível de resistência à penicilina mediada por plasmídeos, geralmente contêm plasmídeos com o gene *bla*_{TEM-1}, que codifica uma β -lactamase tipo TEM-1. Existem também outros tipos de β -lactamases, como a TEM-135, a TEM-220 e várias outras. Estas enzimas hidrolisam a ligação amida cíclica das penicilinas, abrindo o anel β -lactâmico e tornando a penicilina inativa (9) (26).

Resistência codificada cromossomicamente. Tanto na penicilina como nas cefalosporinas, os principais determinantes de resistência codificados cromossomicamente são alterações específicas em *penA* que codifica a PBP2. No caso da penicilina, essa alteração é a inserção Asp345a. Nas cefalosporinas, a resistência é conferida frequentemente por um mosaico genético que contém entre sessenta e setenta alterações de aminoácidos, das quais nenhuma delas é a inserção Asp345a. Na resistência à penicilina, sugere-se que as mutações no gene *penA* foram adquiridas por transformação de sequências de ADN provenientes de *Neisseria* spp. comensais, em particular *Neisseria cinerea*. Na resistência às cefalosporinas, os alelos mosaico de *penA* emergiram por transformação de ADN, seguida de recombinação, com genes parciais de *penA* provenientes, também, de espécies comensais de *Neisseria*. Estas mutações estão associadas a um maior aumento na CMI da cefixima comparativamente à da ceftriaxona (9) (26).

Além das mutações em *penA*, a resistência a estes antibióticos pode também ser aumentada através de mutações específicas no operão que codifica o sistema de bomba de efluxo MtrCDE, o que resulta numa sobre-expressão dessa bomba e, conseqüentemente, aumenta o transporte dos antibióticos para o exterior da célula (9) (33).

Adicionalmente, também se pode verificar uma diminuição do influxo destes antibióticos através da diminuição da permeabilidade da porina PorB1b, que resulta de mutações no gene *penB*. Estas mutações, ao contrário do que acontece com *penA*, têm um maior impacto na CMI da ceftriaxona do que na CMI da cefixima (9) (33).

Por último, e apenas no caso da resistência à penicilina, também podem acontecer mutações *missense* no gene *ponA* que codifica a PBP1 que, tal como a PBP2, se encontra envolvida na síntese da parede celular. O alelo *ponA1* codifica uma alteração Leu421Pro na PBP1, que reduz a taxa de acetilação da penicilina 3 a 4 vezes, aumentando a resistência a este antibiótico nas estirpes que apresentam esta mutação. Em isolados clínicos, mutações específicas em *pilQ*, como a mutação E666K foram encontradas em estirpes com elevado nível de resistência à penicilina que continham alterações em *penA*, *mtrR* e *penB*. Estas mutações codificam para alterações de perda de função na secretina formadora de poros PilQ do pili tipo IV. Contudo, não é provável que estas mutações se encontrem em isolados clínicos uma vez que interrompem a formação adequada dos pili tipo IV que são essenciais para a patogénese destas bactérias (9) (33).

As mutações em *ponA* e *pilQ* (que além das mutações acima referidas também determinam resistência à penicilina) não parecem afetar as CMIs das cefalosporinas nas estirpes clínicas atualmente em circulação. Apesar disso, a maioria das estirpes com suscetibilidade ou resistência diminuída às cefalosporinas contém o alelo *ponA1*. No entanto, mas este facto provavelmente significa apenas que estas estirpes evoluíram por transferência horizontal de alelos *penA* a partir

de estirpes resistentes à penicilina, que permanecem altamente prevalentes na população de *N. gonorrhoeae* (9) (33).

1.8 Bombas de efluxo

Como já foi referido, a resistência às várias classes de antibióticos pode ocorrer por vários mecanismos, nomeadamente, destruição ou modificação de antimicrobianos por meios enzimáticos, modificação ou proteção do alvo que se traduz numa redução da afinidade aos antimicrobianos, diminuição do influxo e aumento do efluxo. O aumento do efluxo em particular, é resultado da sobre-expressão de bombas de efluxo, causada por mutações nos seus repressores, e desempenha um papel muito importante na resistência de *N. gonorrhoeae* aos antibióticos (9) (39).

Desde a sua descoberta, várias bombas de efluxo foram descritas e agrupadas em cinco categorias ou famílias principais: (i) “Major Facilitator Superfamily” (MFS); (ii) “Small Multidrug Resistance” (SMR); (iii) “Resistance-Nodulation-Cell Division” (RND); (iv) “Multidrug and Toxic Compound Extrusion” (MATE); (v) “ATP-binding Cassette” (ABC) (9).

Dos cinco sistemas de bombas de efluxo descritos em *N. gonorrhoeae*, o sistema MtrCDE pertencente à família RND, o sistema MacAB pertencente à família ABC e o sistema NorM pertencente à família MATE são responsáveis pelo transporte de antibióticos anteriormente ou atualmente recomendados para o tratamento da gonorreia. Especificamente, as bombas MtrCDE conseguem exportar macrólidos, antibióticos β -lactâmicos como a penicilina e as ESC, ciprofloxacina e tetraciclina. Já a bomba de efluxo NorM consegue exportar fluoroquinolonas e a bomba MacAB exporta macrólidos (40) (41) (42).

De todas estas bombas de efluxo, a MtrCDE é a mais estudada e talvez a mais importante devido à variedade de compostos que consegue transportar para o exterior das células. Estirpes de *N. gonorrhoeae* com perfil de suscetibilidade reduzida a substratos desta bomba de efluxo possuem, frequentemente, mutações “missense” numa região de codificação do domínio de ligação ao ADN do gene *mtrR* que codifica o repressor MtrR que se liga ao promotor do operão *mtrCDE*. Geralmente, estirpes com elevado nível de resistência a antibióticos que sejam substratos destas bombas de efluxo possuem mutações no promotor de *mtrR* (43) (44).

Golparian *et al.* demonstraram que a inativação da bomba MtrCDE em estirpes com sobre-expressão da mesma pode tornar *N. gonorrhoeae* clinicamente sensível à penicilina. Além da penicilina, a perda desta bomba de efluxo no isolado clínico H041, responsável pelo primeiro

caso de gonorreia resistente à ESC ceftriaxona, aumentou a sua suscetibilidade à cefixima, ceftriaxona e azitromicina entre 4 a 8 vezes (42) (45) (46).

Tendo em conta estes aspetos, as bombas de efluxo são alvos atrativos para o desenvolvimento de inibidores de efluxo que evitem o desenvolvimento de resistência mediada por bombas de efluxo ou restaurem a atividade de antibióticos em estirpe resistentes (47). Apesar de até aos dias de hoje ainda não haver nenhum inibidor de efluxo disponível para combater as infeções por *N. gonorrhoeae*, têm-se desenvolvido alguns estudos que, noutras bactérias, testam vários compostos que possam atuar a este nível. Por exemplo, em *Mycobacterium tuberculosis* onde muitos dos transportadores de membrana dependem da força motriz de protões (FMP) e da disponibilidade de ATP é sugerido que o metabolismo energético e a produção de ATP através da FMP sejam críticos em determinar a suscetibilidade desta bactéria (48). Assim, a inibição do metabolismo energético pode inibir o funcionamento das bombas de efluxo e restaurar a atividade de alguns antibióticos. Alguns estudos já testaram vários compostos como a tioridazina e o verapamil em *M. tuberculosis* como potenciais inibidores de efluxo (49) (50) (51). Da mesma forma, deve-se ter em consideração a testagem de compostos em *N. gonorrhoeae* que possam produzir este efeito inibitório nas bombas de efluxo como parte de uma solução contra o desenvolvimento de resistências nestas bactérias.

1.9 Descoberta e desenvolvimento de novos fármacos

Por tudo o que foi exposto, torna-se clara a necessidade urgente de desenvolver novos fármacos para combater as infeções por *N. gonorrhoeae*.

Análises realizadas em todas as áreas terapêuticas indicam que o desenvolvimento de um novo medicamento, desde a identificação do seu alvo até à sua aprovação para comercialização, pode demorar pelo menos 11 a 16 anos (Figura 1.6). O custo para desenvolver uma Nova Entidade Molecular (NEM; pequena molécula) ou Nova Entidade Biológica (NEB; um anticorpo, proteína, terapia genética ou outro medicamento biológico) é superior a mil milhões de dólares e, em média, é de cerca de 2,6 mil milhões de dólares (52) (53).

O desenvolvimento de novos fármacos envolve um processo exaustivo que inclui pesquisa básica, identificação e validação de alvos, geração e otimização de “leads”, testes pré-clínicos, testes clínicos em humanos (realizados em várias fases) e aprovação pelas entidades reguladoras. A primeira etapa do desenvolvimento de um fármaco começa com a identificação de um potencial novo alvo de fármaco (proteína, ADN, ARN, metabolito, etc.), seguido da sua subsequente validação para confirmar um efeito terapêutico. Esta confirmação inclui o

desenvolvimento/otimização de ensaios (bioquímicos, de citotoxicidade, *etc.*), nos quais uma metodologia objetiva é utilizada para capturar a interação pretendida entre uma biblioteca de compostos e o alvo específico. Os “hits” confirmados são depois organizados de acordo com a sua classificação química para identificar “leads” (53).

Após a geração e seleção de “leads” entramos na etapa pré-clínica onde estes são submetidos a uma série de ensaios complexos *in vitro* para avaliar características bio-farmacológicas, de absorção, distribuição, metabolismo, excreção (ADME) e propriedades toxicológicas. Uma validação adicional é feita recorrendo à realização destes testes *in vivo* em pelo menos dois modelos animais não humanos. O objetivo da realização desta etapa pré-clínica é fornecer uma ou mais moléculas candidatas aos ensaios clínicos, cada uma das quais apresentando evidência suficiente de atividade biológica num alvo relevante para uma doença em causa, bem como segurança suficiente para que possa ser utilizada em testes humanos. É nestas duas etapas iniciais que a maioria dos compostos falha devido a problemas relacionados com segurança, cinética, potência, proteção de propriedade intelectual, entre outros fatores. A elevada toxicidade e a baixa eficácia são responsáveis pela rejeição de 60% dos fármacos nestas etapas iniciais (52) (53).

Apenas após a realização destas etapas e subsequente validação do(s) fármaco(s) pelas entidades reguladoras é que se pode iniciar a terceira etapa: os ensaios clínicos. Estes ensaios dividem-se em três fases. A fase I é focada na segurança do fármaco, a fase II na sua efetividade e a fase III na confirmação dos resultados obtidos numa população maior.

Se o fármaco tiver sucesso nos ensaios clínicos é então enviado um pedido de utilização de um novo medicamento, submetido à análise e aprovação pelos órgãos reguladores naquilo que constitui a quarta e última etapa do desenvolvimento de novos fármacos (53).

1.9.1 Novos fármacos para *N. gonorrhoeae*

Devido ao elevado investimento financeiro e ao tempo necessários ao desenvolvimento de um novo fármaco, muitas empresas farmacêuticas consideram este mercado como sendo arriscado quando comparado com os possíveis retornos provenientes do desenvolvimento desses mesmos fármacos. Assim, e principalmente devido à redução de financiamento, a capacidade de pesquisa farmacêutica destas empresas tem diminuído. Em resposta, a OMS divulgou em 2017 uma lista de bactérias resistentes a antibióticos que devem ter prioridade no que toca à pesquisa, descoberta e desenvolvimento de novas opções terapêuticas. Essa lista é dividida em “prioridade 1: crítica”, “prioridade 2: alta” e “prioridade 3: média”. *N. gonorrhoeae* encontra-se listada como prioridade alta devido à resistência às cefalosporinas de terceira geração e às fluoroquinolonas. Atualmente,

existem três antimicrobianos promissores em fases avançadas de desenvolvimento clínico: solitromicina, zoliflodacina e gepotidacina (36) (54).

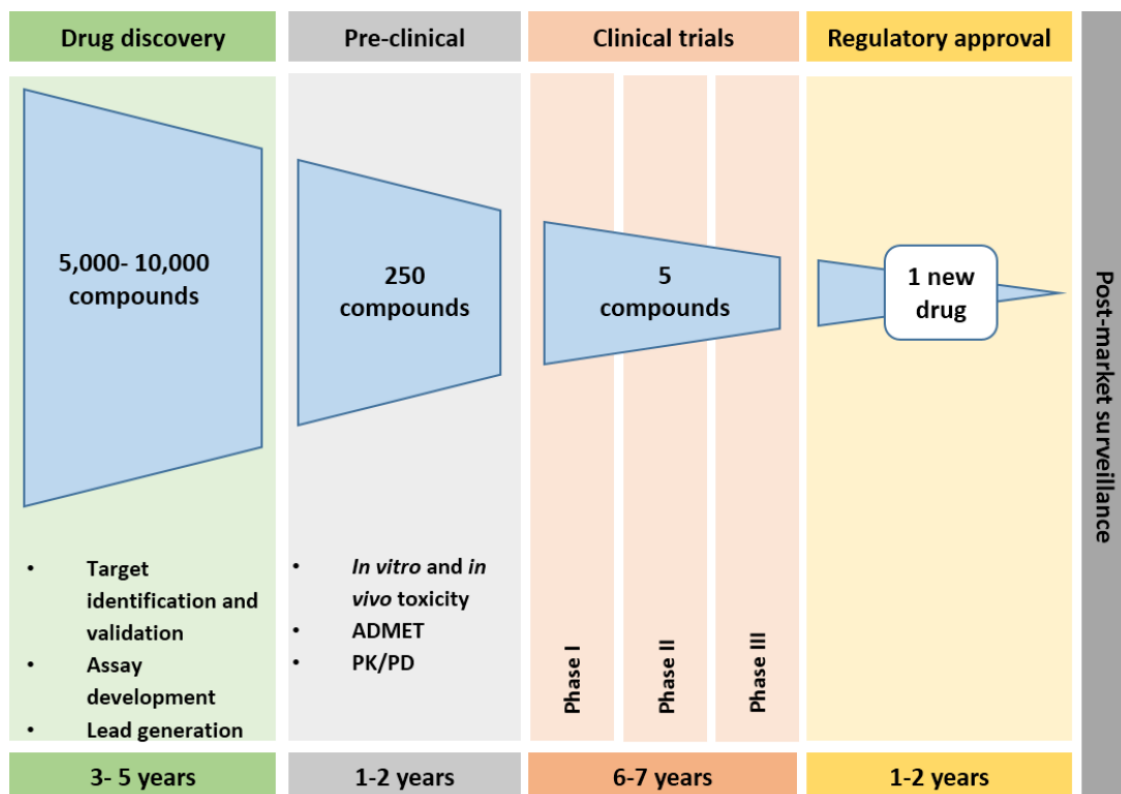


Figura 1.6. Linha temporal do processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos (53).

1.9.1.1 Solitromicina

A solitromicina é semelhante aos antibióticos da classe dos macrólidos, apresentando, porém, algumas diferenças. Uma delas é a ligação de uma cadeia lateral heteroaril-alquil ao anel macrocíclico. Esta cadeia lateral permite a ligação a um segundo local do ARNr 23S resultando numa menor possibilidade do desenvolvimento de resistência. Esta ligação extra resulta em valores de CMIs mais baixos em estirpes resistentes aos macrólidos. Assim, a solitromicina tem atividade *in vitro* eficaz contra a maioria das estirpes de *N. gonorrhoeae*, incluindo as estirpes XDR, H041 e F89 (55) (56) (57).

Um ensaio de segurança não comparativo de fase II, para tratar gonorreia urogenital não complicada, foi realizado nos EUA durante 2012 e 2013. Nesse ensaio, todos os casos de gonorreia comprovada por cultura foram curados. Em termos de segurança, verificou-se que

efeitos secundários gastrointestinais leves eram comuns, mas não afetavam a capacidade dos participantes de realizar a terapia (58).

Posteriormente, a “Cempra pharmaceuticals” realizou, um ensaio aberto (tanto o investigador como o doente sabem qual a medicação que está a ser administrada) de fase III de solitromicina oral de dose única (1 g) para o tratamento de gonorreia urogenital não complicada, com ou sem infecção concomitante de *C. trachomatis*, em comparação com ceftriaxona intramuscular (500 mg) e azitromicina oral em dose única (1 g). Neste ensaio a taxa de cura foi mais baixa no tratamento com solitromicina (80,5%) do que na terapia combinada de ceftriaxona com azitromicina (84,5%). Assim, concluiu-se que o tratamento com solitromicina demonstrou superioridade em relação ao tratamento baseado em ceftriaxona (59).

A continuação dos estudos para o uso da solitromicina foi interrompida em parte como consequência desses resultados provisórios decepcionantes, mas também devido a uma solicitação da “Food and Drug Administration” (FDA) para a obtenção de dados de segurança adicionais sobre o risco de hepatotoxicidade relacionada com a solitromicina no contexto do tratamento da pneumonia bacteriana adquirida na comunidade (60).

1.9.1.2 Zoliflodacina

A zoliflodacina, é uma espiropirimidinetriona oral com atividade inibitória da topoisomerase II que tem como alvo os genes *gyrB* e *parE*, inibindo a síntese de ADN (61).

Os resultados de fase I que incidiram na segurança, tolerabilidade e farmacocinética mostraram que não ocorreu nenhum efeito adverso grave ou morte, nem nenhuma alteração clinicamente significativa nos sinais vitais, eletrocardiogramas ou avaliações laboratoriais dos doentes envolvidos (61).

Em 2014 e 2015, um ensaio multicêntrico de fase II avaliou a eficácia e segurança da zoliflodacina na gonorreia urogenital não complicada. Este ensaio, que envolveu 179 participantes, incorporou três tipos de tratamento e comparou a zoliflodacina em dose única (2 ou 3 g) em formulação oral, com ceftriaxona intramuscular em dose única (500 mg). Os resultados da análise de 141 dos 179 participantes demonstraram que todos os 28 doentes que receberam ceftriaxona foram curados, em comparação com uma taxa de cura de 96% para os doentes que receberam zoliflodacina (55/57 no tratamento com 2 g e 54/56 no tratamento com 3 g). Não houve evidência microbiológica de suscetibilidade reduzida à zoliflodacina nos isolados de *N. gonorrhoeae* pós-tratamento (62).

No dia 26 de março de 2021, a “The Global Antibiotic Research and Development Partnership” (GARDP) e a “Entasis Therapeutics” (NASDAQ: ETTX) anunciaram a ativação do primeiro local

na Tailândia como parte de um estudo clínico global de fase III da zoliflodacina para o tratamento da gonorreia (63).

1.9.1.3 Gepotidacina

A gepotidacina, da classe triazacenaftileno, possui atividade inibitória da topoisomerase II tendo como alvos os genes *gyrA* e *parC*. Análises estruturais demonstraram que o local de ligação desta classe de antimicrobianos é próximo, mas diferente, do local de ligação das fluoroquinolonas, o que levou à previsão de que a gepotidacina seria ativa contra estirpes resistentes às fluoroquinolonas. No entanto, resultados de ensaios de fase II mostraram que a gepotidacina apresenta uma elevada CMI em estirpes resistentes às fluoroquinolonas e que, por vezes, ocorrem falhas no tratamento de infecções provocadas por estas estirpes utilizando este fármaco. Apesar disso, a gepotidacina parece ter atividade *in vitro* eficaz contra uma variedade de isolados de *N. gonorrhoeae*, incluindo os que apresentam um fenótipo XDR (64) (65) (66).

Em 2015 e 2016, um estudo de fase II avaliou a eficácia e a segurança da gepotidacina numa abordagem randomizada, multicêntrica, aberta e de variação de dose. Nesse ensaio, os doentes recebiam 1,5 ou 3 g de gepotidacina. Em termos de segurança, não se registou nenhuma reação adversa e limitante para o tratamento em ambas as doses. Foram analisados os dados de 69 dos 106 participantes tendo havido uma taxa de cura de 97% para doses de 1,5 g (29/30 doentes) e 95% para doses de 3 g (37/39 doentes). As três falhas no tratamento ocorreram em estirpes com resistência às fluoroquinolonas (67).

A “Glaxo Smith Kline” iniciou em outubro de 2019 os estudos de fase III. O primeiro estudo visa comparar a gepotidacina com a combinação de ceftriaxona com azitromicina e esperam-se obter os primeiros resultados no final de 2021 (68).

1.9.2 Reposicionamento de fármacos

Apesar de ser essencial para a indústria farmacêutica, a descoberta de novos fármacos é um processo arriscado devido ao elevado investimento financeiro associado e ao período de tempo necessário para a aprovação dos novos fármacos. Assim, novos métodos capazes de reduzir os custos financeiros e de acelerar o processo de descoberta desses fármacos podem ajudar a reduzir a problemática da falta de medicamentos e da sua necessidade urgente associada, por exemplo, às doenças infecciosas causadas por microrganismos resistentes aos antimicrobianos como é o caso de *N. gonorrhoeae*. Um exemplo desses novos métodos é a estratégia de reposicionamento de fármacos *in silico* (que significa “realizado em computador” ou “via simulação de computador”)

utilizada neste trabalho. Esta estratégia permite encontrar novos usos para fármacos já aprovados permitindo assim poupar tempo e dinheiro. Este método já demonstrou a sua eficácia em estudos anteriores quando, por exemplo, se conseguiu o reposicionamento da miltefosina, que foi originalmente desenvolvida para o tratamento do cancro da mama, e que é agora também utilizada para o tratamento da leishmaniose visceral (69) (70).

No que respeita a *N. gonorrhoeae*, a estratégia de reposicionamento de fármacos foi também utilizada mais que uma vez, recentemente. Por exemplo, a salicilamida é um analgésico e antipirético que demonstrou atividade antibacteriana contra 40 estirpes de *N. gonorrhoeae* resistentes à azitromicina e à ciprofloxacina (CMI entre 8 e 32 µg/mL). Um ensaio de “time-kill” revelou que a salicilamida é um fármaco bactericida rápido, conseguindo erradicar inóculos elevados de *N. gonorrhoeae* em dez horas, tendo sido superior à ceftriaxona na capacidade de reduzir a carga intracelular da bactéria em células endocervicais infetadas. Além disso, um ensaio de “checkerboard” revelou que a salicilamida possui um efeito sinérgico com a tetraciclina (71).

Outro exemplo de reposicionamento de fármacos para *N. gonorrhoeae* são os derivados do ácido antranílico. Neste estudo de reposicionamento, três desses derivados (ácido tolfenâmico, ácido flufenâmico e ácido meclofenâmico) foram identificados como tendo atividade contra *N. gonorrhoeae*. Estes ácidos conseguiram inibir todas as estirpes testadas recorrendo a concentrações entre 2 e 32 µg/mL. O ácido tolfenâmico e o ácido flufenâmico foram os mais eficazes, inibindo o crescimento de 50% das estirpes (CMI₅₀) a 4 e 8 µg/mL respetivamente, e 90% das estirpes (CMI₉₀) a 8 µg/mL. Para efeito comparativo, a azitromicina apresenta CMI₅₀ de 0.5 µg/mL e CMI₉₀ de 16 µg/mL. Além disso, estes ácidos foram superiores à ceftriaxona na capacidade de reduzir a carga intracelular da bactéria em células endocervicais infetadas (72).

Estas descobertas fazem da salicilamida, do ácido tolfenâmico, do ácido flufenâmico e do ácido meclofenâmico candidatos promissores para futuras investigações como novas opções terapêuticas contra estirpes resistentes de *N. gonorrhoeae*.

1.10 Objetivos

1.10.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo principal utilizar uma estratégia de reposicionamento *in silico* para identificar fármacos já aprovados para o tratamento de outras doenças e que possam, também, ser adequados para uma nova aplicação contra *N. gonorrhoeae*. Este método consiste na identificação de alvos homólogos aos alvos de *N. gonorrhoeae* e que já possuam fármacos aprovados para uso em humanos. De acordo com o princípio de que alvos semelhantes possuem fármacos semelhantes, então os fármacos identificados poderão também ser eficazes contra *N. gonorrhoeae*.

Em particular, pretende-se identificar fármacos com potencial atividade antimicrobiana contra *N. gonorrhoeae* ou adjuvantes de antibióticos utilizados no tratamento da gonorreia, por inibição da atividade de efluxo ou outro mecanismo associado ao metabolismo energético, de forma a prevenir a emergência de resistência. A escolha destes alvos em *N. gonorrhoeae* está relacionada com o facto de o efluxo ser um dos principais mecanismos associados ao desenvolvimento de resistência aos antibióticos nesta bactéria.

Espera-se que a estratégia utilizada neste trabalho possa contribuir para o desenvolvimento de uma nova abordagem que permita aumentar a probabilidade de identificação de fármacos eficazes contra *N. gonorrhoeae*.

1.10.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho consistiram em:

- i. Criar uma biblioteca virtual de potenciais alvos terapêuticos e de fármacos já aprovados, potencialmente eficazes contra *N. gonorrhoeae*.
- ii. Determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos fármacos identificados pelo método *in silico* contra uma estirpe de referência e um painel de isolados clínicos de *N. gonorrhoeae*.
- iii. Avaliar o efeito dos fármacos selecionados pelo método de reposicionamento *in silico* sobre o valor de CMI de antibióticos utilizados no tratamento da gonorreia e identificar possíveis interações sinérgicas.
- iv. Avaliar o efeito dos fármacos identificados pelo método de reposicionamento *in silico* na atividade de efluxo de *N. gonorrhoeae* através de um método fluorométrico em tempo real.

2 Material e Métodos

2.1 Estratégia de reposicionamento *in silico* de fármacos

A estratégia de identificação *in silico* de fármacos utilizada neste trabalho consistiu numa abordagem de genómica comparativa que seleciona alvos com base na sua homologia com um alvo para o qual já existem fármacos aprovados (69) (73). Para tal, utilizou-se um conjunto de plataformas e bases de dados que permitiu seleccionar e reunir uma lista de genes que estão envolvidos no metabolismo energético e no transporte membranar em *N. gonorrhoeae*. As sequências das proteínas correspondentes foram utilizadas para interrogar bases de dados disponíveis publicamente na *web* que fornecem informações detalhadas sobre fármacos e os seus alvos. Esta análise permitiu encontrar proteínas homólogas noutros organismos, bem como os fármacos que lhes estão associados. Posteriormente, a lista de potenciais alvos e correspondentes fármacos foi sujeita a uma triagem seletiva que permitiu obter um conjunto final de fármacos candidatos, com elevada probabilidade de apresentar atividade contra *N. gonorrhoeae* e que foram avaliados experimentalmente *in vitro*. As secções seguintes descrevem detalhadamente cada um dos passos da análise bioinformática.

2.1.1 Compilação de genes envolvidos no metabolismo energético e transporte membranar

A lista de genes que codificam para transportadores de membrana e para proteínas envolvidas no metabolismo energético de *N. gonorrhoeae* foi elaborada com base na informação disponível nas bases de dados “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes” (KEGG) (74) e UniProt (75).

2.1.1.1 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)

Iniciou-se a pesquisa de genes de interesse (metabolismo energético e transportadores de membrana) na base de dados KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) que integra informações genómicas, químicas e funcionais sistémicas (74). Esta pesquisa foi realizada para as duas estirpes de *N. gonorrhoeae* cujos genomas se encontram disponíveis na base de dados: estirpe FA 1090 (originalmente recuperada de um paciente com infeção gonocócica disseminada) [GenBank: RefSeq NC_002946] e NCCP 11945 (isolada de um esfregaço vaginal de uma paciente coreana) [GenBank: RefSeq NC_011035]). A estratégia utilizada foi a seguinte:

i) Selecionou-se para cada estirpe a opção “KEGG Brite” (ou “Ontology”) que remeteu para várias categorias possíveis de explorar. O KEGG Brite compreende uma coleção de arquivos com

classificações hierárquicas sobre vários aspetos (agrupados em categorias), principalmente funcionais, de sistemas biológicos (74).

ii) Dentro das várias categorias do KEGG Brite selecionou-se “KEGG Orthology (KO)” e “Transporters”. Na categoria “KEGG Orthology” obteve-se um conjunto de novas categorias relacionadas com as várias funções desempenhadas por cada gene a nível celular. Dentro dessas categorias selecionou-se “Metabolism” e “Environmental Information Processing” e dentro destas, as subcategorias “Energy metabolism” e “Membrane transport” respetivamente. A categoria “Transporters” continha as várias classes de transportadores membranares presentes em *N. gonorrhoeae* e, portanto, todos os genes foram considerados de interesse.

iii) Para todos os genes selecionados, foi recolhido o ID, a função do gene e a sequência de aminoácidos da proteína que foram depois compilados numa base de dados criada em Excel.

2.1.1.2 Uniprot

Consultou-se a base de dados Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) para complementar a informação compilada na seção 2.1.1.1. Comparou-se a informação recolhida em ambas as bases de dados (KEGG e UniProt) com o intuito de encontrar mais genes envolvidos no metabolismo energético e transporte membranares que não tivessem sido detetados pela pesquisa na KEGG.

A base de dados UniProt é uma coleção de sequências de proteínas e respetivas anotações. Possui várias componentes importantes, entre as quais a seção UniProtKB/Swiss-Prot que foi utilizada neste trabalho e onde todas as entradas são selecionadas e revistas manualmente (com base na literatura) com o objetivo de fornecer a informação mais exata possível para cada proteína (75).

Aqui, pesquisou-se por *N. gonorrhoeae* e selecionou-se “Gene Ontology” onde os resultados estavam divididos em três categorias principais: “molecular_function”, “biological_process” e “cellular_component”. Na categoria “molecular_function” foi selecionada a subcategoria “transporter activity”. Na categoria “biological_process” selecionou-se a subcategoria “metabolic process” e aí, “ATP metabolic process”. Nesta categoria, foi também usada a subcategoria “cellular process” onde se selecionou “transmembrane transport” e “cellular metabolic process”. Nesta última, selecionou-se ainda “generation of precursor metabolites and energy” e “antibiotic metabolic process”.

Apesar da base de dados UniProt apresentar informação para um variado conjunto de estirpes de *N. gonorrhoeae*, apenas se recolheu informação correspondente às estirpes FA 1090 e NCCP11945 cujos genomas completos se encontram na KEGG (76) (77).

2.1.2 Criação de uma biblioteca virtual de fármacos aprovados, com potencial atividade contra *N. gonorrhoeae*

Cada uma das proteínas codificadas pelos genes identificados na seção 2.1.1, foi considerada como um potencial alvo e utilizada para interrogar duas bases de dados diferentes, disponíveis publicamente na *web*, que fornecem informações detalhadas sobre fármacos e os seus alvos. Estas bases de dados permitiram a identificação de proteínas homólogas às de *N. gonorrhoeae* e que apresentam fármacos aprovados para uso clínico em humanos. O princípio da “homologia de alvos” permite assumir que “alvos semelhantes” possuem “fármacos semelhantes” (69) (73).

2.1.2.1 DrugBank

Para encontrar proteínas homólogas às encontradas em *N. gonorrhoeae* utilizou-se a DrugBank que é uma base de dados abrangente que contém informações detalhadas sobre fármacos, alvos, ações e interações dos medicamentos aprovados pela FDA, bem como medicamentos experimentais em processo de aprovação (78). Nesta base de dados, no campo “target sequences”, foram introduzidas individualmente todas as sequências de aminoácidos (em formato FASTA) das proteínas identificadas na seção 2.1.1 e compiladas na base de dados Excel. Para os casos em que foram encontrados alvos homólogos, apenas as proteínas que apresentaram um E-value $\leq 10^{-20}$ foram selecionadas para estudos posteriores. O parâmetro E-value representa o número esperado de vezes que uma correspondência entre homólogos irá ocorrer aleatoriamente num determinado conjunto de tentativas, e, geralmente, quanto mais próximo de zero melhor será a qualidade dos resultados obtidos. Para estas proteínas, apenas foram selecionados os fármacos aprovados para uso humano e/ou veterinário. Todos os restantes, incluindo nutracêuticos e vitaminas, foram excluídos. Recolheu-se o nome do alvo homólogo, o(s) nome(s) do(s) fármaco(s) aprovado(s) associado(s) ao mesmo, a informação sobre a toxicidade e as indicações de cada fármaco e adicionou-se esta informação à base de dados Excel criada na seção 2.1.1 (69).

2.1.2.2 STITCH 5.0

STITCH 5.0 (<http://stitch.embl.de/>) é uma base de dados de interações químicas entre proteínas (79). Nesta base de dados, tal como na DrugBank, introduzem-se as sequências de aminoácidos das proteínas em estudo para tentar identificar alvos homólogos. No caso específico da STITCH 5.0 e ao contrário do que acontece na DrugBank, é possível selecionar os organismos onde se pretende procurar esses alvos. Uma vez que a lista desses organismos é extensa, a pesquisa foi

restrita a quatro organismos modelo: *N. gonorrhoeae* MS11, como modelo representativo de *N. gonorrhoeae*; o modelo eucariota *Saccharomyces cerevisiae*; o modelo procariota *Escherichia coli* estirpe K12 MG1655; e *Homo sapiens*. A escolha do modelo eucariota, procariota e humano foi feita tendo em conta que são das espécies mais estudadas, com maior probabilidade de originar resultados.

A estratégia de pesquisa para esta base de dados foi a seguinte: selecionou-se “Search” e em “Protein sequence” foram introduzidas individualmente todas as sequências de aminoácidos (em formato FASTA) das proteínas de *N. gonorrhoeae* identificadas na seção 2.1.1; em “Organism” selecionou-se o organismo onde se pretendia efetuar a pesquisa de alvos homólogos (*N. gonorrhoeae* MS11, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* K12 MG1655 ou *Homo sapiens*).

Ao contrário da DrugBank que usa o E-value, a STITCH utiliza um valor de confiança entre 0 e 1 (score). Este score corresponde a um conjunto de interações de alta confiança entre moléculas e alvos que é usado como referência para filtrar os resultados. Para os casos em que foram encontrados alvos homólogos, apenas fármacos com score ≥ 0.8 e aprovados para uso humano e/ou veterinário foram aceites (69) (80) .

2.1.3 Triagem seletiva dos fármacos identificados através da comparação de domínios funcionais conservados

A lista final de alvos homólogos e respetivos fármacos foi sujeita a uma primeira triagem que tem por base a comparação de domínios funcionais conservados. Para este efeito, realizou-se o alinhamento e a comparação dos aminoácidos conservados das regiões funcionais entre os alvos de *N. gonorrhoeae* e os respetivos alvos homólogos. Para o alinhamento das sequências, recorreu-se à NCBI Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) onde se inseriram as duas sequências de aminoácidos (do alvo de *N. gonorrhoeae* e do alvo homólogo correspondente) em formato FASTA que foram posteriormente alinhadas de forma automática (81). Para identificar os aminoácidos conservados, foi utilizada a “The ConSurf server” (<https://consurf.tau.ac.il/>). A ConSurf é uma ferramenta utilizada para revelar regiões funcionais em macromoléculas, analisando a dinâmica evolutiva de substituições de aminoácidos/ácidos nucleicos entre sequências homólogas (82). Assim, para cada sequência de cada alvo homólogo, o grau de conservação dos aminoácidos dentro do sítio ativo desse alvo é estimado usando 150 proteínas homólogas de outros organismos com sequências semelhantes na base de dados UNIREF-90 (69). Para a seleção destas 150 proteínas homólogas, de forma a evitar sequências redundantes, todas as que apresentaram uma semelhança $> 95\%$ com a sequência em estudo foram excluídas pela

ConSurf através do algoritmo CD-HIT. Foram também excluídas as sequências com similaridade < 35% que corresponde ao limite abaixo do qual se considerou que as sequências são pouco idênticas (82). O método de alinhamento utilizado para as sequências foi o MAFFT-L-INS-i. O “score” de conservação para cada posição específica foi calculado usando o método bayesiano (69) (82).

A estratégia de pesquisa para esta base de dados foi a seguinte: à primeira questão “Analyze nucleotides or amino acids?” respondeu-se “amino-acids”. De seguida, na pergunta “Is there a known protein structure?” respondeu-se “no”. Na questão seguinte “Do you have a Multiple Sequence Alignment (MSA) to upload?” respondeu-se “no”. Após estas questões é apresentada uma caixa para colocar a sequência da nossa proteína em formato FASTA. Nessa caixa é então inserida a sequência da proteína homóloga à de *N. gonorrhoeae*.

Seguidamente na secção “Choose parameters to homolog search algorithm” mantiveram-se os parâmetros pré-estabelecidos na ConSurf. Depois escolheu-se a opção “automatically” na seleção de homólogos para análise ConSurf. Na secção “Choose parameters to select the sequences for the analysis out of homolog search algorithm results” mantiveram-se os parâmetros pré-estabelecidos, tal como na secção seguinte “Choose alignment method to build the Multiple Sequence Alignment (MSA)”.

Por último, deu-se um nome ao trabalho e inseriu-se um email para onde foram enviados os resultados após a ConSurf concluir a análise.

No final da análise, obteve-se a identificação dos resíduos de aminoácidos conservados e expostos, assinalados na sequência em estudo (Figura 2.1). Verificou-se a presença destes resíduos na sequência da proteína alvo de *N. gonorrhoeae* através do alinhamento Blast das duas sequências (proteína alvo em *N. gonorrhoeae* e proteína alvo homóloga). As sequências que apresentaram uma semelhança igual ou superior a 60% foram selecionadas para estudos posteriores. Pelo contrário, as sequências com semelhança inferior a 60% foram excluídas do estudo (69) (83).



Figura 2.1. Exemplo de resultado da análise ConSurf das regiões funcionais da proteína subunidade B do protão tipo V ATPase, isoforma do cérebro, alvo aprovado (com fármaco aprovado), homólogo da proteína X de *N. gonorrhoeae*.

2.1.4 Construção da lista final de fármacos com potencial atividade contra *N. gonorrhoeae*

Para os fármacos associados às proteínas homólogas que apresentaram pelo menos 60% de semelhança com a correspondente proteína alvo em *N. gonorrhoeae*, realizou-se uma pesquisa bibliográfica, realizada entre setembro e dezembro de 2020, utilizando os motores de busca PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), PubMed Central (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Google Scholar (<https://scholar.google.com.tw/>) para avaliar quais dos fármacos identificados já haviam sido estudados em *N. gonorrhoeae*. Foram efetuadas as seguintes estratégias de pesquisa bibliográfica: ("nome do fármaco") e ("*Neisseria gonorrhoea*").

Considerou-se que a atividade de um determinado fármaco não foi avaliada em *N. gonorrhoeae*, quando não foram encontrados registos de publicação após a pesquisa bibliográfica (até dezembro de 2020), ou quando o estudo identificado não revelou informação suficiente que permitisse concluir acerca do uso potencial do composto contra este microrganismo.

Construiu-se uma lista final de fármacos com potencial atividade contra *N. gonorrhoeae* com base nos seguintes critérios de seleção:

- **Fármacos não testados.** Preferencialmente, selecionaram-se compostos cuja atividade nunca foi avaliada contra *N. gonorrhoeae*. No entanto, optou-se por incluir também alguns fármacos já estudados para efeitos de validação do método;
- **Capacidade técnica de avaliação em laboratório.** Por exemplo, alguns anestésicos na forma gasosa, como o desflurano e isoflurano, seriam difíceis de testar e, portanto, foram excluídos;
- **Toxicidade.** Os fármacos que apresentam efeitos secundários severos ou elevada toxicidade foram excluídos. Esta informação foi recolhida na base de dados DrugBank;
- **Representatividade.** Os fármacos foram divididos em grupos consoante o seu modo de ação ou indicação clínica e procurou-se selecionar pelo menos um fármaco de cada grupo;
- **Disponibilidade no laboratório.** Dos fármacos que se enquadravam nos critérios anteriores, deu-se prioridade a fármacos que já estivessem disponíveis no laboratório;
- **Facilidade de aquisição.** Dos fármacos que foi necessário adquirir, desde que cumprissem os quatro primeiros critérios, a escolha era feita consoante a melhor relação disponibilidade/preço.

No final desta seleção, obteve-se uma lista final de fármacos com atividade preditiva contra *N. gonorrhoeae* que foram sujeitos a validação *in vitro* na fase laboratorial deste trabalho.

2.2 Estratégias experimentais *in vitro*

Após a análise *in silico*, os fármacos selecionados na secção 2.1.4 foram testados em laboratório para a sua capacidade de inibição do crescimento de *N. gonorrhoeae in vitro*. Os diferentes métodos utilizados na análise laboratorial encontram-se descritos nas secções seguintes.

2.2.1 Crescimento e manutenção das estirpes de *N. gonorrhoeae*

Neste trabalho, foram utilizados uma estirpe de referência e dez isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* com diferentes perfis de suscetibilidade aos antibióticos (Tabela 2.1). Estas estirpes fazem parte da coleção do Laboratório de IST do IHMT-NOVA e a sua manipulação foi efetuada de acordo com as regras de biossegurança recomendadas para agentes patogénicos de nível 2.

Todas as estirpes foram mantidas numa arca congeladora a -80 °C para sua conservação. Para crescimento das estirpes, estas foram descongeladas à temperatura ambiente e, posteriormente, inoculadas com uma ansa em placas de Agar Chocolate PolyVitex (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, França) no interior de uma câmara de segurança biológica de classe 2. As placas foram incubadas a 37 °C, na presença de aproximadamente 5% CO₂ durante 24 horas (tempo necessário para o seu crescimento).

Tabela 2.1. Estirpe de referência e isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* utilizados neste trabalho.

Estirpe / Isolado ¹	Descrição	Fenótipo ³
ATCC 49226²	Estirpe de referência	Suscetível
10042	Isolado clínico	Suscetível
10214	Isolado clínico	Suscetível
10314	Isolado clínico	PEN ^I ; CFM ^R ; TET ^I
10959	Isolado clínico	PEN ^R ; CFM ^R ; TET ^I ; CIP ^R
11530	Isolado clínico	PEN ^I ; TET ^R
11658	Isolado clínico	TET ^R
11693	Isolado clínico	PEN ^I
12245	Isolado clínico	PEN ^I ; CFM ^R ; CRO ^R ; TET ^R ; SH ^R ; AZN ^R ; CIP ^R
12248	Isolado clínico	PEN ^R ; CIP ^I
12316	Isolado clínico	PEN ^R ; CFM ^R ; CRO ^R ; TET ^R ; AZN ^R ; CIP ^R

¹Coleção do laboratório de IST do IHMT-NOVA. ²Estirpe designada pelo CLSI como controlo de qualidade em testes de suscetibilidade aos antibióticos. ³Determinado no laboratório de IST do IHMT-NOVA pelo método de Etest, de acordo com as recomendações da EUCAST (84) (85). Azn, azitromicina; Cfm, cefixima; Cip, ciprofloxacina; Cro, ceftriaxona; I, suscetível, exposição aumentada; Pen, penicilina; Sh, espectinomicina; Tet, tetraciclina; R, resistente.

2.2.2 Meios de cultura

A composição dos meios de cultura utilizados para o crescimento de *N. gonorrhoeae* encontra-se descrita na Tabela 2.2. O meio de cultura GC agar (Gonococcal (GC) medium base, BD DifcoTM)

foi preparado de acordo com as instruções do fabricante, com adição do suplemento IsoVitaleXTM (BD BBLTM) a uma concentração final de 1% (v/v). O meio de cultura Agar chocolate PolyVitek (bioMérieux) foi adquirido comercialmente.

Tabela 2.2. Composição dos meios de cultura e suplemento utilizados para crescimento de *N. gonorrhoeae* neste trabalho.

Meio/suplemento	Composição/ L de dH ₂ O
Meio GC agar¹	Proteose peptona 15 g; Fosfato dipotássico 4g; Cloreto de sódio 5 g; Amido de milho 1 g; Fosfato monopotássico 5 g; Agar 10 g.
Meio GC líquido	Proteose peptona 7,5 g; Fosfato dipotássico 2 g; Fosfato de potássio 0,5 g; Cloreto de sódio 2,5 g; Amido de batata solúvel 0,5 g.
Agar Chocolate PolyVitek²	Peptona de caseína (bovino) 7,5 g; Peptona de carne (bovino ou porcino) 7,5 g; Amido de milho 1 g; Fosfato dipotássico 4 g; Cloreto de sódio 5 g; Hemoglobina (bovino) 10 g; Agar 10 g; PolyViteX 10 mL.
PBS³	Tampão fosfato 0,05 M; Cloreto de potássio 0,0135 M; Sódio 0,685 M.
Suplemento IsoVitaleX⁴	Vitamina B12 0,01 g; L-glutamina 10 g; Adenina 1 g; Guanina • HCl 0,03 g; Ácido p-aminobenzóico 0,013 g; Nicotinamida adenina dinucleótido 0,25 g; Tiamina pirofosfato 0,1 g; Nitrato férrico 0,02 g; Tiamina • HCl 0,03 g; L-Cisteína • HCl 25,9 g; L-Cisteína 1,1 g; Dextrose 100 g.

¹BD Difco (Franklin Lakes, NJ, EUA); ²bioMérieux (Marcy-l'Étoile, França); ³Merck (Darmstadt, Alemanha); ⁴BD BBLTM (Franklin Lakes, NJ, EUA); PBS, Phosphate buffered saline.

2.2.3 Fármacos e Antibióticos

A composição e o modo de preparação dos antibióticos, fármacos identificados pelo método de reposicionamento *in silico* e brometo de etídio (EtBr), encontra-se descrita na Tabela 2.3.

Tabela 2.3. Preparação das soluções “stock” de antibióticos, fármacos identificados pelo método de reposicionamento *in silico* e EtBr utilizados neste trabalho.

Composto^{1, 2}	Peso Molecular (g/mol)	Concentração da solução “stock”
Aceto	222,245	20 mg/mL em ddH ₂ O
Aml	408,879 g/mol	10 mg/mL em ddH ₂ O
Atv	366,837	1 mg/mL em DMSO
Azn	748,920	50 mg/mL em DMSO
Benz	431,940	5 mg/mL em DMSO
Cfm	453,452	20 mg/mL em DMSO
Cip	331,346	10 mg/mL em ddH ₂ O + NaOH
Clo	351,310	10 mg/mL em ddH ₂ O
Cpz	318,860 g/mol	10 mg/mL em ddH ₂ O
Cro	554,580	10 mg/mL em DMSO
Deq	527,600	1 mg/mL em ddH ₂ O
Dox	543,520	15 mg/mL em ddH ₂ O
EtBr	394,294	10 mg/mL em ddH ₂ O
Gtm	477,596	10 mg/mL em ddH ₂ O + NaOH
Km	484,499 g/mol	10 mg/mL em ddH ₂ O
Met	129,164	6,7 mg/mL em ddH ₂ O
Ofl	361,368	20 mg/mL em ácido acético glacial
Pen	334,4	10 mg/mL em DMSO
Sh	332,350	10 mg/mL em ddH ₂ O
Sul	341,427	10 mg/mL em ddH ₂ O
Tbz	201,249	10 mg/mL de DMSO
Tet	444,435	10 mg/mL em DMSO
Top	339,363	10 mg/mL em ddH ₂ O
Tz	370,570	10 mg/mL em ddH ₂ O
Vp	454,602	10 mg/mL em ddH ₂ O

¹Merck (Darmstadt, Alemanha); ²armazenamento a -20 °C, Ofl, ofloxacina; Azn, azitromicina; Km, canamicina; Pen, penicilina; Gtm, gentamicina; Tet, tetraciclina; Cip, ciprofloxacina; Cfm, cefixima; Cro, ceftriaxona; Sh, espectinomicina; Dox, doxorubicina; Aceto, acetazolamida; Tbz, tiabendazol; Atv, atovaquone; Deq, dequalinio; benz, Benzotiazida; Aml, amlodipina; Top, topiramato; Sul, sulpirida; Clo, clomipramina; Met, metformina; Cpz, clorpromazina; Vp, verapamil; Tz, tioridazina; EtBr, brometo de etídio; DMSO, dimetilsulfóxido; ddH₂O, água bidestilada; NaOH, hidróxido de sódio.

2.2.4 Determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMIs) dos fármacos selecionados pelo método de reposicionamento *in silico*

A CMI de cada um dos fármacos selecionados na análise *in silico* foi determinada pelo método de microdiluição em microplacas de 96 poços, adaptado do protocolo descrito por Foerster e colaboradores (86).

Além dos fármacos selecionados na análise *in silico* foram também incluídos o verapamil, a tioridazina e a clorpromazina que, apesar de não terem sido selecionados na análise da base de dados DrugBank por estarem associados a alvos com E-value $>10^{-20}$, foram incluídos neste estudo por serem compostos previamente utilizados como inibidores de efluxo em outras bactérias, tais como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium tuberculosis* (83) (87) (88). Adicionalmente, devido aos ensaios de fluorimetria em tempo real que se viriam a realizar, determinou-se também a CMI para o brometo de etídio na estirpe *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 e nos isolados clínicos 10214 e 12245.

Assim, distribuíram-se 0,01 mL de água bidestilada por todos os poços da placa de 96 poços, exceto na primeira coluna. De seguida, adicionou-se uma alíquota de 0,02 mL de uma solução de fármaco ao primeiro poço e efetuaram-se diluições seriadas 1:2, transferindo 0,01 mL para o poço seguinte, repetindo-se o processo sucessivamente até à coluna 12, descartando-se o últimos 0,01 mL da última diluição de fármaco. A gama de concentrações testadas para cada fármaco foi: entre 256 e 0,5 µg/mL para doxorubicina, acetazolamida, tiabendazol, benztiázida, amlodipina, topiramato, sulpirida, clomipramina, verapamil, tioridazina, clorpromazina e brometo de etídio; entre 64 e 0,125 µg/mL para atovaquone e dequalínio; e entre 512 e 1 µg/mL para metformina. De seguida, preparou-se uma suspensão bacteriana a uma densidade ótica correspondente a 1 da escala McFarland Standard (DO₆₀₀ de 0,26) e que foi posteriormente diluída 1/15 em meio líquido GC base com 1% (v/v) de suplemento IsoVitaleX. Por fim, adicionou-se 0,09 mL desta suspensão a cada poço contendo os 0,01 mL de cada diluição de fármaco, obtendo-se um volume final de 0,1 mL. Incluíram-se também 3 poços para o controlo positivo (bactérias em meio de cultura sem fármaco) e 3 poços para o controlo negativo (meio de cultura sem suspensão bacteriana) de forma a assegurar a viabilidade das bactérias e a esterilidade do meio de cultura, respetivamente.

Após 24 h de incubação a 37°C em atmosfera com aproximadamente 5% de CO₂, adicionou-se 0,03 mL de resazurina a todos os poços (86). Na presença de células metabolicamente ativas, este composto é convertido na sua forma reduzida (resorufina) com alteração de cor de azul para cor-de-rosa. Ao fim de cerca de uma hora de incubação a 37°C, verificou-se uma mudança de cor de azul para rosa nos poços onde ocorreu crescimento de *N. gonorrhoeae* e a manutenção da cor azul nos poços sem crescimento (Figura 2.2). Considerou-se como CMI a concentração menor de

fármaco capaz de inibir o crescimento de *N. gonorrhoeae*. Estes ensaios foram realizados para a estirpe ATCC 49226 e para os dez isolados clínicos utilizados neste trabalho, em triplicado, utilizando culturas de *N. gonorrhoeae* independentes em dias distintos, de forma a confirmar os resultados obtidos.

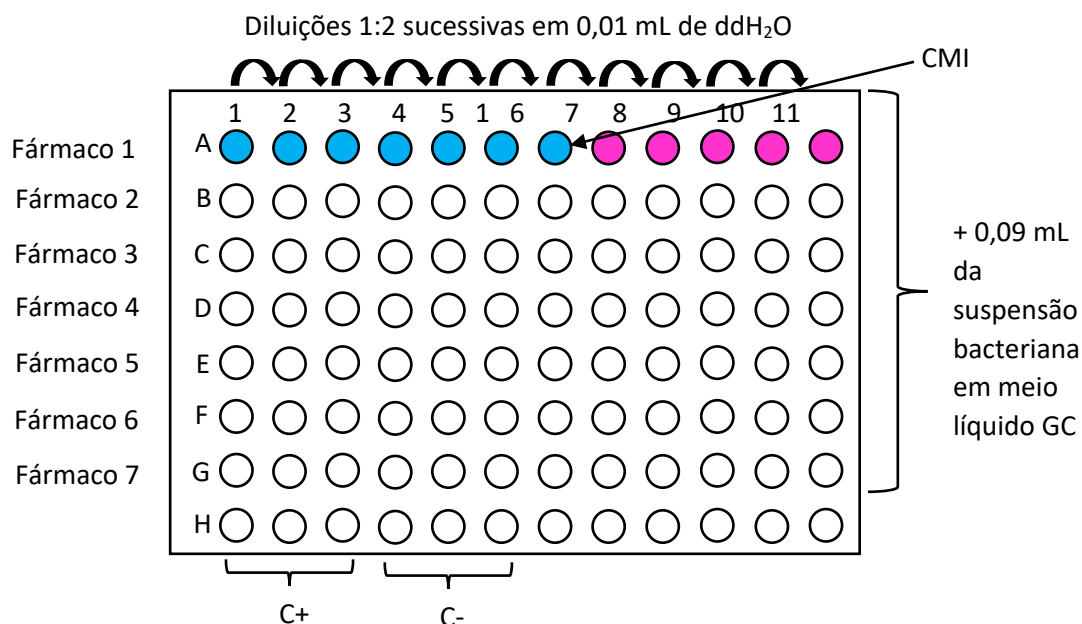


Figura 2.2. Representação esquemática de uma microplaca de 96 poços para determinação de CMIs. Poços a azul, ausência de crescimento bacteriano. Poços cor-de-rosa, presença de crescimento bacteriano; CMI, Concentração mínima inibitória; C+, Controlo positivo; C-, Controlo negativo. ddH₂O, água bidestilada.

2.2.5 Determinação da CMI de antibióticos na presença de fármacos selecionados pelo método de reposicionamento *in silico*

Após a determinação da CMI dos fármacos em estudo, avaliou-se o efeito destes sobre o valor de CMI de antibióticos de interesse, nomeadamente os de referência para o tratamento da gonorreia, como a ceftriaxona, cefixima e a azitromicina. O objetivo deste ensaio foi avaliar se algum dos fármacos tem a capacidade de reduzir significativamente a CMI dos antibióticos. Também se avaliou este efeito para a CMI do brometo de etídio para a estirpe ATCC 49226 e os isolados clínicos 10214 (mutação no regulador da bomba MtrCDE) e 12245 (extensivamente resistente).

Deste modo, distribuíram-se 0,01 mL de água bidestilada por todos os poços da placa de 96 poços, exceto na primeira coluna. Depois, adicionou-se uma alíquota de 0,02 mL de uma solução de

antibiótico ou de brometo de etídio ao primeiro poço e efetuaram-se diluições seriadas 1:2, transferindo 0,01 mL para o poço seguinte, repetindo-se o processo sucessivamente até à coluna 12, descartando-se o últimos 0,01 mL da última diluição de fármaco. A gama de concentrações testadas foi: entre 0,064 e 0,0005 µg/mL para ceftriaxona e ciprofloxacina; entre 8 e 0,0625 µg/mL para penicilina, canamicina, gentamicina, azitromicina e tetraciclina, concentração entre 0,24 e 0,001875 µg/mL para cefixima; e entre 0,128 e 0,001 µg/mL para ofloxacina; concentração entre 256 e 2 µg/mL para espectinomicina e brometo de etídio. Depois, prepararam-se soluções de cada fármaco a $\frac{1}{4}$ da CMI determinada na secção anterior e adicionou-se 0,005 mL dessas soluções aos poços contendo as diferentes concentrações de antibiótico. A uma das colunas da placa de 96 poços não se adicionou fármaco de modo a comparar CMI do antibiótico ou do brometo de etídio com a CMI resultante da ação do fármaco. De seguida, preparou-se uma suspensão bacteriana correspondente a 1 da escala McFarland Standard (DO₆₀₀ de 0,26) que foi posteriormente diluída 1/15 em meio líquido GC base com 1% (v/v) de suplemento IsoVitaleX. Por fim, adicionou-se 85 µl desta suspensão a cada poço contendo os 0,01 mL de cada diluição de antibiótico ou brometo de etídio e os 0,005 mL de cada fármaco a $\frac{1}{4}$ da CMI, obtendo-se um volume final de 0,1 mL.

Incluíram-se também os seguintes controlos: controlo positivo apenas com a suspensão bacteriana em meio líquido GC com 1% (v/v) de IsoVitaleX; controlo negativo apenas com o meio de cultura; e um controlo com a suspensão bacteriana na presença de fármaco, de modo a assegurar a viabilidade bacteriana na presença dos fármacos a $\frac{1}{4}$ da CMI e que, o efeito na CMI do antibiótico só poderá eventualmente ocorrer pelo efeito combinatório do fármaco com o antibiótico (Figura 2.3).

Após 24 h de incubação a 37°C em atmosfera com aproximadamente 5% de CO₂, adicionou-se 0,03 mL de resazurina. Após cerca de uma hora de incubação a 37°C, verificou-se uma mudança de cor de azul para rosa nos poços onde ocorreu crescimento de *N. gonorrhoeae* e a manutenção da cor azul nos poços sem crescimento. Considerou-se um efeito significativo do fármaco, quando ocorreu uma redução igual ou superior a 4× o valor de CMI (pelo menos duas diluições) dos antibióticos ou do brometo de etídio.

Neste ensaio, apenas se testou a totalidade dos fármacos identificados *in silico* para a estirpe ATCC 49226. Nos isolados clínicos, apenas se avaliou o efeito dos fármacos que já haviam demonstrado efeito na diminuição da CMI de antibióticos na estirpe ATCC 49226.

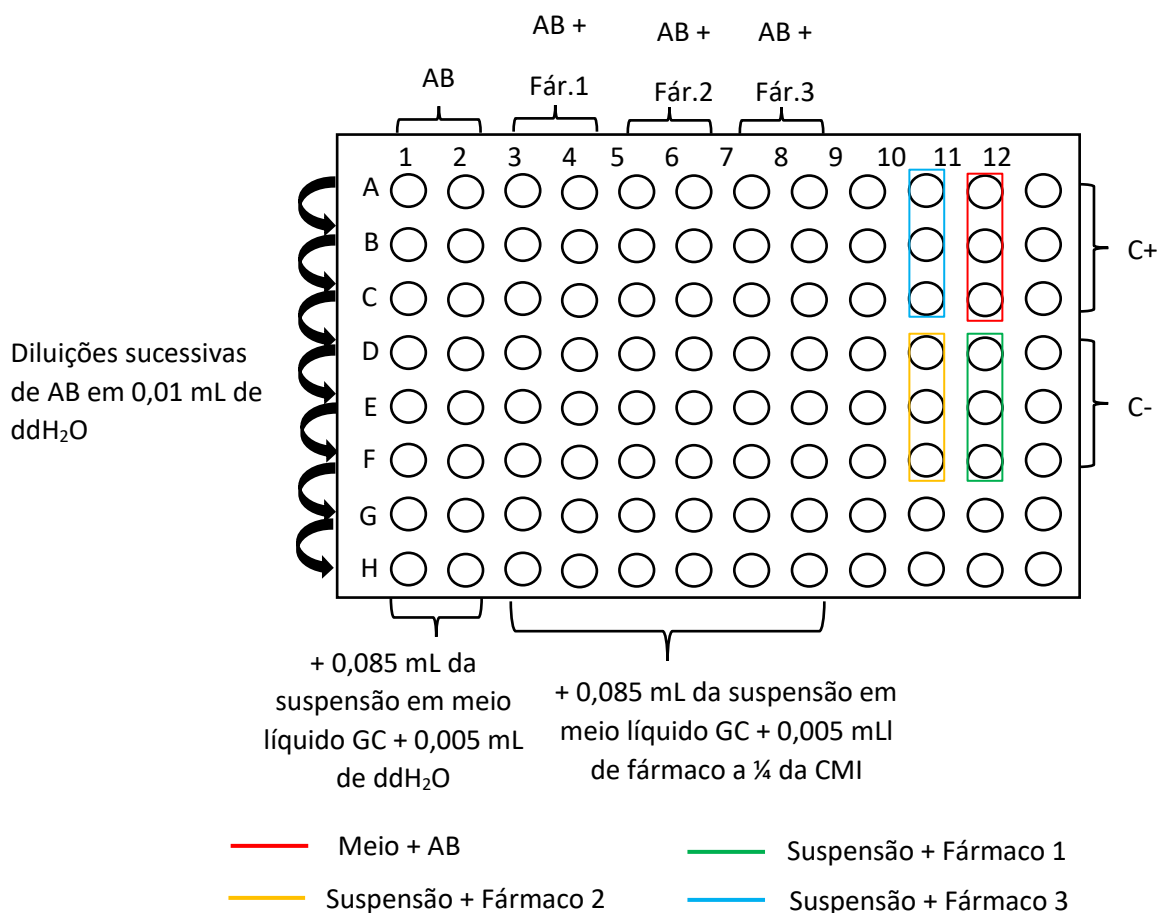


Figura 2.3. Representação esquemática de uma microplaca de 96 poços para determinação do efeito dos fármacos em estudo na CMI de antibióticos. AB, Antibiótico; C+, Controlo positivo; C-, Controlo negativo; CMI, Concentração mínima inibitória; Fár. Fármaco. ddH₂O, água bidestilada.

2.2.6 Ensaios de sinergismo pelo método de “Checkerboard”

Após a determinação da CMI dos antibióticos na presença dos fármacos identificados pelo método *in silico*, foram efetuados ensaios de sinergismo pelo método de “Checkerboard”, na estirpe ATCC 49226, para determinar se nos casos em que se observou uma redução de pelos menos duas diluições da CMI do antibiótico na presença do fármaco, existia efetivamente uma interação de sinergismo entre ambos.

Assim, adicionou-se uma alíquota de 0,02 mL de uma solução de antibiótico e efetuaram-se diluições seriadas 1:2 em 0,01 mL de água bidestilada ao longo dos poços seguintes. A gama de concentrações testada foi: entre 4 e 0,0625 µg/mL para gentamicina; entre 1 e 0,0156 µg/mL para penicilina, tetraciclina e azitromicina; e entre 16 e 0,25 µg/mL para canamicina). Depois, prepararam-se sete diluições 1:2 de cada fármaco antes da adição aos poços. Foram adicionados

0,005 mL de cada uma destas sete diluições (da mais baixa para a mais alta) a cada coluna da placa de 96 poços, exceto a coluna 1 que continha apenas 0,01 mL de diluições de antibiótico e a linha H que continha apenas 0,005 mL de cada uma das diluições do fármaco (concentrações entre 32 e 0,5 µg/mL para doxorubicina e atovaquone; entre 128 e 2 µg/mL para amlodipina; entre 512 e 8 µg/mL para sulpirida; e entre 1024 e 16 µg/mL para acetazolamida).

De seguida, preparou-se uma suspensão bacteriana correspondente a 1 da escala McFarland Standard (DO₆₀₀ de 0,26) que foi posteriormente diluída 1/15 em meio líquido GC base com 1% (v/v) de suplemento IsoVitaleX. Por fim, adicionou-se 0,085 mL desta suspensão a cada poço contendo os 0,01 mL de cada diluição de antibiótico e os 0,005 mL de cada diluição do fármaco, 0,09 mL aos primeiros sete poços da linha 1 que continha apenas antibiótico e 0,095 mL aos poços 2 a 8 da linha H que continha apenas fármaco.

Incluíram-se também os seguintes controlos: controlo positivo apenas com a suspensão bacteriana e controlo negativo apenas com o meio de cultura (Figura 2.4).

Após 24 h de crescimento a 37°C numa atmosfera com aproximadamente 5% de CO₂, adicionou-se 0,03 mL de resazurina. Após cerca de uma hora de incubação a 37°C, verificou-se uma mudança de cor de azul para rosa nos poços onde ocorreu crescimento de *N. gonorrhoeae* e a manutenção da cor azul nos poços sem crescimento. Determinou-se a CMI como a menor concentração de agente antimicrobiano para a qual não se observou crescimento de *N. gonorrhoeae*.

Para avaliar o tipo de interação entre o antibiótico e o fármaco, utilizou-se o cálculo do índice de concentração inibitória fracionária (FICI, do inglês “Fractional Inhibitory Concentration Index”):

$$FICA = \frac{CMI(A \text{ na presença de } B)}{CMI(A)}$$

$$FICB = \frac{CMI(B \text{ na presença de } A)}{CMI(B)}$$

$$FICI = FICA + FICB$$

Se o valor de FICI for ≤0,5 considera-se sinergismo, se for >4 trata-se de antagonismo e se estiver entre >0,5 e <4,0 correspondem a ausência de interação entre fármaco e antibiótico (89).

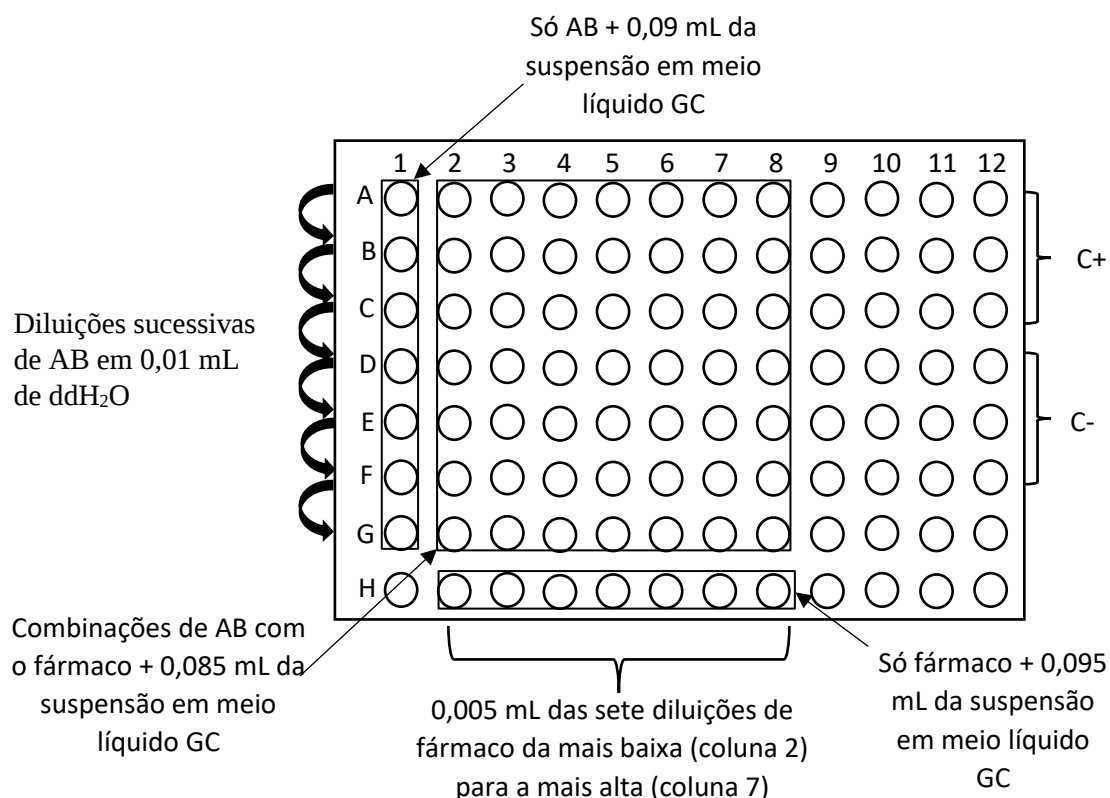


Figura 2.4. Representação esquemática de uma microplaca de 96 poços para ensaios de sinergismo pelo método de “Checkerboard”. AB, antibiótico; C+, Controlo positivo; C-, Controlo negativo. ddH₂O, água bidestilada.

2.2.7 Determinação da atividade de efluxo por fluorimetria em tempo real

A avaliação do efeito dos fármacos selecionados pelo método *in silico* sobre a atividade de efluxo de *N. gonorrhoeae* foi efetuada através de ensaios de fluorimetria em tempo real (90). Este método utiliza o brometo de etídio como marcador para o estudo da atividade de efluxo em bactérias, pois é um substrato comum de bombas de efluxo que emite fluorescência fraca em soluções aquosas (meio extracelular), tornando-se fluorescente no interior da célula bacteriana (90) (91). Estas características permitem avaliar a capacidade das células em acumular maior ou menor quantidade de brometo de etídio na presença e ausência de compostos inibidores de efluxo.

Neste trabalho, realizou-se uma modificação ao método descrito por Viveiros *et al.* (90), em que o aparelho utilizado para detetar a fluorescência emitida pelo brometo de etídio não foi o

termociclador em tempo real Rotor-Gene™ 3000, mas sim o fluorímetro de placas de 96 poços Safire 2 (Tecan, Männedorf, Suíça).

Neste estudo, foram realizados dois tipos de ensaios fluorométricos para a estirpe *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 e dois isolados clínicos 10214 (fenótipo de efluxo aumentado por mutação no gene *mtrR*) (84) e 12245 (isolado clínico XDR):

- Ensaio de acumulação com concentrações crescentes de brometo de etídio, para determinar a concentração de equilíbrio (influxo = efluxo) a utilizar nos ensaios com fármacos;
- Ensaio de acumulação de brometo de etídio na presença de fármacos selecionados pelo método *in silico*, para avaliar o seu efeito na acumulação deste composto em *N. gonorrhoeae*.

2.2.7.1 Ensaios de acumulação de brometo de etídio

Este ensaio teve como objetivo definir a concentração equilíbrio (influxo = efluxo) de brometo de etídio que deve ser usada nos ensaios de acumulação com os fármacos selecionados pelo método de reposicionamento *in silico*.

Para tal, definiu-se uma gama de concentrações a testar (8 a 0,06 µg/mL na estirpe de referência e 16 a 0,125 µg/mL nos isolados clínicos) e adicionou-se uma alíquota de 0,02 mL de uma solução de brometo de etídio ao primeiro poço, seguido de diluições seriadas 1:2 em 0,01 mL de água bidestilada ao longo dos poços seguintes. De seguida, preparou-se uma suspensão bacteriana em PBS correspondente a uma DO₆₀₀ de 0,4 (de forma a ter um inoculo carregado) e adicionou-se 0,09 mL da mesma a cada poço. Como controlos, incluíram-se duas colunas com as diluições de brometo de etídio às quais se adicionou 0,09 mL de PBS (sem bactérias) (Figura 2.5).

A placa foi de seguida colocada no fluorímetro Safire 2 e a fluorescência do brometo de etídio (excitação a 530 nm, emissão a 585 nm) medida a cada 60 s durante 60 min a 37°C. Os resultados foram representados sob a forma de gráfico com os valores de fluorescência obtidos em função do tempo para se selecionar a concentração de equilíbrio a usar nos ensaios de acumulação de brometo de etídio com fármacos.

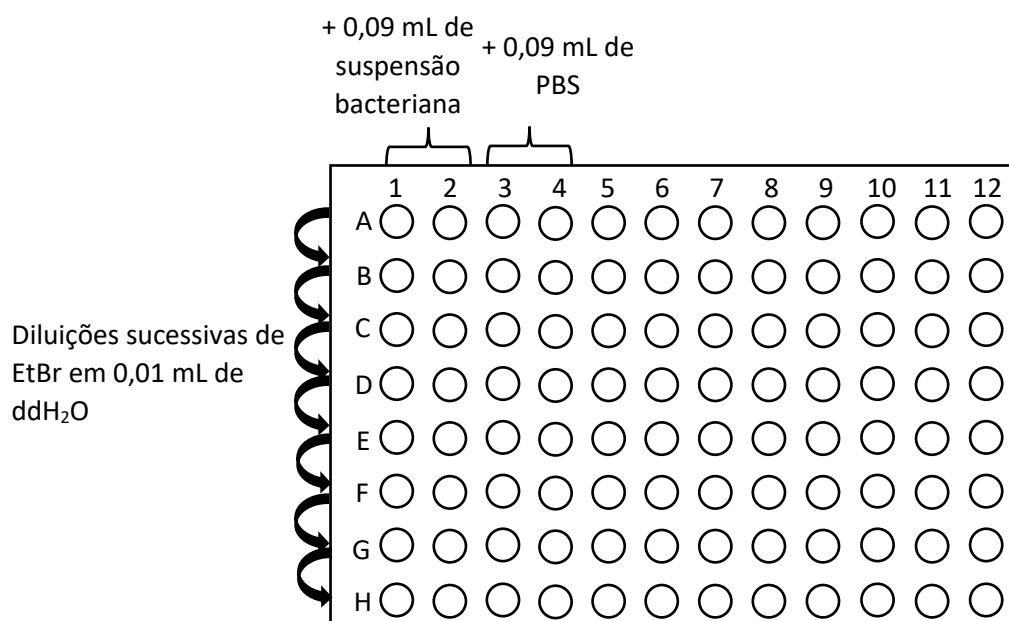


Figura 2.5. Representação esquemática de uma microplaca de 96 poços para ensaios de acumulação com concentrações crescentes de brometo de etídio. EtBr, brometo de etídio; PBS, “phosphate-buffered saline”. ddH₂O, água bidestilada.

2.2.7.2 Ensaios de acumulação de brometo de etídio na presença de fármacos selecionados pelo método de reposicionamento *in silico*

Este ensaio permite avaliar se os fármacos selecionados pela estratégia de reposicionamento *in silico* promovem a acumulação de brometo de etídio, possivelmente através da inibição da atividade de efluxo, em *N. gonorrhoeae*. Para tal, preparou-se uma placa de 96 poços em que todos os poços continham 0,01 mL de brometo de etídio a 1 µg/mL para a estirpe ATCC 49226 e 2 µg/mL para os isolados clínicos (concentração de equilíbrio determinada de acordo com o método descrito em 2.2.7.1) e 0,005 mL do fármaco a testar a ¼ da sua CMI para a respetiva estirpe de *N. gonorrhoeae*. Por último, adicionou-se 0,085 mL da suspensão bacteriana correspondente, preparada em PBS para uma DO₆₀₀ de 0,4. Foram também incluídos controlos apenas com uma solução de PBS com brometo de etídio e fármaco (Figura 2.6). Cada condição a testar foi efetuada em duplicado.

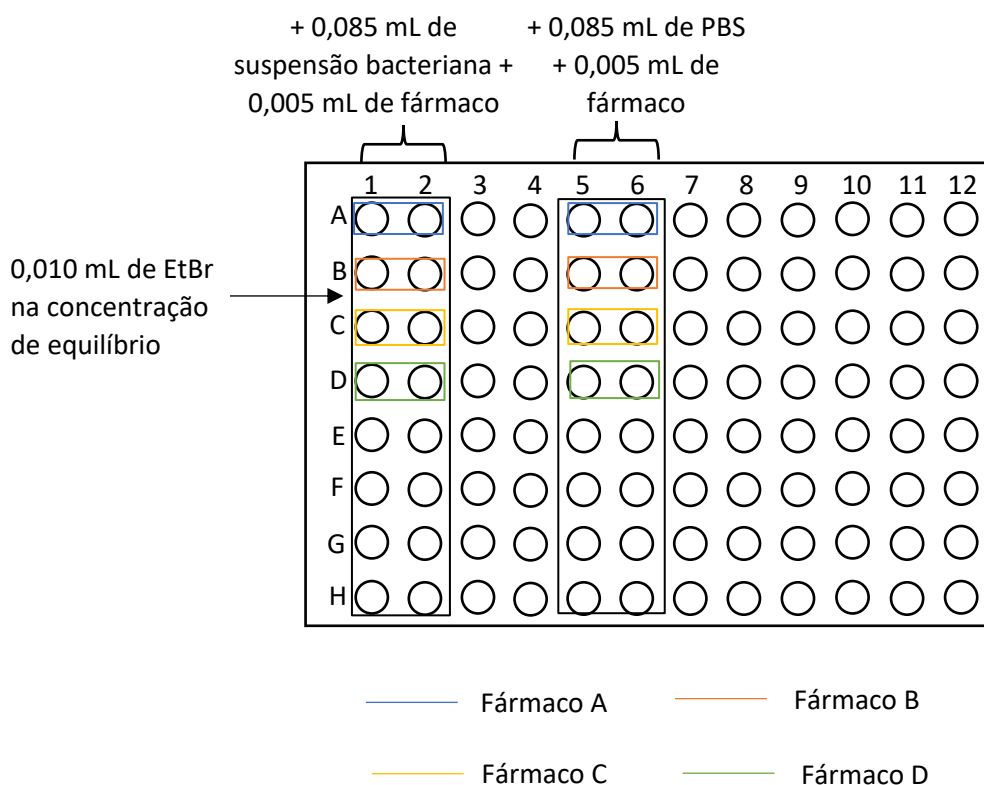


Figura 2.6. Representação esquemática de uma microplaca de 96 poços para ensaios de acumulação de brometo de etídio na presença de fármacos. PBS, “Phosphate-buffered saline”; EtBr, Brometo de etídio.

A placa foi de seguida colocada no fluorímetro Safire 2 e a fluorescência do brometo de etídio (excitação a 530 nm, emissão a 585 nm) medida a cada 60 s, durante 30 min a 37°C. Os resultados foram representados sob a forma de gráfico com os valores de fluorescência obtidos em função do tempo.

A partir dos valores finais de fluorescência obtidos, determinou-se o valor de Fluorescência Final Relativa (RFF, do inglês “Relative Final Fluorescence”), que permite quantificar o efeito de cada fármaco na acumulação de brometo de etídio. O valor de RFF foi determinado de acordo com a fórmula seguinte (92):

$$RFF_{\text{Fármaco}} = \frac{F30 (\text{EtBr} + \text{Fármaco}) - F30 (\text{EtBr})}{F30 (\text{EtBr})} \quad F30, \text{ fluorescência após 30 minutos}$$

De acordo com o definido por Costa *et al.* (92), fármacos cujo valor de RFF seja ≥ 1 possuem atividade de inibição de efluxo e fármacos com $RFF < 1$ não possuem essa atividade inibitória.

3 Resultados

Neste trabalho conseguimos identificar diferentes alvos em *N. gonorrhoeae*, associados ao metabolismo energético e ao transporte membranar, que possuíam alvos homólogos, noutros organismos, com fármacos associados. No final da análise *in silico*, selecionou-se um grupo de fármacos para testagem *in vitro* contra várias estirpes de *N. gonorrhoeae*. Nas secções seguintes, serão descritos os resultados obtidos da estratégia de reposicionamento *in silico* e, também, da validação laboratorial da atividade dos fármacos selecionados contra *N. gonorrhoeae*.

3.1 Reposicionamento *in silico* de fármacos

Para encontrar os potenciais alvos em *N. gonorrhoeae* e correspondentes alvos homólogos noutros organismos, bem como os fármacos que lhes estão associados, recorreu-se a uma abordagem *in silico* cuja metodologia e resultados se encontram resumidos na Figura 3.1.

3.1.1 Compilação de proteínas envolvidas no metabolismo energético e transporte membranar

A compilação da lista de proteínas foi feita recorrendo às bases de dados KEGG e UniProt onde foram recolhidas um total de 626 proteínas, das quais 293 pertencem à estirpe *N. gonorrhoeae* FA 1090 e 333 pertencem à estirpe *N. gonorrhoeae* NCCP 11945. Destas 626 proteínas, 352 (56,2%) são referentes ao metabolismo energético e 274 (43,8%) ao transporte membranar. A pesquisa foi realizada para estas duas estirpes de *N. gonorrhoeae*, pois correspondem aos genomas de *N. gonorrhoeae* que se encontram disponíveis na base de dados KEGG. Constatou-se que a homologia entre as duas estirpes é bastante elevada (95,2%) (76) e, deste modo, é importante realçar que 170 das proteínas encontradas são comuns a ambas as estirpes.

Destas 626 proteínas, 404 (64,5%) resultaram da pesquisa na base de dados KEGG, enquanto que 222 (35,5%) resultaram da base de dados UniProt.

A lista de proteínas encontra-se disponível na Tabela S1 no seguinte [link](#).

3.1.2 Criação de uma biblioteca virtual de fármacos aprovados, com potencial atividade contra *N. gonorrhoeae*

Seguiu-se a identificação dos alvos homólogos e respetivos fármacos que foi efetuada recorrendo às bases de dados DrugBank e STITCH 5.0. Na DrugBank selecionou-se um E-value $\leq 10^{-20}$ e

no STITCH um “score” ≥ 0.8 , parâmetros que permitem obter um maior grau de confiança nos resultados, tal como descrito em estudos anteriores (69) (73) (83). A utilização de duas bases de dados independentes permitiu aumentar o número de alvos homólogos identificados uma vez que cada plataforma utiliza um algoritmo de pesquisa distinto (69). No final desta análise, um total de 100 alvos preditivos em *N. gonorrhoeae* dos 626 previamente identificados apresentavam 313 alvos homólogos (116 na estirpe FA 1090 e 147 na estirpe NCCP 11945) associados a um total de 681 fármacos aprovados (Tabela S2 [link](#)). Destes 313 alvos homólogos, 195 (62,3%) foram retirados da DrugBank e 118 (37,7%) foram retirados da STITCH.

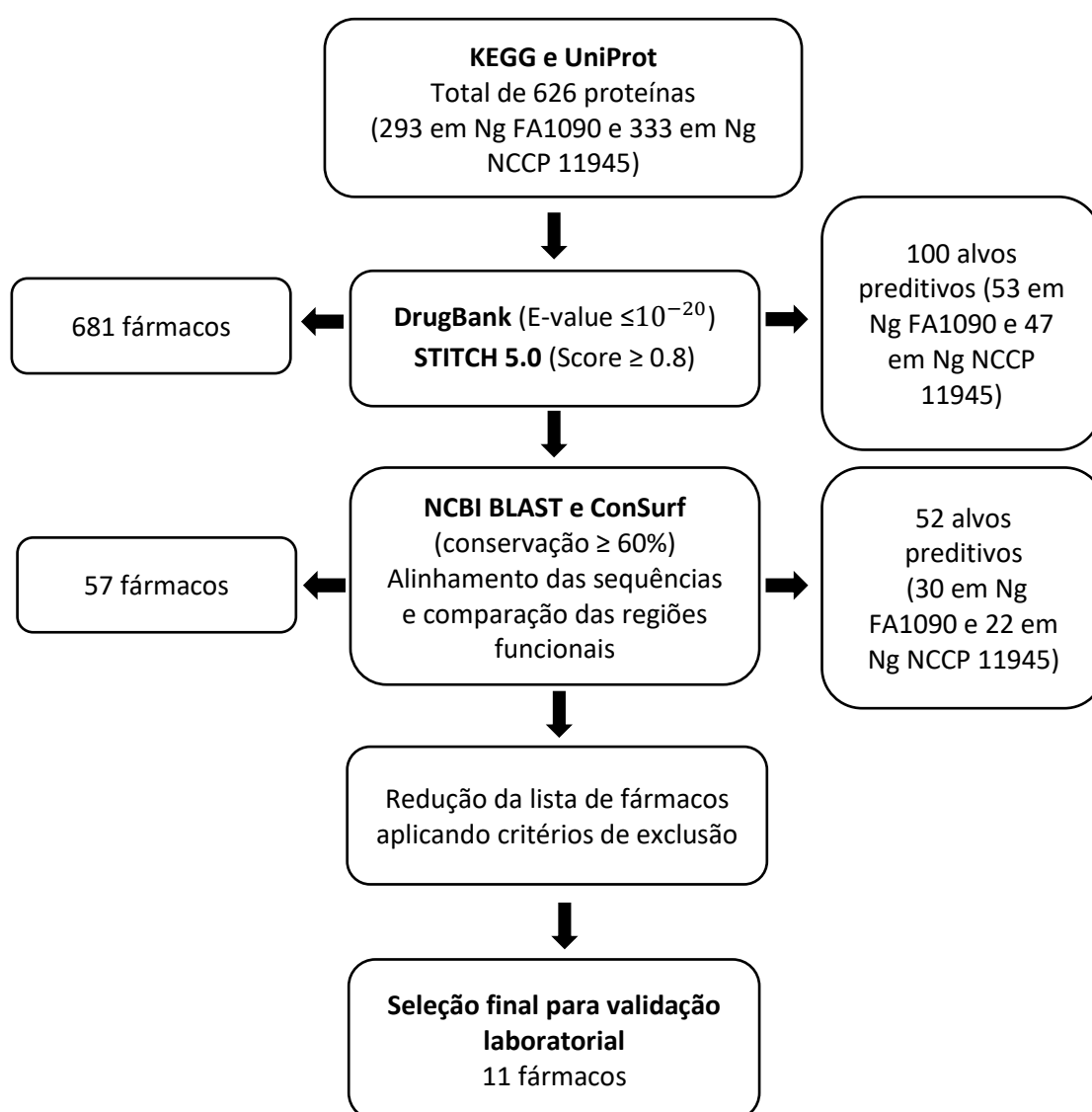


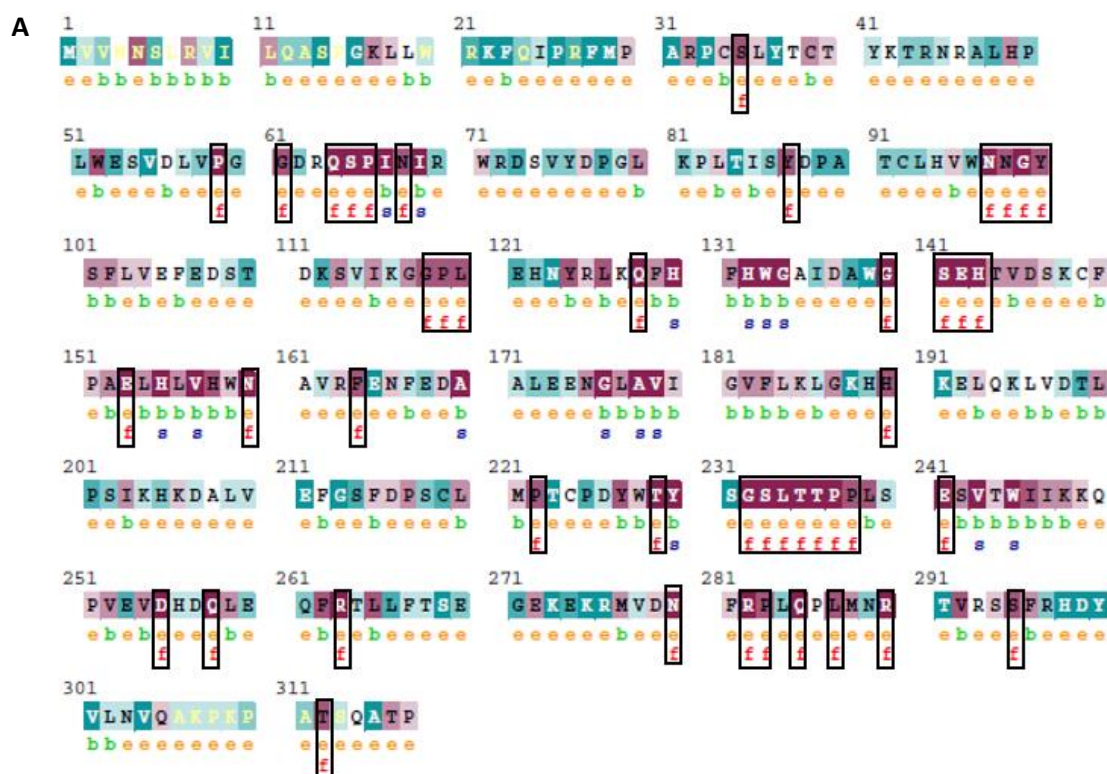
Figura 3.1. Fluxograma da estratégia de reposicionamento *in silico* de fármacos e resultados correspondentes. Ng, *N. gonorrhoeae*.

3.1.3 Triagem seletiva dos fármacos identificados através da comparação de domínios funcionais conservados

Após a identificação dos alvos homólogos e respetivos fármacos efetuou-se a comparação das regiões funcionais entre o alvo homólogo com fármaco aprovado e o alvo potencial em *N. gonorrhoeae*. Esta análise permite aumentar a probabilidade de ambas as proteínas compartilharem o mesmo local ativo e de haver assim a preservação da afinidade do fármaco no alvo da bactéria (69). A Figura 3.2 mostra um exemplo de análise ConSurf das regiões funcionais entre um alvo de fármaco aprovado (anidrase carbónica 5B, mitocondrial) e o alvo correspondente em *N. gonorrhoeae*.

Nesta análise, apenas foram selecionadas sequências em que a conservação entre o alvo em *N. gonorrhoeae* e o correspondente alvo homólogo fosse igual ou superior a 60%. Assim, após o alinhamento das sequências usando o NCBI BLAST e comparação com os resultados da análise ConSurf, apenas 20 proteínas da estirpe *N. gonorrhoeae* FA 1090 (aproximadamente 8% do número de alvos inicial) apresentaram regiões funcionais com conservação igual ou superior a 60% com as proteínas homólogas correspondentes (30 no total), o que resultou numa associação com 52 fármacos aprovados. No caso da estirpe *N. gonorrhoeae* NCCP 11945, 16 proteínas (aproximadamente 5% do número de alvos inicial) apresentaram uma conservação igual ou superior a 60% com as proteínas homólogas respetivas (22 no total). Estas 22 proteínas homólogas encontravam-se associadas a 28 fármacos aprovados, dos quais 22 eram comuns à estirpe FA 1090 e 6 eram diferentes, o que evidencia o facto de que, devido à elevada homologia entre as duas estirpes, alguns dos alvos homólogos encontrados, e consequentemente os fármacos associados, foram identificados para ambas. Assim, no final desta análise, obteve-se um total de 57 fármacos que podem ser agrupados em diferentes classes e que poderão estar associados a alvos preditivos em *N. gonorrhoeae*. Foi também avaliado se alguns dos fármacos identificados foram previamente testados em *N. gonorrhoeae*. Para tal, efetuou-se uma pesquisa bibliográfica nas bases de dados PubMed, PubMed Central e Google Scholar onde se identificaram 7 fármacos cuja atividade já tinha sido estudada em *N. gonorrhoeae*. Por outro lado, 50 dos fármacos identificados não foram experimentalmente testados de acordo com os resultados da pesquisa bibliográfica. A informação relativa a estes 57 fármacos encontra-se apresentada na Tabela 3.1.

A informação completa de todos os 681 fármacos identificados e respetivos alvos encontra-se na Tabela S2 no seguinte [link](#).



The conservation scale:



- e - An exposed residue according to the neural-network algorithm.
- b - A buried residue according to the neural-network algorithm.
- f - A predicted functional residue (highly conserved and exposed).
- s - A predicted structural residue (highly conserved and buried).
- Insufficient data - the calculation for this site was performed on less than 10% of the sequences.

B

Alvo do fármaco	51	LWESVDLVP	GGDRQSPINIR	WRDSVYDPGL	KPLTISY	DPATCLHW	NNGYS	SFLVEFEDST	110
		L E L	G QSP+NI	S P +K	++Y P+	+ V	NNG++	V + +	
Alvo em Ng	47	LSEEFRLC	STGKNQSPV	ITETVSGKL	PAIK---	VNYKPS-	MVDVENNGH	TIQVNYPEGG	102
Alvo do fármaco	111	DKSVIKG	GPLEHNYRLK	QFHFHWGAIDAW	SEH	TVDSKCFPA	ELHLVHW	AVR	170
		+ + G	Y LKQFHFH		SE+ + +	FP E H	VH		
Alvo em Ng	103	NLTLVNG---	RTYTLKQFHFHVP	-----	SENQIKGR	TFPME	AHFVH---	-----	140
Alvo do fármaco	171	ALEENGLA-	VIGVFLKLGKHH	KEQLKLVDTL	PSIKHKDAL	VEFGSFDPSCL	MP	TCPDYWT	229
		L+EN	V+ V + GK +	L + + +P	K L +	FD S L+P	Y+		
Alvo em Ng	141	-LDENKQPL	VLAVLYEAGTKN	GRLSIIWNV	MPMTAGKV	KLNQ--	PFDA	TLLEPKRLKYR	197
Alvo do fármaco	230	YSGSLTTP	PLSESVTWI	IKKQPV	VDHDL	EQFR	TLTFTS	EGEKEKRMVDN	289
		++GSLTTP	+E V+W++	K +D Q	E+F + +			+N RP+QPL	
Alvo em Ng	198	FAGSLTTP	CTEGVSWL	VLKTYD	HIDQAAEK	FTRAVGS	-----	ENNR	247
Alvo do fármaco	290	RTV							292
		R V							
Alvo em Ng	248	RVV							250

Figura 3.2. Análise ConSurf das regiões funcionais de um alvo de fármaco aprovado e o alvo correspondente em *N. gonorrhoeae*. A) Resultado da análise ConSurf com os resíduos funcionais conservados assinalados pela letra “f” na proteína homóloga (alvo de fármaco) à de *N. gonorrhoeae*. B) Alinhamento da proteína de *N. gonorrhoeae* com a proteína homóloga e comparação das regiões funcionais Ng, *N. gonorrhoeae*.

Tabela 3.1. Descrição dos 57 fármacos resultantes da análise ConSurf: classe a que pertencem, respetivos alvos preditivos nas estirpes estudadas e informação sobre testagem prévia em *N. gonorrhoeae*.

Fármaco	Classe	Alvo em Ng FA 1090	Alvo em Ng NCCP 11945	Testado em Ng
Dequalinio	Antisséptico	Proteína de efluxo (NGO1364)	-----	Sim (93)
Hexaclorofeno	Antisséptico	Desidrogenase D-lactato (NGO0890)	Desidrogenase D-lactato (NGK 0915)	Sim (94)
Doxorrubicina	Tratamento do cancro	NADH Quinona oxirredutase (NGO1750, NGO1749, NGO1748)	NADH-desidrogenase (NGK2150, NGK2152)	Não
Levoleucovorina	Tratamento do cancro	Serina hidroximetiltransferase (NGO0866)	----	Não
Dacarbazina	Tratamento do cancro	Fosfogluconato desidrogenase (NGO1914)	----	Não
Metotrexato	Tratamento do cancro	Fosfogluconato desidrogenase (NGO1914)	----	Não
Metoxiflurano	Anestésico	NADH-quinona oxirredutase (NGO1744)	NADH-quinona oxirredutase (NGK2146)	Não

Tabela 3.1. Descrição dos 57 fármacos resultantes da análise ConSurf: classe a que pertencem, respetivos alvos preditivos nas estirpes estudadas e informação sobre testagem prévia em *N. gonorrhoeae* (continuação).

Fármaco	Classe	Alvo em Ng FA 1090	Alvo em Ng NCCP 11945	Testado em Ng
Halotano	Anestésico	NADH-quinona oxirredutase (NGO1744)	NADH-quinona oxirredutase (NGK2146)	Não
Desflurano	Anestésico	NADH-quinona oxirredutase (NGO1744)	NADH-quinona oxirredutase (NGK2146)	Não
Sevoflurano	Anestésico	NADH-quinona oxirredutase (NGO1744)	NADH-quinona oxirredutase (NGK2146)	Não
Isoflurano	Anestésico	NADH-quinona oxirredutase (NGO1744)	NADH-quinona oxirredutase (NGK2146)	Não
Tiabendazol	Parasitícida	Sucinato desidrogenase (NGO0921)	----	Não
Artenimol	Tratamento da malária	Enolase (NGO0617)	----	Não
Triclabendazol	Tratamento da fasciolíase e da paragonimíase	Enolase (NGO0617)	----	Não
Atovaquone	Parasitícida	Citocromo B (NGO2030)	PetB (NGK2206)	Não

Tabela 3.1. Descrição dos 57 fármacos resultantes da análise ConSurf: classe a que pertencem, respectivos alvos preditivos nas estirpes estudadas e informação sobre testagem prévia em *N. gonorrhoeae* (continuação).

Fármaco	Classe	Alvo em Ng FA 1090	Alvo em Ng NCCP 11945	Testado em Ng
Metazolamida	Tratamento do glaucoma	AC (NGO0574)	AC (NGK1348)	Não
Acetazolamida	Diurético	AC (NGO0574)	AC (NGK1348)	Sim (95)
Diclofenamida	Tratamento do glaucoma	AC (NGO0574)	AC (NGK1348)	Não
Brinzolamida	Tratamento do glaucoma	AC (NGO0574)	AC (NGK1348)	Não
Dorzolamida	Tratamento do glaucoma	AC (NGO0574)	AC (NGK1348)	Não
Benztiázida	Tratamento da hipertensão	AC (NGO0574)	----	Não
Ciclotiazida	Diurético	AC (NGO0574)	----	Não
Hidroflumetiazida	Diurético	AC (NGO0574)	----	Não

Tabela 3.1. Descrição dos 57 fármacos resultantes da análise ConSurf: classe a que pertencem, respetivos alvos preditivos nas estirpes estudadas e informação sobre testagem prévia em *N. gonorrhoeae* (continuação).

Fármaco	Classe	Alvo em Ng FA 1090	Alvo em Ng NCCP 11945	Testado em Ng
Bendroflumetiazida	Tratamento da hipertensão	AC (NGO0574)	----	Não
Clorotiazida	Tratamento da hipertensão	AC (NGO0574)	----	Não
Quinetazona	Tratamento da hipertensão	AC (NGO0574)	----	Não
Clortalidona	Tratamento da hipertensão	AC (NGO0574)	AC (NGK1348)	Não
Furosemida	Tratamento da hipertensão	AC (NGO0574) e Fosfogluconato desidrogenase (NGO1914)	----	Não
Triclormetiazida	Tratamento da hipertensão	AC (NGO0574)	----	Não
Indapamida	Tratamento da hipertensão	----	AC (NGK1348)	Não
Zonisamida	Anticonvulsivo	AC (NGO0574)	AC (NGK1348)	Não

Tabela 3.1. Descrição dos 57 fármacos resultantes da análise ConSurf: classe a que pertencem, respetivos alvos preditivos nas estirpes estudadas e informação sobre testagem prévia em *N. gonorrhoeae* (continuação).

Fármaco	Classe	Alvo em Ng FA 1090	Alvo em Ng NCCP 11945	Testado em Ng
Topiramato	Anticonvulsivo	AC (NGO0574)	----	Não
Amlodipina	Bloqueador de canais de cálcio	AC (NGO0574)	----	Não
Etinamato	Anti-insónias	AC (NGO0574)	----	Não
Sulpirida	Antipsicótico	AC (NGO0574)	----	Não
Valdecoxibe	Analgésico	AC (NGO0574)	----	Não
Ácido deoxicólico	Ácido biliar	Proteína de efluxo (NGO 1364)	----	Não
Clomipramina	Antidepressivo	Transportador (NGO1355)	Transportador (NGK1587)	Não
Duloxetina	Antidepressivo	Transportador (NGO1355)	Transportador (NGK1587)	Não

Tabela 3.1. Descrição dos 57 fármacos resultantes da análise ConSurf: classe a que pertencem, respetivos alvos preditivos nas estirpes estudadas e informação sobre testagem prévia em *N. gonorrhoeae* (continuação).

Fármaco	Classe	Alvo em Ng FA 1090	Alvo em Ng NCCP 11945	Testado em Ng
Sertralina	Antidepressivo	Transportador (NGO1355)	Transportador (NGK1587)	Não
Desipramina	Antidepressivo	Transportador (NGO1355)	Transportador (NGK1587)	Não
Cetotifeno	Anti- histamínico	Fosfogluconato desidrogenase (NGO1914)	----	Não
Metformina	Anti- hiperglicémico	Flavoproteína- ubiquinona oxidoreductase (NGO1396)	Flavoproteína- ubiquinona oxidoreductase (NGK1643)	Não
Aciclovir	Antiviral	Piruvato quinase (NGO1881) e Succinato-CoA ligase (NGO0912)	Succinato-CoA ligase (NGK0888)	Não
Xantinol	Vasodilatador	----	Oxoglutarato desidrogenase (NGK0882)	Não
Nicotinato de Inositol	Vasodilatador	----	ATP sintetase (NGK2626)	Não

Tabela 3.1. Descrição dos 57 fármacos resultantes da análise ConSurf: classe a que pertencem, respectivos alvos preditivos nas estirpes estudadas e informação sobre testagem prévia em *N. gonorrhoeae* (continuação).

Fármaco	Classe	Alvo em Ng FA 1090	Alvo em Ng NCCP 11945	Testado em Ng
Auranofina	Antirreumático	----	Peroxirredoxina 2 (NGK0873)	Sim (96)
Meloxicam	Anti- inflamatório	Fosfogluconato desidrogenase (NGO1914)	----	Não
Celebrex	Anti- inflamatório	AC (NGO0574)	----	Sim (97)
Ciprofloxacina	Antibiótico	Proteína de efluxo (NGO0395)	----	Sim (98)
Sulfanilamida	Antibiótico	----	AC (NGK1348)	Não
Cefiderocol	Antibiótico	Proteína de membrana OprM (NGO1363) e Proteína de resistência MexB (NGO1364)	Proteína de membrana OprM (NGK1596)	Sim (99)
Metocarbamol	Relaxante muscular	AC (NGO0574)	----	Não

Tabela 3.1. Descrição dos 57 fármacos resultantes da análise ConSurf: classe a que pertencem, respetivos alvos preditivos nas estirpes estudadas e informação sobre testagem prévia em *N. gonorrhoeae* (continuação).

Fármaco	Classe	Alvo em Ng FA 1090	Alvo em Ng NCCP 11945	Testado em Ng
Diazóxido	Ativador de canais de potássio	AC (NGO0574)	----	Não
Deferoxamina	Agente quelante	Proteína integral da membrana (NGO1455)	Proteína integral da membrana (NGK1718)	Não
Carboxina	Antifúngico	Sucinato desidrogenase (NGO0921)	----	Não
Ácido gadopentético	Agente de contraste em ressonâncias magnéticas	Fosfogluconato desidrogenase (NGO1914)	----	Não

3.1.4 Construção da lista final de fármacos com potencial atividade contra *N. gonorrhoeae*

Após a comparação de domínios funcionais conservados, estabeleceu-se um conjunto de critérios adicionais que permitiram selecionar um grupo de fármacos cuja atividade *in vitro* contra *N. gonorrhoeae* fosse possível de determinar durante o período de desenvolvimento desta dissertação. Após a aplicação dos critérios descritos na secção 2.1.4 dos Materiais e Métodos (prioridade a fármacos não testados, boa capacidade técnica de avaliação em laboratório, exclusão de compostos com elevada toxicidade, representatividade, disponibilidade e facilidade de aquisição), apenas os seguintes 11 fármacos dos 57 previamente descritos foram selecionados para a fase experimental *in vitro*: dequalinio, doxorubicina, tiabendazol, atovaquone, acetazolamida, benzotiazida, amlodipina, topiramato, sulpirida, clomipramina e metformina. Destes 11 fármacos, apenas o dequalinio e a acetazolamida já tinham sido testados em *N. gonorrhoeae*. Todos os restantes fármacos, tanto quanto foi possível apurar nas pesquisas

bibliográficas efetuadas, nunca tinham sido testados em *N. gonorrhoeae* e estão a sê-lo pela primeira vez neste trabalho.

3.2 Validação experimental *in vitro*

Para a validação experimental da atividade *in vitro* dos fármacos selecionados pela estratégia de reposicionamento *in silico*, determinaram-se as suas CMI's contra *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 (secção 3.2.1), estirpe de referência para ensaios de suscetibilidade aos antimicrobianos. Os fármacos com CMI < 20 µM (após conversão a partir de µg/mL) foram considerados como potenciais agentes antimicrobianos, segundo critérios previamente estabelecidos na literatura (92). No caso dos fármacos que apresentaram CMI ≥ 20 µM, estes não foram excluídos, mas avaliou-se a sua possível atividade como adjuvantes da ação de antibióticos utilizados no tratamento de infeções por *N. gonorrhoeae* (secção 3.2.2). Os fármacos que promoveram uma redução da CMI do antibiótico de pelo menos 4x foram selecionados para efetuar ensaios de sinergismo pelo método de “Checkerboard” (secção 3.2.3) e para posterior avaliação da sua atividade adjuvante da ação de antibióticos num painel de 10 isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* (secção 3.2.4). Por fim, para determinar se a ação adjuvante destes fármacos se deve a um efeito de inibição das bombas efluxo de *N. gonorrhoeae*, efetuaram-se ensaios de acumulação de brometo de etídio, um substrato comum de bombas de efluxo, por fluorometria em tempo real (secção 3.2.5).

3.2.1 Determinação de concentrações mínimas inibitórias dos fármacos selecionados pelo método de reposicionamento *in silico*

As CMI's dos 11 fármacos selecionados pela análise *in silico* foram determinadas pelo método de microdiluição, baseado no protocolo descrito por Foerster *et al.* (86). Testaram-se também os fármacos clorpromazina, tioridazina e verapamil, que apesar de não terem sido selecionados na análise da conservação dos resíduos funcionais, estão descritos na literatura como inibidores do metabolismo energético e de bombas de efluxo em várias espécies de bactérias e, até à data da elaboração desta dissertação, ainda não haviam sido testados em *N. gonorrhoeae* (49) (50) (83) (87) (88). A Tabela 3.2 apresenta as CMI's para estes fármacos na estirpe *N. gonorrhoeae* ATCC 49226.

Para seleção dos fármacos mais promissores, seguiu-se o critério definido por Costa *et al.* (92), em que os fármacos com CMI < 20 µM foram considerados como potenciais agentes antimicrobianos, enquanto que aqueles que apresentaram CMI ≥ 20 µM não foram excluídos, mas

estudados como possíveis adjuvantes da ação de antibióticos utilizados no tratamento de infecções por *N. gonorrhoeae*.

Dos 11 fármacos testados apenas a doxorrubicina e o dequalinio apresentaram uma CMI < 20 µM, o que pelo critério acima definido, indica que estes compostos apresentam uma ação antimicrobiana em *N. gonorrhoeae*. O atovaquone e a tioridazina apresentaram uma CMI ligeiramente acima dos 20 µM o que significa que de acordo com este critério não são considerados agentes antimicrobianos. No entanto, sendo o valor de CMI tão próximo do “cutoff” de 20 µM para esta estirpe, pode ser possível que estes fármacos apresentem uma CMI inferior a este valor para outras estirpes de *N. gonorrhoeae*.

No caso de acetazolamida, tiabendazol, benzotiazida, amlodipina, topiramato, sulpirida, clomipramina, metformina, clorpromazina e verapamil, apresentaram valores de CMIs muito superiores a 20 µM, o que significa que não serão considerados como potenciais agentes antimicrobianos. Apesar disso, estes compostos podem ser adjuvantes de antibióticos e, portanto, também se prosseguiu com a avaliação do efeito destes fármacos na redução da CMI de antibióticos utilizados no tratamento de infecções por *N. gonorrhoeae*.

3.2.2 Avaliação do efeito dos fármacos selecionados pelo método de reposicionamento *in silico* sobre o valor de CMI de antibióticos

De modo a avaliar o efeito dos 11 fármacos selecionados pela análise *in silico* nos valores de CMI de antibióticos, determinou-se a CMI dos mesmos na presença dos fármacos a ¼ da sua CMI. Utilizou-se esta concentração de fármacos de forma a não interferir na viabilidade celular de *N. gonorrhoeae*. Também se avaliou o efeito dos inibidores de efluxo clorpromazina, verapamil e tioridazina no valor de CMI de antibióticos. Os antibióticos testados e as categorias para o tratamento da gonorreia onde se incluem, de acordo com o ECDC, foram os seguintes: azitromicina, cefixima e ceftriaxona na categoria I; espectinomicina, penicilina, canamicina, gentamicina, ofloxacina e ciprofloxacina na categoria II; tetraciclina na categoria III. A escolha destes antibióticos está relacionada com o facto de alguns deles serem atualmente usados e recomendados para o tratamento de *N. gonorrhoeae* (azitromicina, cefixima e ceftriaxona) e outros terem sido usados no passado para esse tratamento, mas abandonados mais tarde devido à emergência de resistências, ou serem atualmente menos utilizados (penicilina, tetraciclina, espectinomicina, ciprofloxacina, ofloxacina, canamicina e gentamicina).

Os resultados para a estirpe *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 encontram-se apresentados na Tabela 3.3. Os fármacos doxorrubicina, acetazolamida, atovaquone, amlodipina e sulpirida promoveram

uma redução da CMI de pelo menos 4x em antibióticos como a azitromicina, canamicina, penicilina, gentamicina e tetraciclina e foram, consequentemente, selecionados para efetuar ensaios de sinergismo pelo método de “Checkerboard” e para posterior avaliação da sua possível atividade adjuvante num painel de isolados clínicos.

Tabela 3.2. Valores de CMI dos fármacos selecionados pelo método de reposicionamento *in silico* para *N. gonorrhoeae* ATCC 49226.

Fármaco	CMI (µg/mL)	CMI (µM)
Acetazolamida	256	1151,9
Amlodipina	32	78,3
Atovaquone	8	21,8
Benzotiazida	16	37,0
Clomipramina	32	101,6
Clorpromazina	16	50,2
Dequalinio	8	17,5
Doxorubicina	8	14,7
Metformina	>1024*	>7927,9
Sulpirida	256	749,8
Tiabendazol	32	159,0
Tioridazina	8	21,6
Topiramato	128	377,2
Verapamil	128	281,6

*A concentração máxima que foi possível testar para a metformina foi 1024 µg/mL, concentração na qual *N. gonorrhoeae* ainda apresentava crescimento e, portanto, apenas foi possível determinar que o valor de CMI para este fármaco é superior a essa concentração.

Tabela 3.3. Valores de CMI de antibióticos na presença dos fármacos selecionados *in silico* e de clorpromazina, tioridazina e verapamil a ¼ da CMI em *N. gonorrhoeae* ATCC 49226.

Antibiótico	CMI (µg/mL)														
	Sem Fármaco	+Dox	+Aceto	+Tbz	+Atv	+Deq	+Benz	+Aml	+Top	+Sul	+Clo	+Met	+Cpz	+Vp	+Tz
Ofl	0,008	0,004	0,004	0,008	0,004	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,004	0,004	0,004
Azn	0,25	≤0,06	≤0,06	0,125	≤0,06	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,25	0,125	0,25
Km	4	2	2	4	0,5	2	4	1	2	0,5	2	2	4	4	4
Pen	0,25	≤0,06	≤0,06	0,5	0,25	0,125	0,25	0,5	0,25	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Gtm	1	0,25	0,25	1	1	1	1	1	0,5	0,5	2	1	1	1	1
Tet	0,25	≤0,06	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25
Cip	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002
Cfm	0,00375	0,00375	0,00375	0,0075	0,00375	0,00375	0,00375	0,00375	0,00187	0,00375	0,00375	0,00375	0,00375	0,00375	0,00375
Cro	0,002	0,001	0,001	0,002	0,002	0,002	0,002	0,001	0,001	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
Sh	32	32	32	32	32	32	64	32	32	32	32	32	32	16	32

Ofl, ofloxacina; Azn, azitromicina; Km, canamicina; Pen, penicilina; Gtm, gentamicina; Tet, tetraciclina; Cip, ciprofloxacina; Cfm, cefixima; Cro, ceftriaxona; Sh, espectinomomicina; Dox, doxorubicina; Aceto, acetazolamida; Tbz, tiabendazol; Atv, atovaquone; Deq, dequalinio; Benz, benztiazida; Aml, amlodipina; Top, topiramato; Sul, sulpirida; Clo, clomipramina; Met, metformina; Cpz, clorpromazina; Vp, verapamil; Tz, tioridazina. Os valores a negrito indicam uma redução da CMI ≥ 4x.

3.2.3 Ensaios de sinergismo pelo método de “Checkerboard”

Para os fármacos que promoveram uma redução de pelo menos 4x na CMI de antibióticos na estirpe *N. gonorrhoeae* ATCC 49226, foram realizados ensaios de sinergismo pelo método de “Checkerboard” para avaliar o tipo de interação entre o fármaco e o antibiótico. Na Tabela 3.4, encontram-se os resultados dos ensaios de sinergismo realizados na estirpe *N. gonorrhoeae* ATCC 49226. Observou-se um efeito sinérgico ($FICI \leq 0,5$) da doxorrubicina com a penicilina, apresentando um valor de $FICI \leq 0,5$ para concentrações a $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ da CMI. No entanto, as restantes combinações apresentaram ausência de interação ($FICI = >0,5-4$), o que pode indicar que o efeito destes fármacos na redução da CMI do antibiótico pode não resultar de um efeito sinérgico, mas de um efeito aditivo da ação dos dois compostos.

Tabela 3.4. Valores de FICI correspondentes ao efeito de atovaquone, acetazolamida, doxorrubicina, amlodipina e sulpirida na CMI de antibióticos na estirpe *N. gonorrhoeae* ATCC 49226.

[Fármaco] [x CMI]	FICI										
	Azn			Km			Pen		Gtm		Tet
	Atv	Aceto	Dox	Atv	Sul	Aml	Atv	Dox	Aceto	Dox	Dox
1	1,03	1,03	1,03	1,13	1,13	1,06	1,06	1,25	1,06	1,06	1,12
1/2	1,00	0,75	0,53	0,75	1,02	0,63	0,56	0,50	0,75	0,56	1,00
1/4	1,02	0,75	0,63	0,53	1,02	0,63	0,63	0,50	0,63	0,75	1,13
1/8	1,02	1,03	0,63	0,53	1,02	0,63	0,63	0,63	0,63	1,06	1,13
1/16	1,02	1,03	1,06	0,53	1,02	-	1,03	-	1,03	1,06	-
1/32	1,02	1,03	-	0,53	1,02	-	1,03	-	1,03	-	-
1/64	1,02	-	-	-	1,02	-	-	-	-	-	-

Sinergismo: $FICI \leq 0,5$. Antagonismo: $FICI \geq 4$. Ausência de interação: $FICI = 0,5-4,0$ (89).

Azn, azitromicina; Km, canamicina; Pen, penicilina; Gtm, gentamicina; Tet, tetraciclina; Atv, atovaquone; Aceto, acetazolamida; Dox, doxorrubicina; Aml, amlodipina; Sul, sulpirida.

3.2.4 Avaliação da atividade dos fármacos selecionados pelo método de reposicionamento *in silico* em isolados clínicos de *N. gonorrhoeae*

Depois de serem testados na estirpe de referência *N. gonorrhoeae* ATCC 49226, os fármacos selecionados na análise *in silico* e os compostos tioridazina, clorpromazina e verapamil foram testados contra um painel de 10 isolados clínicos com diferentes perfis de suscetibilidade aos antibióticos (Tabela 2.1).

3.2.4.1 Determinação dos valores de CMI dos fármacos selecionados pelo método de reposicionamento *in silico* em isolados clínicos de *N. gonorrhoeae*.

Tal como efetuado para a estirpe de referência *N. gonorrhoeae* ATCC 49226, foram determinadas as CMI dos 11 fármacos selecionados pelo método de reposicionamento *in silico* e da clorpromazina, tioridazina e verapamil para os 10 isolados clínicos em estudo. A Tabela 3.5 apresenta os valores de CMI obtidos para os fármacos estudados em cada isolado clínico de *N. gonorrhoeae*. Na maioria dos isolados clínicos, os valores de CMI dos fármacos foram quase sempre iguais ou superiores aos valores observados para a estirpe de referência. Em particular, os isolados clínicos com perfil XDR (12245 e 12316) foram os que apresentaram valores de CMI mais elevados para todos os fármacos quando comparado com os valores obtidos para a estirpe de referência e para os restantes isolados clínicos. De facto, verificou-se que o valor de CMI correspondia ou era superior à concentração mais alta testada para cada fármaco.

No entanto, também se verificou que alguns fármacos apresentaram uma CMI inferior à da estirpe ATCC 49226 para a maioria dos isolados clínicos. Este foi o caso da doxorrubicina e do dequalinio que apresentaram sempre valores de CMI iguais ou inferiores à da estirpe de referência (exceto nas estirpes 12245 e 12316), o que corresponde a CMI < 20 µM e que reforça, assim, os resultados obtidos na estirpe ATCC 49226 que indicam que estes dois fármacos podem de facto atuar como agentes antimicrobianos.

No extremo oposto, a metformina apresentou uma CMI superior à concentração máxima testada para todos os isolados clínicos. Também a sulpirida, o topiramato e o tiabendazol apresentaram valores de CMI elevados em todos os isolados testados.

Para os restantes fármacos, obtiveram-se diversos valores de CMI, mas o atovaquone, a amlodipina, a clomipramina, a clorpromazina e a tioridazina apresentaram valores de CMI próximos da CMI da estirpe ATCC 49226 para a maioria dos isolados clínicos, com exceção dos isolados 12245 e 12316.

Tabela 3.5. Valores de CMI dos 11 fármacos selecionados *in silico*, clorpromazina, tioridazina e verapamil para a estirpe *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 e para os 10 isolados clínicos.

Fármaco	Estirpe e isolados clínicos de <i>N. gonorrhoeae</i>										
	CMI (µg/mL)										
	ATCC 49226	10042	10214	11530	11658	11693	12248	12245	12316	10314	10959
Dox	8	8	8	2	8	4	8	>64	>64	4	8
Aceto	256	32	256	32	512	512	512	>1024	>1024	256	128
Tbz	32	>128	>128	128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	128
Atv	8	64	8	8	32	32	32	>64	>64	8	32
Deq	8	2	8	1	4	4	8	64	64	4	8
Benz	16	128	128	64	128	128	128	>128	>128	128	128
Aml	32	64	32	8	32	32	16	256	256	32	32
Top	128	>512	512	128	>512	>512	>512	>512	>512	>512	>512
Sul	256	512	>512	>512	512	512	512	>512	>512	512	512
Clo	32	32	32	8	32	32	32	128	256	32	16
Met	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024	>1024
Cpz	16	16	8	8	8	8	128	128	128	64	16
Vp	128	128	64	64	64	64	64	>512	>512	256	256
Tz	8	4	2	4	4	4	4	64	64	16	8

Dox, doxorubicina; Aceto, acetazolamida; Tbz, tiabendazol; Atv, atovaquone; Deq, dequalinio; Benz, benzotiazida; Aml, amlodipina; Top, topiramato; Sul, sulpirida; Clo, clomipramina; Met, metformina; Cpz, clorpromazina; Vp, verapamil; Tz, tioridazina.

3.2.4.2 Avaliação do efeito dos fármacos selecionados pelo método de reposicionamento *in silico* sobre o valor de CMI de antibióticos em isolados clínicos de *N. gonorrhoeae*

Os fármacos acetazolamida, amlodipina, atovaquone, doxorrubicina e sulpirida, que apresentaram efeito significativo na redução de CMI (pelo menos 4x) de antibióticos na estirpe *N. gonorrhoeae* ATCC 49226, foram selecionados para avaliação do mesmo efeito nos isolados clínicos de *N. gonorrhoeae*. Os resultados encontram-se apresentados na Tabela 3.6.

De todos os fármacos testados, apenas a acetazolamida e a amlodipina apresentaram efeito significativo (redução de pelo menos 4x) na CMI dos antibióticos. A acetazolamida apresentou esse efeito na azitromicina no isolado 12248, na gentamicina no isolado 11658 e na penicilina no isolado 11693. Já a amlodipina fê-lo na canamicina nos isolados XDR 12245 e 12316. Assim, estes resultados demonstram o potencial destes dois compostos para serem utilizados como adjuvantes de antibióticos, apesar de não terem demonstrado efeito antimicrobiano nos ensaios anteriores.

Para avaliar se o efeito dos fármacos na redução da CMI dos antibióticos foi resultado da inibição da atividade de efluxo, realizaram-se ensaios de acumulação de brometo de etídio por fluorometria em tempo real.

3.2.5 Avaliação da atividade de efluxo de *N. gonorrhoeae* por fluorometria em tempo real

O método de fluorometria utilizado neste trabalho permite avaliar a atividade de efluxo de uma determinada estirpe bacteriana. Para tal, deteta-se a cinética de transporte de uma molécula fluorescente que seja substrato de bombas de efluxo, como por exemplo o brometo de etídio. Deste modo, é possível comparar a atividade de efluxo em diferentes estirpes bacterianas e avaliar o efeito de potenciais inibidores de efluxo (100) (101). Assim, utilizou-se o ensaio de acumulação de brometo de etídio, para determinar a capacidade de inibição da atividade de efluxo de cada fármaco em *N. gonorrhoeae*. Se um dado fármaco que teve efeito na redução da CMIs de um antibiótico, também aumentar a acumulação de brometo de etídio, então a diminuição da CMI poderá ser, pelo menos parcialmente, explicada pela inibição da atividade de efluxo. Por outro lado, caso o fármaco provoque diminuição da CMI do antibiótico, mas no ensaio de acumulação de brometo de etídio não demonstre capacidade de inibição do efluxo, então a redução da CMI do antibiótico na presença de fármaco será devida a outro(s) mecanismo(s) de resistência como por exemplo resistências cromossômicas ou plasmídicas.

Estes ensaios foram efetuados na estirpe de referência *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 e em dois isolados clínicos 10214 e 12245. O isolado 10214 foi selecionado, porque apresenta atividade de efluxo aumentada devido a uma mutação no gene *mtrR* que codifica para o regulador da bomba de efluxo MtrCDE (84), enquanto que o isolado 12245 foi escolhido por apresentar um fenótipo XDR.

Tabela 3.6. Valores de CMI de antibióticos na presença de fármacos selecionados, a ¼ da CMI, em isolados clínicos de *N. gonorrhoeae*.

AB +/- Far	Isolados clínicos de <i>N. gonorrhoeae</i>									
	CMI (µg/mL)									
	10042	10214	11530	11658	11693	12248	12245	12316	10314	10959
Azn	0,125	0,25	0,06	0,125	0,125	0,25	8	16	0,125	0,25
+Atv	0,125	0,125	0,06	0,125	0,125	0,125	4	8	0,125	0,25
+Dox	0,125	0,125	0,06	0,125	0,125	0,125	4	16	0,125	0,125
+Aceto	0,125	0,25	0,06	0,125	0,125	≤0,06	4	16	0,125	0,125
Km	8	8	2	8	8	8	256	256	4	0,25
+Atv	8	4	1	4	2	4	256	128	4	0,25
+Aml	4	8	2	8	4	8	16	16	2	0,125
+Sul	8	8	2	8	8	8	256	256	4	0,125
Gen	4	2	1	2	2	2	64	32	8	2
+Dox	4	1	0,5	2	1	2	64	16	4	2
+Aceto	4	1	0,5	≤0,06	1	2	32	32	4	1
Pen	0,25	0,25	0,125	0,125	0,5	0,25	8	4	1	1
+Dox	0,25	0,25	0,125	0,125	0,5	0,25	4	4	0,5	1
+Aceto	0,25	0,125	0,125	0,125	≤0,06	0,25	8	4	1	1
Tet	0,125	0,125	8	8	0,25	0,5	2	16	2	0,5
+Dox	0,125	0,125	8	4	0,125	0,25	2	16	2	0,25

Dox, doxorrubicina; Aceto, acetazolamida; Atv, atovaquone; Aml, amlodipina; Sul, sulpirida; Tet, tetraciclina; Azn, azitromicina; Km, canamicina; Gen, gentamicina; Pen, penicilina; AB, antibiótico; Far, fármaco. Os valores a negrito indicam uma redução da CMI $\geq 4x$.

3.2.5.1 Avaliação do efeito dos fármacos selecionados pelo método de reposicionamento *in silico* sobre o valor de CMI do brometo de etídio em *N. gonorrhoeae*

Antes de iniciar os ensaios de fluorimetria, foi necessário determinar a CMI do brometo de etídio para cada estirpe de *N. gonorrhoeae* em estudo, para garantir que a concentração selecionada para os ensaios fluorométricos não iria comprometer a viabilidade bacteriana. Também se avaliou o efeito dos 11 fármacos selecionados pela análise *in silico* na redução da CMI do brometo de etídio. Os resultados apresentados na Tabela 3.7 mostram que a CMI do brometo de etídio é significativamente mais elevada ($\geq 4\times$) nos isolados clínicos 10214 e 12245, comparativamente com a estirpe ATCC 49226, o que sugere que existe de facto uma atividade de efluxo aumentada nestes isolados de *N. gonorrhoeae*. Observou-se redução significativa ($\geq 4\times$) da CMI do brometo de etídio na presença de doxorrubicina, atovaquone, dequalinium, amlodipina, clomipramina e verapamil para a estirpe ATCC 49226 e apenas na presença de amlodipina para os dois isolados clínicos (Tabela 3.7).

3.2.5.2 Ensaio de acumulação de brometo de etídio

Para avaliar a potencial atividade de inibição de efluxo dos 11 fármacos selecionados pela análise *in silico*, foi necessário efetuar um ensaio de acumulação com concentrações crescentes de brometo de etídio para determinar a concentração de equilíbrio entre o influxo e o efluxo deste composto na estirpe *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 e nos isolados clínicos 10214 e 12245. Posteriormente, utilizou-se este valor de concentração nos ensaios de acumulação de brometo de etídio na presença dos 11 fármacos selecionados pela análise *in silico* e dos compostos clorpromazina, tioridazina e verapamil. A Figura 3.3 apresenta gráficos representativos dos resultados obtidos nos ensaios de acumulação com concentrações crescentes de brometo de etídio para as três estirpes estudadas.

Assim, foi possível observar que a concentração de equilíbrio (influxo = efluxo) de brometo de etídio foi de 1 $\mu\text{g/mL}$ para a estirpe ATCC 49226 e de 2 $\mu\text{g/mL}$ para os dois isolados clínicos. Este resultado está de acordo com as diferenças observadas na CMI do brometo de etídio (Tabela 3.7) e sugere que os isolados clínicos apresentam uma atividade de efluxo superior à da estirpe ATCC 49226.

Tabela 3.7. Valores de CMI do brometo de etídio na presença dos 11 fármacos selecionados na análise *in silico* e de clorpromazina, tioridazina e verapamil a ¼ da CMI para a estirpe *N. gonorrhoeae* ATCC49226 e para os isolados clínicos 10214 e 12245.

EtBr -/+ Fármaco	Estirpe de <i>N. gonorrhoeae</i> CMI (µg/mL)		
	ATCC 49226	10214	12245
EtBr	4	16	64
+ Dox	1	16	64
+ Aceto	4	16	64
+ Tbz	4	16	64
+ Atv	1	16	64
+ Deq	1	16	64
+ Benz	4	8	64
+ Aml	0,5	4	4
+ Top	4	16	64
+ Sul	4	16	64
+ Clo	≤0,125	16	64
+ Met	4	16	64
+ Cpz	2	16	64
+ Vp	1	16	64
+ Tz	2	16	64

EtBr, brometo de etídio; Dox, doxorrubicina; Aceto, acetazolamida; Tbz, tiabendazol; Atv, atovaquone; Deq, dequalinio; Benz, benzotiazida; Aml, amlodipina; Top, topiramato; Sul, sulpirida; Clo, clomipramina; Met, metformina; Cpz, clorpromazina; Vp, verapamil; Tz, tioridazina. Os valores a negrito indicam uma redução da CMI do brometo de etídio $\geq 4x$.

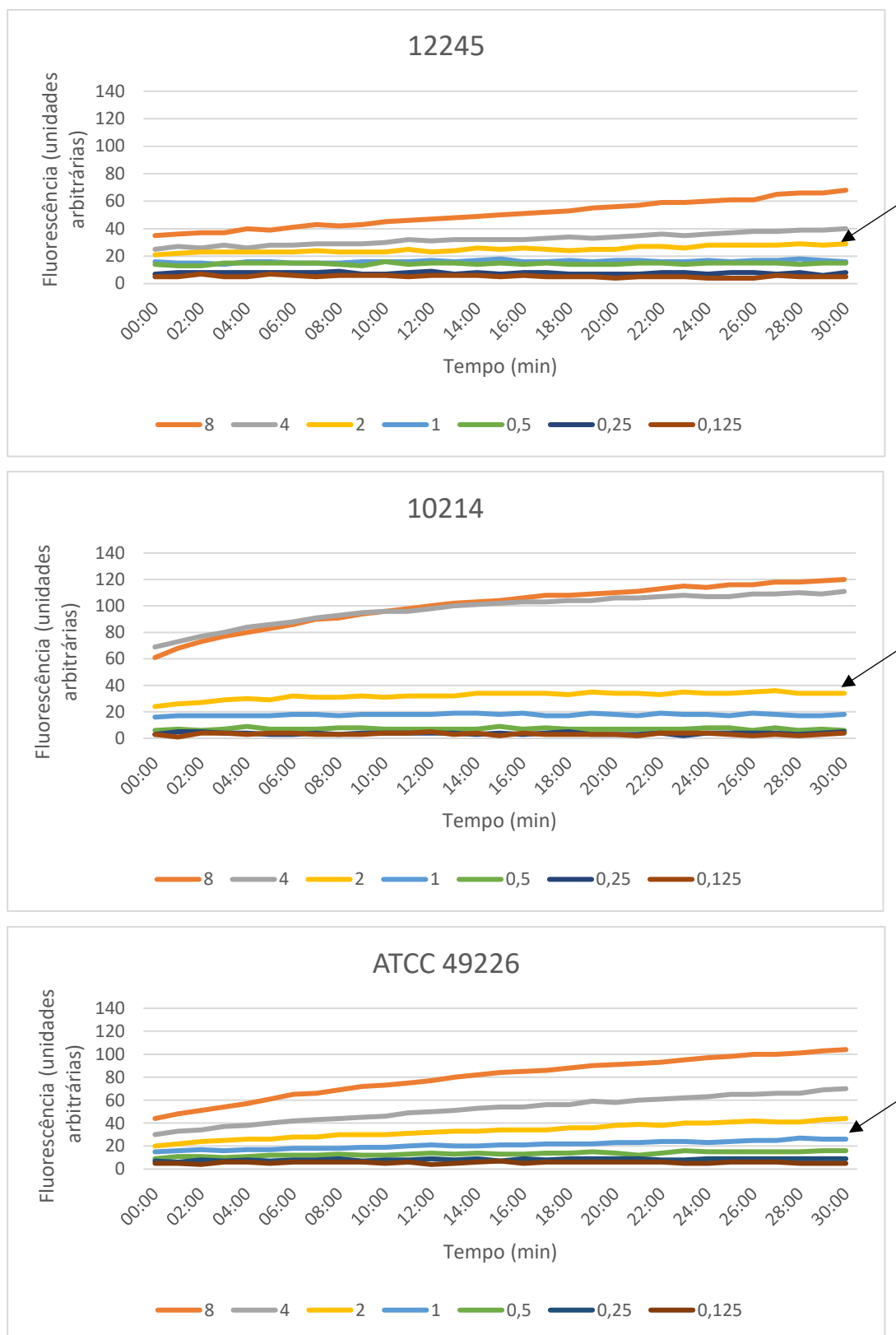


Figura 3.3. Acumulação de concentrações crescentes de brometo de etídio na estirpe *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 (0,06 a 8 µg/mL) e nos isolados clínicos 10214 e 12245 (0,125 a 16 µg/mL). A seta indica a concentração de equilíbrio de influxo/efluxo de EtBr. EtBr, brometo de etídio.

3.2.5.3 Ensaios de acumulação de brometo de etídio na presença de fármacos identificados pelo método de reposicionamento *in silico*

Para avaliar o potencial efeito dos fármacos identificados pelo método de reposicionamento *in silico* na acumulação de brometo de etídio, efetuaram-se ensaios de acumulação na presença dos mesmos a $\frac{1}{4}$ da CMI para a estirpe de referência ATCC 49226 e para as estirpes clínicas 10214 e 12245. A concentração de brometo de etídio testada correspondeu à concentração de equilíbrio determinada previamente para cada estirpe de *N. gonorrhoeae* (Figura 3.3). A Figura 3.4 apresenta gráficos representativos dos resultados obtidos nestes ensaios para as três estirpes de *N. gonorrhoeae* estudadas.

Por razões técnicas (interferência na leitura da fluorescência do brometo de etídio) não foi possível avaliar o efeito da doxorrubicina no efluxo das bactérias e, por essa razão, o resultado correspondente a este fármaco não se encontra apresentado na Figura 3.4. Analisando o efeito dos restantes fármacos, para a estirpe ATCC 49226 observa-se um aumento pouco significativo da acumulação de brometo de etídio na presença de qualquer um dos fármacos. No caso do isolado clínico 10214, não se observou qualquer efeito dos fármacos na acumulação deste composto. No caso do isolado 12245, a amlodipina foi o fármaco que provocou uma maior acumulação de brometo de etídio sendo que para os restantes fármacos o aumento da acumulação foi também pouco significativo.

Para auxiliar a interpretação destes resultados, calculou-se o valor de RFF (Tabela 3.8). Na tabela é possível verificar que de acordo com o critério de interpretação do valor de RFF (92) descrito na secção 2.2.7.2 de Materiais e Métodos, nenhum fármaco possui atividade de inibição de efluxo pois para todos eles o valor de RFF é <1 . No entanto, podemos realçar que a amlodipina apresentou, para o isolado 12245, um valor RFF de 0,74 e que, portanto, apesar de pelo critério definido se considerar que não tem atividade inibitória de efluxo, pode na verdade ter algum efeito, mesmo que pouco significativo.

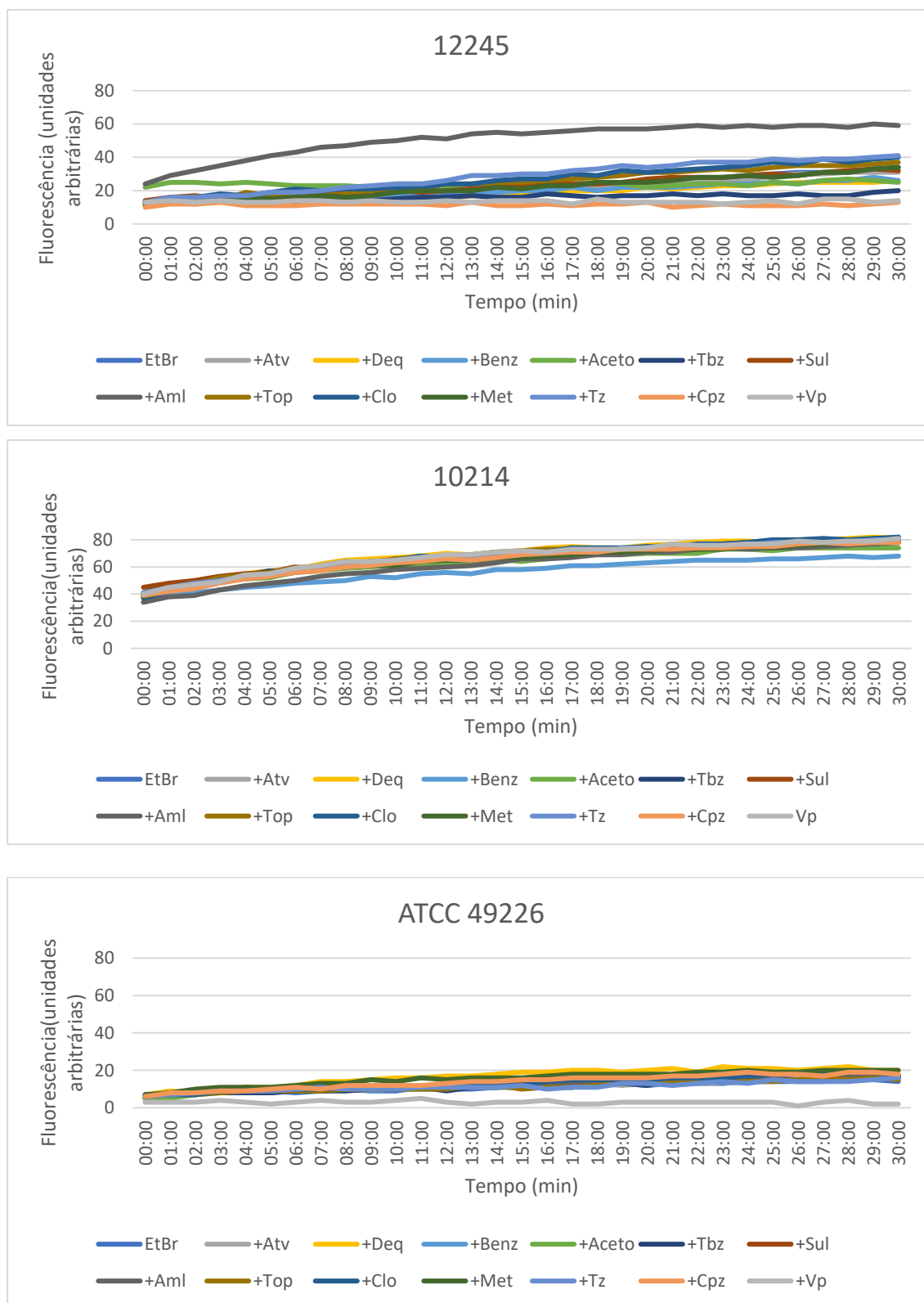


Figura 3.4. Acumulação de brometo de etídio na presença de fármacos na estirpe *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 e nos isolados clínicos 10214 e 12245. Aceto, acetazolamida; Tbz, tiabendazol; Atv, atovaquone; Deq, dequalinio; Benz, benztiazida; Aml, amlodipina; Top, topiramato; Sul, sulpirida; Clo, clomipramina; Met, metformina; Cpz, clorpromazina; Vp, verapamil; Tz, tioridazina.

Tabela 3.8. Valores de RFF dos fármacos testados nos ensaios de acumulação de brometo de etídio para as três estirpes de *N. gonorrhoeae* estudadas.

Fármaco	RFF por estirpe/isolado clínico de <i>N. gonorrhoeae</i>		
	ATCC 49226	10214	12245
Aceto	0,21	-0,08	-0,26
Aml	0,21	-0,03	0,74
Atv	0,14	-0,01	-0,09
Benz	0,14	-0,15	-0,24
Clo	0,21	0,03	0,18
Cpz	0,29	-0,03	-0,62
Deq	0,43	0,01	-0,24
Met	0,43	-0,03	0
Sul	0,21	-0,01	0,06
Tbz	0,14	-0,03	-0,41
Top	0,007	0	0,09
Tz	0,14	0	0,21
Vp	-0,86	0,01	-0,59

Os valores de RFF correspondem ao último ponto de leitura aos 30 minutos. Aceto, acetazolamida; Tbz, tiabendazol; Atv, atovaquone; Deq, dequalinio; Benz, benzotiazida; Aml, amlodipina; Top, topiramato; Sul, sulpirida; Clo, clomipramina; Met, metformina; Cpz, clorpromazina; Vp, verapamil; Tz, tioridazina.

4 Discussão

A problemática associada às IST e, em particular, às infeções por *N. gonorrhoeae* tem vindo a aumentar ao longo dos anos devido a fatores relacionados com as preferências sexuais, número de parceiros sexuais, aparecimento de tratamento antirretroviral para o VIH (que causou negligência no uso de métodos contraceptivos), entre outros (4). Este aumento de casos não seria tão problemático se houvesse uma ampla gama de opções terapêuticas para tratar estas infeções. No entanto, desde a descoberta do primeiro fármaco utilizado no tratamento da gonorreia, a sulfanilamida em 1935, praticamente todas as opções terapêuticas introduzidas no mercado tiveram, eventualmente, de ser abandonadas devido à emergência de estirpes de *N. gonorrhoeae* resistentes que tornavam os agentes antimicrobianos ineficientes para o tratamento desta infeção nas doses recomendadas (9). Assim, de acordo com a OMS, o tratamento atual para a gonorreia utiliza, essencialmente, três fármacos - ceftriaxona ou cefixima e azitromicina - o que torna clara a urgente necessidade da descoberta de novas opções terapêuticas (24).

Uma vez que o processo de desenvolvimento de um novo pode demorar até 16 anos e ter custos que podem chegar a cerca de 2,5 mil milhões de dólares (52), surgiram novos métodos, como o reposicionamento *in silico* utilizado neste trabalho, que permitem poupar tempo e dinheiro (o processo demora cerca de 6 anos e tem custos aproximados de 300 milhões de dólares). De facto, as estratégias de reposicionamento de fármacos não se dedicam ao desenvolvimento de compostos novos, mas sim em procurar fármacos já aprovados para uso humano e utilizados no tratamento de outras doenças e que possam também ser direcionados para novas aplicações terapêuticas (70). O paradigma do reposicionamento de fármacos também foi aplicado em estudos em *N. gonorrhoeae*, tendo sido identificados a salicilamida e os derivados do ácido antranílico (71) (72) (102).

Nesta Dissertação, utilizou-se uma estratégia de reposicionamento *in silico*, desenvolvida em estudos anteriores (73) (83), para encontrar fármacos já aprovados para uso clínico e com potencial aplicação contra *N. gonorrhoeae*. Em particular, procuraram-se fármacos que pudessem atuar em proteínas envolvidas no metabolismo energético e transporte membranar, de forma a inibir, direta ou indiretamente, bombas de efluxo que conseguem exportar várias classes de antibióticos (macrólidos, β -lactâmicos, fluoroquinolonas, quinolonas e tetraciclinas) para o exterior das células contribuindo assim de forma considerável para o desenvolvimento de resistências em *N. gonorrhoeae* (39) (40) (41) (42). A capacidade dos fármacos identificados para inibir o efluxo de *N. gonorrhoeae* foi também avaliado por fluorimetria em tempo real, neste trabalho. Os inibidores de efluxo apresentam um potencial interessante pois, ao inibir as bombas de efluxo, podem permitir que estirpes resistentes consigam retornar a um nível de suscetibilidade que viabilize o tratamento com antibióticos para as quais essas estirpes apresentavam resistências. A importância das bombas de efluxo para o desenvolvimento de resistência em *N. gonorrhoeae* foi demonstrada no isolado clínico H041 (resistente a ESC), em que a

perda da bomba MtrCDE permitiu aumentar a suscetibilidade às ESC 4 a 8 vezes (42). Assim, a descoberta e o desenvolvimento de inibidores de efluxo que atuem nas várias bombas de efluxo de *N. gonorrhoeae* pode permitir prevenir e combater a resistência a várias classes de antibióticos.

A estratégia implementada neste trabalho permitiu identificar um total de 681 fármacos obtidos na primeira fase da análise *in silico*, dos quais se selecionaram 11 para validação *in vitro*, através da aplicação de vários critérios de seleção. Além desses 11 fármacos, foram também incluídos a clorpromazina, a tioridazina e o verapamil que apesar de não terem sido selecionados na análise da comparação dos domínios funcionais, são compostos importantes utilizados como inibidores de bombas de efluxo e do metabolismo energético em vários estudos com diferentes espécies bacterianas (87) (88) (49). Dos 14 fármacos testados, a acetazolamida, o atovaquone, o dequalinio, a doxorubicina, a amlodipina e a clomipramina destacaram-se com resultados mais promissores.

4.1 Identificação de fármacos com atividade potencial contra *N. gonorrhoeae* através de uma estratégia de reposicionamento *in silico*

A primeira fase deste estudo consistiu na utilização de uma estratégia de reposicionamento *in silico* com o objetivo de encontrar fármacos já aprovados para outras doenças e que pudessem ser potencialmente eficientes contra *N. gonorrhoeae*. Estes fármacos estão associados a alvos aprovados, homólogos de proteínas de *N. gonorrhoeae*. Em particular, procuraram-se especificamente proteínas envolvidas no metabolismo energético e no transporte membranar. Estas proteínas poderão ser alvos atrativos porque estão associados à atividade de bombas de efluxo, por exemplo o sistema de efluxo MtrCDE, envolvido no desenvolvimento de resistências aos antimicrobianos em *N. gonorrhoeae* (93). Por exemplo, um estudo realizado por Golparian *et al.* demonstrou que a inativação de bombas de efluxo influenciou a suscetibilidade aos antibióticos em isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* resistentes, conseguindo, em alguns casos, reverter a resistência desses isolados para um perfil de suscetibilidade de acordo com as “guidelines” para os “breakpoints” das CMIs (42).

De facto, este método de reposicionamento *in silico* permitiu, num curto espaço de tempo identificar 100 proteínas relacionadas com o metabolismo energético ou com o transporte membranar, potencialmente associadas a 681 fármacos. Após as diferentes etapas de análise *in silico*, selecionaram-se 11 fármacos que formaram o primeiro grupo a ser objeto de avaliação *in vitro*.

Assim, além de reduzir os custos financeiros e a duração da investigação e desenvolvimento, este método proporciona também uma ampla gama de fármacos possíveis de serem testados, com elevada probabilidade de se encontrar um fármaco promissor contra determinada infeção.

No entanto, não obstante as suas vantagens, este método possui algumas limitações que são importantes de reconhecer. Apesar das vantagens óbvias e já mencionadas anteriormente, os parâmetros de exclusão utilizados ao longo da análise *in silico* (ex. valores de “cutoff” utilizados nas bases de dados DrugBank, STITCH e ConSurf) podem conduzir à rejeição de alguns alvos homólogos e, consequentemente, de alguns fármacos associados. Além disso, as bases de dados disponíveis não possuem todas a mesma informação e, portanto, se apenas se utilizar uma base de dados na pesquisa existe sempre um risco inerente de não detetar alguns alvos e/ou fármacos.

Outro aspeto tem a ver com a capacidade de testar todos os fármacos identificados. Se tal não for possível (por razões de disponibilidade financeira, técnica ou de recursos humanos) e se for necessário aplicar critérios de seleção, como foi o caso deste trabalho, existe sempre a possibilidade de se excluir fármacos que, quando testados *in vitro*, apresentariam resultados promissores. Assim sendo, o ideal seria, caso fosse possível, testar todos os fármacos detetados na pesquisa *in silico* (no caso deste trabalho os 681 fármacos detetados inicialmente) garantindo que nenhum fármaco com atividade potencial contra *N. gonorrhoeae* seria excluído.

Apesar destas limitações, este método é uma ótima ferramenta para tentar encontrar novos fármacos para várias doenças, tal como demonstrado neste trabalho onde se obtiveram resultados promissores para alguns fármacos, que serão discutidos na secção seguinte.

4.2 Avaliação da atividade *in vitro* dos fármacos selecionados pela estratégia de reposicionamento *in silico*

Após a análise *in silico* obtivemos um grupo de 11 fármacos (acetazolamida, amlodipina, doxorubicina, tiabendazol, benzotiazida, dequalinio, topiramato, metformina, sulpirida, clomipramina e atovaquone) cuja atividade *in vitro* foi avaliada numa estirpe de referência e em vários isolados clínicos de *N. gonorrhoeae*. Esta avaliação permitiu determinar se estes fármacos com atividade preditiva contra *N. gonorrhoeae* apresentam atividade *in vitro* contra estas bactérias. Inicialmente, determinaram-se as CMIs dos 11 fármacos contra uma estirpe de referência *N. gonorrhoeae* ATCC 49226, recomendada como estirpe de controlo de qualidade para ensaios de suscetibilidade aos antimicrobianos pelo CLSI. Entre os fármacos testados, apenas a doxorubicina apresentou uma CMI < 20 µM, o que de acordo com outros estudos (92) sugere que este composto poderá ser um potencial agente antimicrobiano. Os restantes fármacos que apresentaram uma CMI ≥ 20 µM, não foram excluídos e continuou-se o seu estudo como possíveis adjuvantes da ação de antibióticos. Os fármacos que promoveram a redução da CMI de antibióticos na estirpe ATCC 49226 foram selecionados para ensaios equivalentes num painel

de 10 estirpes clínicas. Por fim, avaliou-se a capacidade de todos os fármacos estudados para inibir atividade de efluxo de *N. gonorrhoeae* através de ensaios de acumulação de brometo de etídio.

Nos parágrafos seguintes, discutir-se-ão os resultados da avaliação *in vitro* obtidos para cada um dos fármacos testados.

4.2.1 Acetazolamida

Este fármaco é utilizado no tratamento de edema, epilepsia centroencefálica e do glaucoma e atua ao nível das anidrases carbônicas (ACs) que têm como função a hidratação do dióxido de carbono (CO_2) para bicarbonato e prótons (íons H^+) gerando uma base fraca e um ácido muito forte. Esta reação é crucial para vários processos fisiológicos constituindo a base para a regulação do pH na maioria dos organismos, está também associada a outros processos como o metabolismo, a adaptação do organismo a vários nichos e, no caso dos organismos patogênicos, atua também como fator de virulência. Foram já descritas oito famílias de AC: α -, β -, γ -, δ -, ζ -, η , θ , e ι -CA sendo que as bactérias codificam as α , β , γ e ι -AC e *N. gonorrhoeae*, em particular codifica a AC α . Dos vários mecanismos de ligação e inibição das ACs, a acetazolamida liga-se ao íon Zn (II) do local ativo da AC, inibindo esta enzima e, consequentemente, todos os processos fisiológicos associados (103) (104). Neste trabalho, a acetazolamida apresentou efeito tanto na estirpe *N. gonorrhoeae* ATCC 49226 como em alguns isolados clínicos quando conseguiu reduzir significativamente ($\geq 4\times$) a CMI de vários antibióticos. No entanto, a CMI da acetazolamida foi elevada para a maioria das estirpes estudadas (concentrações entre 128 e $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$). Apenas se observou um valor mais baixo ($32 \mu\text{g/mL}$) nos isolados clínicos 10042 e 11530. Um estudo realizado por Nafi *et al.* (95) também demonstrou uma grande variabilidade nas CMIs da acetazolamida (entre 20 e $80 \mu\text{g/mL}$) para diferentes estirpes de *N. gonorrhoeae* ATCC (95). Estes autores também demonstraram que estas estirpes de *N. gonorrhoeae* possuíam ACs ativas. Em contraste, estudos realizados com outros gêneros de bactérias, sem atividade detectável das suas ACs, revelaram que a acetazolamida não inibiu o crescimento das bactérias, o que demonstra que a atividade deste composto depende da existência das ACs (105)(106).

Assim, hipóteses possíveis para os resultados obtidos podem ser as seguintes: (i) os valores mais elevados de CMI podem resultar de mecanismos de sobre-expressão de ACs, levando à necessidade de maiores concentrações do fármaco para se conseguir inibir o crescimento das bactérias (ii) atividade reduzida das ACs que, deste modo, não são inibidas pelo fármaco (iii) baixa permeabilidade das estirpes em estudo para este fármaco, não permitindo a sua entrada nas células (iv) atividade de efluxo responsável por expulsar o composto das células impedindo que este atue nas AC's.

No entanto, a acetazolamida conseguiu reduzir as CMI's da azitromicina, penicilina e gentamicina na estirpe de referência e em alguns isolados clínicos. Em particular, é importante destacar que na estirpe de referência e no isolado 11693, que apresentaram respetivamente uma CMI de 0,25 e 0,5 µg/mL para a penicilina (perfil de “suscetível, exposição aumentada”), a combinação com acetazolamida permitiu a redução da CMI para $\leq 0,06$ µg/mL, o que corresponde um perfil de “suscetível” de acordo com as “guidelines” do EUCAST (85). É de realçar que a penicilina é um fármaco histórico no tratamento destas infeções, tendo sido posteriormente abandonada devido às resistências que emergiram. Também o efeito na azitromicina é muito importante uma vez que este é um dos fármacos de categoria I utilizados, atualmente, no tratamento de infeções por *N. gonorrhoeae* (107). Recentemente, demonstrou-se que derivados da acetazolamida apresentaram CMI's 8 a 16× mais baixas que a da acetazolamida contra *N. gonorrhoeae* (108). Assim, os estudos acima citados reforçam os resultados obtidos neste trabalho e demonstram que a acetazolamida é um composto claramente promissor para o desenvolvimento de futuros fármacos eficazes contra estirpes de *N. gonorrhoeae* resistentes aos antibióticos.

4.2.2 Atovaquone

O atovaquone é um parasiticida usado no tratamento da malária e da pneumocistose que inibe seletivamente o transporte de eletrões através do complexo *bc1* do citocromo mitocondrial do parasita e colapsa o potencial da membrana mitocondrial. *N. gonorrhoeae* possui, na sua membrana interna, um sistema de transporte de eletrões a partir do complexo citocromo *bc1* para o terminal da oxidase citocromo *cbb3* que é essencial para a síntese de ATP (109) (110) (111). Desta forma, é expectável que o atovaquone atue também no complexo *bc1* de *N. gonorrhoeae*, uma vez que o alvo preditivo neste trabalho é o citocromo B no qual se inclui o complexo *bc1*, inibindo assim o crescimento das bactérias. De facto, este fármaco apresentou valores de CMI mais baixos que a acetazolamida (8-32 µg/mL) tanto na estirpe de referência como na maioria dos isolados clínicos. Este fármaco permitiu também reduzir significativamente a CMI da gentamicina e da canamicina na estirpe de referência e a CMI da canamicina no isolado 11693. Tal como se verificou com a acetazolamida, é importante realçar o efeito do atovaquone na redução da CMI da azitromicina devido à importância deste fármaco no tratamento atual da gonorreia.

Um estudo de reposicionamento de fármacos realizado na área do cancro identificou também o atovaquone como fármaco promissor para inibir o complexo *bc1* do citocromo de células tumorais, de forma a prevenir a expansão das “Cancer Stem-like Cells” e do crescimento do tumor (112). No entanto, demonstrou-se que o atovaquone, apesar de ser um composto efetivo, não é apropriado para regimes de monoterapia devido ao risco elevado de desenvolvimento de resistências. De facto, no caso do tratamento da malária, este fármaco é administrado em combinação com proguanil (109). Assim, apesar

dos resultados promissores que este fármaco apresentou neste trabalho, poderá ser relevante avaliar o risco de aquisição de resistências em *N. gonorrhoeae* e ponderar a sua utilização apenas em regimes de terapia combinada.

4.2.3 Dequalinio

O dequalinio é um antisséptico e antimicrobiano que atua em bactérias de coloração Gram positiva e negativa, leveduras e protozoários, causando o aumento da permeabilidade celular com subsequente perda da atividade enzimática. Atua também ao nível das proteínas e ácidos nucleicos causando a desnaturação das proteínas, a paragem da síntese proteica nos ribossomas e a precipitação do ácido nucleico. Devido aos múltiplos modos de ação deste fármaco, pensa-se que o desenvolvimento de resistência será pouco provável (113). Assim, devido à sua ação antimicrobiana, seria de esperar que este fármaco conseguisse inibir o crescimento de *N. gonorrhoeae*. De facto, para a maioria das estirpes testadas, o dequalinio apresentou valores de CMI baixas (entre 1 e 8 µg/mL), exceto para os isolados clínicos 12245 e 12316 (64 µg/mL). Isto é particularmente importante para as estirpes mais resistentes, pois mesmo que estas apresentem resistência a um ou vários dos mecanismos de ação do dequalinio, a inibição do crescimento bacteriano pode na mesma ser atingida através de um dos outros mecanismos disponíveis. Num trabalho realizado por Mohsen *et al.* o dequalinio apresentou também valores de CMI iguais ou inferiores a 16 µg/mL para as duas estirpes em estudo (93), o que reforça os resultados obtidos neste trabalho. No entanto, não se observou efeito do dequalinio na CMI de nenhum dos antibióticos testados. É possível que isto se deva ao facto de o dequalinio ser substrato de bombas de efluxo, e de o alvo preditivo do fármaco neste estudo ser precisamente uma bomba de efluxo de membrana (93). Desta forma, o composto poderá ser expulso das células não atingindo a concentração necessária para se observar um efeito na CMI do antibiótico. Apesar disso, dado que o dequalinio foi, dos fármacos testados, aquele que apresentou os valores de CMI mais baixos, seria interessante continuar a estudá-lo, nomeadamente para esclarecer o seu modo de ação em *N. gonorrhoeae* e, eventualmente, para desenvolver derivados que apresentem menor afinidade para as bombas de efluxo e que possuam maior efeito adjuvante na atividade dos antibióticos utilizados no tratamento destas infeções.

4.2.4 Doxorrubicina

A doxorrubicina é um fármaco utilizado no tratamento do cancro que atua intercalando-se nos pares de bases do ADN, causando a quebra das cadeias de ADN e a inibição tanto da síntese de ADN como de ARN (114). Desta forma, poderíamos também assumir que a doxorrubicina consegue intercalar-se no ADN bacteriano, inibindo *N. gonorrhoeae*. No entanto, neste trabalho, o alvo preditivo da doxorrubicina

é a NADH desidrogenase. A ação deste fármaco na desidrogenase é responsável no corpo humano por potenciar a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) que contribuem para os efeitos secundários cardiotóxicos da doxorubicina. Estas ROS podem então causar stress oxidativo na bactéria e levar à sua morte (115). Assim, podemos também assumir que este possa ser um dos mecanismos de ação da doxorubicina em *N. gonorrhoeae*, responsável pelos resultados obtidos neste trabalho. De facto, a doxorubicina apresentou valores de CMI baixos (2 a 8 µg/mL) na maioria das estirpes em estudo e mais elevadas nos isolados 12245 e 12316 (>64 µg/mL). Além disso, a doxorubicina reduziu significativamente a CMI da penicilina, gentamicina, tetraciclina e azitromicina na estirpe de referência ATCC 49226. Em particular, observou-se um efeito semelhante ao obtido com a acetazolamida, em que a redução da CMI (de 0,5 µg/mL para $\leq 0,06$ µg/mL) da penicilina na presença de doxorubicina correspondeu à passagem do perfil de “suscetível, exposição aumentada” para suscetível, de acordo com as “guidelines” do EUCAST (85). Além disso, a combinação doxorubicina e penicilina foi a única que apresentou uma interação sinérgica ($FICI \leq 0,50$). Estes resultados preliminares indicam que a doxorubicina apresenta características promissoras que podem ser exploradas em estudos futuros para o tratamento de *N. gonorrhoeae*. No entanto, é importante realçar que este fármaco pode produzir efeitos secundários graves, nomeadamente, efeitos cardiotóxicos. De facto, a doxorubicina surgiu em 1939 como antibiótico, mas devido à sua elevada toxicidade a sua utilização apenas foi implementada em 1960, quando se descobriu as suas propriedades antitumorais (116) (117). Mais tarde, constatou-se que a encapsulação do fármaco em lipossomas pode reduzir os seus efeitos tóxicos sem diminuir a sua eficácia (118). Assim, desenvolveram-se outros estudos que exploraram o uso da doxorubicina no tratamento de doenças infecciosas. Um deles pretendia utilizar a doxorubicina para o tratamento da leishmaniose visceral recorrendo precisamente à encapsulação do fármaco em lipossomas como forma de tratamento. De facto, demonstrou-se que a doxorubicina possuía uma elevada atividade contra a leishmaniose, uma importante doença causada por parasitas protozoários (117). Um estudo recente testou vários compostos contra o SARS-CoV-2 (COVID-19) sendo que a doxorubicina foi o fármaco que apresentou maior interação com a proteína “Spike” do vírus indicando que a mesma pode inibir a proteína viral e, consequentemente, evitar o acesso do vírus às células hospedeiras (118).

Os resultados apresentados nesta dissertação, bem como os estudos anteriormente descritos, demonstram o potencial da doxorubicina enquanto antimicrobiano para o tratamento de infeções e o uso deste fármaco para o tratamento de *N. gonorrhoeae* como uma hipótese a ser explorada no futuro. Contudo, é importante ter em conta os efeitos tóxicos severos deste fármaco e, portanto, tentar reduzir essa toxicidade, por exemplo recorrendo a tecnologia de nanopartículas, ou através da criação de derivados que consigam minimizar esses efeitos secundários sem, no entanto, comprometer a eficácia do fármaco.

4.2.5 Amlodipina

A amlodipina é um vasodilatador que atua nos canais de cálcio reduzindo a pressão arterial, levando ao relaxamento do músculo liso com consequente vasodilatação (119).

Neste trabalho, os alvos preditivos da amlodipina são as AC e não os canais de cálcio. No entanto, um estudo realizado por Puscas *et al.* chegou à conclusão de que este fármaco era também um forte inibidor da AC I em humanos. Assim, este estudo concluiu que a amlodipina poderia ter uma dupla ação: o primeiro mecanismo consistia na sua ação ao nível dos canais de cálcio (como já se sabia) e o segundo mecanismo (proposto nesse trabalho) consistia em inibir a AC I presente no músculo liso (120). A possível ação da amlodipina nas ACs pode então ajudar a explicar os resultados obtidos neste trabalho se assumirmos que, uma vez que este fármaco atua nas ACs humanas, também o possa fazer nas de *N. gonorrhoeae*. De facto, este fármaco apresentou valores de CMI relativamente baixos na estirpe de referência e na maioria dos isolados clínicos (8 a 64 µg/mL) e mais elevados nos isolados XDR 12245 e 12316 (256 µg/mL). Além disso, este fármaco conseguiu reduzir significativamente a CMI da canamicina na estirpe de referência e também nos isolados clínicos XDR 12245 e 12316. Assim, este efeito inibitório poderá ser resultado da ação da amlodipina nas ACs de *N. gonorrhoeae*. No entanto, os dois isolados clínicos XDR apresentaram, como referido, CMIs mais elevadas. Desta forma, e como já proposto para outros fármacos, poder-se-ão desenvolver derivados da amlodipina com uma afinidade e potência maiores para as ACs de *N. gonorrhoeae* de forma a reduzir ainda mais as concentrações necessárias para inibir o crescimento da bactéria, principalmente nas estirpes MDR e XDR. Além disso, estes derivados poderão também permitir um efeito adjuvante com outros antibióticos para além da canamicina.

4.2.6 Clomipramina

Este fármaco é utilizado no tratamento do transtorno obsessivo-compulsivo. Este fármaco inibe a recaptção de serotonina devido a uma forte afinidade para o seu transportador. Isto resulta num aumento da transmissão serotoninérgica, potencializando os seus efeitos (121). Neste trabalho, o alvo preditivo da clomipramina em *N. gonorrhoeae* são também dois transportadores (NGFG_01564 e NGFG_01192), mas estes não estão totalmente caracterizados. Tal como na amlodipina, este fármaco apresentou valores de CMI entre 8 e 32 µg/mL na maioria das estirpes e mais elevados nos isolados 12245 e 12316 (128 e 256 µg/mL, respetivamente). Pode-se propor que, apesar de se desconhecer qual o papel dos transportadores alvo deste fármaco em *N. gonorrhoeae*, estes poderão desempenhar uma função importante para a bactéria, tal como o transportador de serotonina em humanos, e que a sua inibição tenha impacto na viabilidade de *N. gonorrhoeae*.

Estudos demonstraram que a clomipramina produz uma interação de sinergia quando em combinação com outros antibióticos, como por exemplo a tetraciclina em *Staphylococcus epidermidis*. No entanto, esse mesmo estudo demonstrou que este fármaco não produziu efeito em *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (122), o que está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho em que não ocorreu efeito da clomipramina na CMI de antibióticos em *N. gonorrhoeae*. Apesar disso, este fármaco demonstrou, neste trabalho, alguns resultados interessantes para potencial uso em monoterapia devido aos valores baixos de CMIs. Adicionalmente, devido às evidências na literatura de que a clomipramina poderá ser adjuvante da ação de antibióticos em algumas espécies bacterianas, talvez seja possível melhorá-la de forma a torná-la mais ativa em *N. gonorrhoeae* e com capacidade de produzir sinergia com a ação de antibióticos. Entender qual ou qual(is) os transportadores(es) alvo da clomipramina em *N. gonorrhoeae* pode ajudar a atingir esses objetivos.

4.2.7 Metformina

A metformina é o fármaco de primeira linha para o tratamento da diabetes tipo 2 devido ao seu efeito na redução dos níveis de glucose no sangue, perfil de segurança bem estabelecido e custo relativamente baixo. Esta diminuição dos níveis de glicose é mediada, principalmente, pela inibição da gliconeogênese hepática (123). Desde 2005, que a metformina tem vindo a ser estudada em vários trabalhos de reposicionamento de fármacos para o tratamento do cancro, doenças cardíacas e renais, entre outras, com alguns resultados promissores (124) (125) (126). No entanto, de todos os fármacos testados neste trabalho, a metformina foi aquela que apresentou os piores resultados de atividade *in vitro* contra *N. gonorrhoeae*. A CMI para este fármaco foi superior a 1024 µg/mL para a estirpe de referência e todos os isolados clínicos estudados e não teve nenhum efeito significativo na CMI de nenhum dos antibióticos testados. Este fármaco foi selecionado pela análise realizada na ConSurf, o que significa que o alvo preditivo deste fármaco em *N. gonorrhoeae* tinha uma homologia igual ou superior a 60% com o seu alvo homólogo, e que, portanto, haveria uma maior probabilidade de o fármaco manter a afinidade pelo alvo em *N. gonorrhoeae*. No entanto, a atividade *in vitro* de um fármaco depende de outros fatores tais como baixa permeabilidade, atividade de bombas de efluxo, menor afinidade para o seu alvo, que podem assim ter contribuído para a ausência de efeito da metformina verificada neste trabalho.

4.2.8 Topiramato

O Topiramato é um antiepiléptico utilizado em monoterapia ou como adjuvante no tratamento de doentes com epilepsia e enxaquecas. Este fármaco atua bloqueando os canais de sódio dependentes de voltagem, o que provavelmente leva ao controlo das despolarizações durante uma convulsão. O topiramato

aumenta também a atividade do recetor GABAA, o que aumenta os seus efeitos inibitórios (127) (128). Existem evidências de que este fármaco é um fraco inibidor das ACs, apesar de possuir uma estrutura semelhante às mesmas, e de desempenhar um papel pouco claro ao nível das ACs na prevenção de enxaquecas (128) (129). Este facto é importante para este trabalho, pois a CMI do topiramato foi elevada para todas as estirpes ($\geq 512 \mu\text{g/mL}$, exceto para a estirpe de referência e o isolado 11530 onde a CMI foi de $128 \mu\text{g/mL}$). Adicionalmente, não se observou efeito do topiramato nas CMI dos antibióticos testados em nenhuma das estirpes. Estes resultados poderão ser explicados precisamente pelo facto do topiramato ser um fraco inibidor das ACs, alvos preditivos deste composto em *N. gonorrhoeae* pela análise *in silico* (101, 102). Desta forma, o topiramato poderá não ser a melhor solução no tratamento de infeções por *N. gonorrhoeae*, a não ser que se desenvolvam derivados deste composto com maior afinidade para as ACs e, portanto, com maior atividade potencial contra *N. gonorrhoeae*.

4.2.9 Sulpirida

A sulpirida é um antipsicótico antagonista seletivo da dopamina D2 e D3 usado no tratamento da esquizofrenia, neurose e depressão (130). Tal como a metformina, este fármaco apresentou valores de CMI elevados em todas as estirpes ($256 \mu\text{g/mL}$ na estirpe de referência e $\geq 512 \mu\text{g/mL}$ nos isolados clínicos). No entanto, a sulpirida reduziu significativamente a CMI da canamicina na estirpe de referência. Estes resultados sugerem que a sulpirida não é indicada para uso em regime de monoterapia, mas que o seu efeito adjuvante da ação de antibióticos pode ser explorado para a criação de derivados da sulpirida mais indicados para uma possível terapia combinada.

Além do seu uso no tratamento das doenças acima descritas pouco mais se sabe sobre outras utilidades da sulpirida para além do possível reposicionamento para o tratamento do cancro (131) e, portanto, mais estudos serão necessários de forma a obter mais dados sobre as potenciais utilidades deste fármaco.

4.2.10 Tiabendazol

O tiabendazol é um parasiticida cujo mecanismo de ação ainda não é totalmente conhecido. No entanto, sabe-se que atua ao nível da fumarato redutase (FR), inibindo a produção de ATP (132). O alvo preditivo do tiabendazol em *N. gonorrhoeae*, identificado neste trabalho, foi a succinato desidrogenase (SD). Um estudo realizado por Armson *et al.* sobre o efeito deste fármaco na FR e na SD em *Strongyloides ratti* (parasita gastro intestinal) mostrou que a FR era mais sensível à inibição pelo tiabendazol do que a SD (133). A menor sensibilidade da SD ao tiabendazol pode explicar o facto de que, neste trabalho, todas as estirpes apresentarem valores de CMI elevadas ($\geq 128 \mu\text{g/mL}$), exceto a estirpe de referência (32

µg/mL). Isto significa que o efeito inibitório originado pela ação do tiabendazol neste alvo em *N. gonorrhoeae* é baixo. Outras razões para explicar os resultados aqui obtidos podem ser a baixa permeabilidade das células a este fármaco, o efluxo do mesmo para o exterior das células ou a sua degradação enzimática. No entanto, sabendo que o efeito do tiabendazol na FR é superior ao seu efeito na SD uma hipótese seria sintetizar derivados com maior afinidade para a FR de *N. gonorrhoeae* e, assim, aumentar a suscetibilidade da bactéria a este fármaco.

4.2.11 Benzotiazida

A benzotiazida é um anti-hipertensivo cuja ação se julga ser exercida através do seu efeito nas ACs no músculo liso ou por ação nos canais de potássio ativados por cálcio (134). Na análise *in silico*, o alvo preditivo da benzotiazida em *N. gonorrhoeae* são as ACs. Assim, é surpreendente que os valores de CMI da benzotiazida neste trabalho tenham sido elevadas na maioria das estirpes (≥ 128 µg/mL) e sem se observar efeito deste composto na redução da CMI em nenhum dos antibióticos testados. Algumas explicações para estes resultados poderão ser degradação enzimática do fármaco, baixa permeabilidade da parede celular das bactérias que limita a entrada do composto, atividade de efluxo ou baixa afinidade para o alvo em *N. gonorrhoeae*.

4.2.12 Verapamil, tioridazina e clorpromazina

O verapamil é um antiarrítmico que inibe os canais de cálcio do tipo L no músculo liso vascular e do miocárdio. A tioridazina é um antipsicótico que bloqueia os recetores de dopamina D1 e D2 no cérebro. A clorpromazina é um antipsicótico que atua num conjunto variado de recetores no cérebro (135) (136) (137). Estes fármacos, apesar de não terem sido selecionados após a análise dos domínios funcionais pela ConSurf, foram incluídos na fase laboratorial deste trabalho por serem fármacos classicamente utilizados como inibidores do metabolismo energético e de bombas de efluxo em outras bactérias tais como *E. coli*, *S. aureus* e *Mycobacterium tuberculosis* (49) (50) (51) (138) (139) (87) (88).

Neste trabalho, a tioridazina e a clorpromazina apresentaram valores de CMI baixas na maioria das estirpes (2 a 64 µg/mL para a tioridazina e 8 a 64 µg/mL para a clorpromazina). No entanto, observaram-se valores de CMI mais elevados (128 µg/mL) para a clorpromazina em três isolados clínicos (11693, 12245 e 12316). Assim, podemos concluir que apesar de um fármaco não ser selecionado na análise de domínios funcionais por se encontrar associado a um alvo homólogo com semelhança inferior a 60% ao alvo em *N. gonorrhoeae*, não impede que esse fármaco seja capaz de produzir um efeito inibitório no organismo em estudo. Isso pode acontecer porque, por exemplo, o fármaco pode ter mais do que um

alvo em *N. gonorrhoeae* e aquele que foi identificado pela análise *in silico* pode não ser o alvo principal. Por outro lado, o verapamil apresentou CMI's entre 64 e ≥ 512 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando assim um efeito inibitório mais reduzido. Este composto teve efeito na redução da CMI do brometo de etídio na estirpe de referência *N. gonorrhoeae* ATCC 49226, o que sugere inibição da atividade de efluxo. No entanto, nenhum destes três fármacos apresentou efeito na redução de CMI para nenhum dos antibióticos testados, ao contrário do que se encontra descrito para outras espécies bacterianas (87) (88) (49) (50). No futuro, serão necessários mais estudos para esclarecer se estes compostos ou os seus derivados terão potencial como agentes antimicrobianos ou como adjuvantes da ação de antibióticos no tratamento de infecções por *N. gonorrhoeae*.

5 Conclusão

N. gonorrhoeae é cada vez mais uma preocupação global devido ao elevado número de infeções que causa anualmente. Em 2016, foram detetados quase 87 milhões de novos casos no mundo e, em 2018, cerca de 100 mil casos na Europa, segundo o ECDC. Estes números serão, certamente, superiores na realidade uma vez que, principalmente em países pobres e com poucos recursos, a doença não é notificada ou detetada devido à ausência de métodos de diagnóstico apropriados (6).

Uma vez que ainda não existe vacinação, o controlo desta doença passa pela existência de medidas preventivas, vigilância epidemiológica e pela utilização de uma terapêutica antimicrobiana eficiente. No entanto, *N. gonorrhoeae* tem apresentado uma capacidade muito grande ao longo dos tempos para a aquisição de resistências aos fármacos introduzidos no seu tratamento. Desta forma, e de acordo com o recomendado pela OMS, o tratamento atual é limitado a três fármacos - ceftriaxona ou cefixima e azitromicina - para os quais também têm vindo a haver aumentos nos seus valores de CMI, com relatos de estirpes XDR (H041) e falhas de tratamento a ocorrer em alguns países (24) (140) (141) (142) (143) (144).

Em Portugal, como no resto do mundo, o número de casos também tem vindo a aumentar e, em 2018, foram registados 2190 casos de acordo com dados do site do Ministério da Saúde (<https://transparencia.sns.gov.pt/>) (145).

Desta forma, a procura por novas opções terapêuticas é cada vez mais urgente, mas o processo de desenvolvimento de um novo fármaco demora geralmente entre 11 e 16 anos e, muitas vezes, não resulta em nenhum que seja aceite pelas entidades reguladoras e, conseqüentemente, comercializado.

Assim, surgiram novas estratégias de desenvolvimento de fármacos, nomeadamente o reposicionamento *in silico* que permite poupar tempo e recursos do processo de desenvolvimento e comercialização de novos fármacos, pois este processo foca-se na descoberta de novas aplicações de fármacos já aprovados para uso humano. Deste modo, é possível reduzir o tempo necessário em algumas etapas do processo clássico de descoberta de novos fármacos, como por exemplo a etapa inicial da pesquisa de novos compostos que pode demorar até cinco anos.

Foi precisamente esta a técnica utilizada neste trabalho e que permitiu no espaço de um ano criar uma lista de potenciais novos fármacos para o tratamento da gonorreia e testá-los *in vitro*. No total obtiveram-se 681 fármacos que poderiam atuar num conjunto variado de alvos preditivos em *N. gonorrhoeae* e que, portanto, eram candidatos a validação laboratorial. No entanto, por razões de tempo, dinheiro e recursos humanos foi impossível testar um volume tão grande de compostos que assim, tiveram de ser submetidos a alguns passos de triagem para se obter uma lista mais pequena e possível de ser trabalhada nesta dissertação. Com essa triagem reduzimos a lista inicial a 11 fármacos que foram posteriormente

avaliados *in vitro* para a sua capacidade de inibir várias estirpes de *N. gonorrhoeae*. Obtiveram-se resultados promissores, principalmente com o atovaquone, a doxorubicina, a acetazolamida, o dequalinio, a clomipramina e a amlodipina. Assim, foi possível propor, com este trabalho, novos fármacos com potencialidade para originar futuras opções terapêuticas para o tratamento da gonorreia.

No entanto, é importante ter em conta que o ideal seria sempre testar os 681 fármacos obtidos inicialmente, porque existe o risco de os critérios definidos durante o processo de análise *in silico* terem excluído alguns fármacos que poderiam ser bastante promissores para os objetivos deste trabalho. A prova disso mesmo é o facto de que fármacos como a tioridazina e a clorpromazina, que foram excluídos nos passos de triagem, terem apresentado capacidade de inibir o crescimento *N. gonorrhoeae*. Por isso, é importante não só continuar a estudar aqueles fármacos que deram resultados mais promissores nos testes laboratoriais como analisar os 670 que foram excluídos ao longo dos diferentes passos de análise, de forma a perceber se algum deles apresenta também propriedades interessantes no que toca à sua capacidade de inibição desta bactéria.

Além disso, mesmo para os fármacos testados que deram resultados promissores, são ainda necessários trabalhos futuros para caracterizar com mais detalhe a atividade destes compostos em *N. gonorrhoeae*. Por exemplo, é necessário efetuar a validação molecular dos alvos identificados em *N. gonorrhoeae*, pois, apesar deste trabalho nos ter fornecido um conjunto de fármacos associados a várias proteínas homólogas às de *N. gonorrhoeae*, esses alvos são apenas preditivos e, portanto, mesmo que o fármaco demonstre capacidade de inibir a bactéria, nada garante que essa inibição seja por ação do fármaco no alvo identificado e não em outro alvo para o qual ele também possa ter afinidade.

É ainda importante realçar que este estudo apenas testou os fármacos *in vitro* e que o tratamento de uma infeção no organismo humano é muito mais complexo, uma vez que o fármaco precisa de ultrapassar um conjunto de barreiras no organismo para, dentro do corpo, conseguir atingir o seu alvo. Assim, é também necessário realizar ensaios *ex vivo* e *in vivo* como, por exemplo, ensaios de toxicidade, para garantir que os fármacos selecionados não apresentam efeitos adversos severos que os excluam da lista de possíveis opções terapêuticas. Adicionalmente, ensaios de biodisponibilidade também podem ser necessários. A biodisponibilidade refere-se à extensão e à velocidade com que um fármaco, na sua forma inalterada, entra na circulação sistémica alcançando assim o seu local de ação. Esta depende de fatores como a absorção e a entrada na circulação. Alguns fármacos podem falhar nestes testes se não demonstrarem capacidade de chegar ao seu local de ação nas concentrações necessárias para se atingir a cura do doente.

Em conclusão, este trabalho identificou compostos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de infeções por *N. gonorrhoeae*. No entanto, serão necessários estudos adicionais a este projeto piloto, como os acima mencionados e quaisquer outros que possam ser

necessários, para avançar no processo de desenvolvimento de novos antimicrobianos para o tratamento destas infecções.

Espera-se que este estudo exploratório possa contribuir de forma importante para a tão necessária busca por novos tratamentos para a gonorreia, em particular fármacos que possam ser utilizados como inibidores de bombas de efluxo e prevenir o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos em *N. gonorrhoeae*. No futuro, a estratégia de reposicionamento *in silico* de fármacos utilizada neste trabalho poderá ser a base para o desenvolvimento de um novo paradigma de desenvolvimento de medicamentos que permita aumentar a probabilidade de identificação de fármacos eficazes e, assim, contribuir para a luta contra *N. gonorrhoeae* MDR e XDR.

6 Referências

1. Morse S. 1996. Medical Microbiology, 4^a ed. , Baron S, Galveston.
2. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. 2021. Medical Microbiology, 9^a ed. , Elsevier, Lisboa, **9**:241-250 .
3. Duarte A, Martins Pereira F. 2014. Microbiologia Médica, ed. 2014, Lidel, Lisboa.
4. Unemo M, Seifert HS, Hook EW, *et. al.* 2019. Gonorrhoea. Nature Reviews Disease Primers **5**, 79.
5. Rotman E, Seifert HS. 2014. The genetics of *Neisseria* species. Annual Review of Genetics, **48**:405-431.
6. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2020. Gonorrhoea: Annual Epidemiological Report for 2017. Stockholm: ECDC; 2019.
7. Kirkcaldy RD, Weston E, Segurado AC, Hughes G. 2019. Epidemiology of gonorrhoea: A global perspective. Sex Health, **16**:401-411.
8. Centers for Disease Control and Prevention. 2021. National Overview - Sexually Transmitted Disease Surveillance, 2019. US Department of Health and Human Services,.
9. Unemo M, Shafer WM. 2014. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st Century: Past, evolution, and future. Clinical Microbiology Reviews, **27**:587–613.
10. Meyer T, Buder S. 2020. The laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*: Current testing and future demands. Pathogens. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, **9**(2):91
11. Papp JR, Schachter J, Gaydos CA, Van Der Pol B. 2014. Recommendations for the laboratory-based detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. MMWR Recomm Reports, **63**:1-19.
12. Papp JR, Schachter J, Gaydos CA, Van Der Pol B. 2014. Morbidity and Mortality Weekly Report Recommendations for the Laboratory-Based Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. Centers Dis Control Prev Morb Mortal Wkly Rep, **63**:1–19.
13. Thorley N, Radcliffe K. 2015. The performance and clinical utility of cervical microscopy for the diagnosis of gonorrhoea in women in the era of the NAAT. International Journal of STD & AIDS, **26**:656–660.

14. Ison CA. 1990. Methods of diagnosing gonorrhoea. *Genitourinary Medicine*, **66(6)**: 453–459.
15. World Health Organization. 2003. Sexually Transmitted Bacterial Pathogen for which there are Increasing Antimicrobial Resistance Concerns. *Man Identif Antimicrob Susceptibility Test*, 62–102.
16. Young H, Paterson IC, McDonald DR. 1976. Rapid carbohydrate utilization test for the identification of *Neisseria gonorrhoeae*. *British Journal of Venereal Diseases*, **52**:172–175.
17. Alexander S, Ison C. 2005. Evaluation of commercial kits for the identification of *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Medical Microbiology*, **54**:827–831.
18. Papp JR, Schachter J, Gaydos CA, Van Der Pol B. 2014. Recommendations for the Laboratory-Based Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *MMWR Recomm Rep*, **63**:1-19.
19. Unemo M, et al. 2013. Gonorrhoeae. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus, OMS, Geneva.
20. Enriquez RP, Goire N, Kundu R, Gatus BJ, Lahra MM. 2016. A comparison of agar dilution with the Calibrated Dichotomous Sensitivity (CDS) and Etest methods for determining the minimum inhibitory concentration of ceftriaxone against *Neisseria gonorrhoeae*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **86**:40–43.
21. Singh V, Bala M, Kakran M, Ramesh V. 2012. Comparative assessment of CDS, CLSI disc diffusion and Etest techniques for antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae*: A 6-year study. *BMJ Open*, **2**:e000969.
22. Papp JR, Rowlinson MC, O'Connor NP, Wholehan J, Razeq JH, Glennen A, Ware D, Iwen PC, Lee L V., Hagan C. 2018. Accuracy and reproducibility of the Etest to detect drugresistant *Neisseria gonorrhoeae* to contemporary treatment. *Journal of Medical Microbiology*, **67(1)**:68–73.
23. Deguchi T, Yasuda M, Hatazaki K, Kameyama K, Horie K, Kato T, Mizutani K, Seike K, Tsuchiya T, Yokoi S, Nakano M, Yoh M. 2016. New Clinical Strain of *Neisseria gonorrhoeae* with Decreased Susceptibility to Ceftriaxone, Japan. *Medical Microbiology and Immunology*, **22**:142–144.
24. WHO. 2016. WHO guidelines for the treatment of *Neisseria gonorrhoeae*, WHO, Geneva.
25. WHO. 2012. Global incidence and prevalence of selected sexually transmitted infections-2008, WHO, Geneva.

26. Młynarczyk-Bonikowska B, Majewska A, Malejczyk M, Młynarczyk G, Majewski S. 2020. Multiresistant *Neisseria gonorrhoeae*: a new threat in second decade of the XXI century. *Medical Microbiology and Immunology*, **209(2)**:95-108.
27. Lewis DA. 2010. The Gonococcus fights back: Is this time a knock out?. *Sexually Transmitted Infections*, **86(6)**:415-21.
28. Desjardins AU, Stuhler LG, Popp WC. 1935. Fever therapy for gonococcic infections. *The Journal of the American Medical Association*, **104**:873–878.
29. Bierman W, Levenson C. 1936. The treatment of gonorrheal arthritis by means of systemic and additional focal heating. *The American Journal of the Medical Sciences*, **191**:55–65.
30. Simmons EE. 1937. Value of fever therapy in the arthritides. *The American Journal of the Medical Sciences*, **194**:170–178.
31. Costa-Lourenço APR da, Barros dos Santos KT, Moreira BM, Fracalanza SEL, Bonelli RR. 2017. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: history, molecular mechanisms and epidemiological aspects of an emerging global threat. *Brazilian Journal of Microbiology*, **48(4)**: 617–628.
32. Hook EW, Kirkcaldy RD. 2018. A Brief History of Evolving Diagnostics and Therapy for Gonorrhea: Lessons Learned. *Clinical Infectious Diseases*, **67**:1294-1299.
33. Unemo M, del Rio C, Shafer WM. 2016. Antimicrobial Resistance Expressed by *Neisseria gonorrhoeae* : A Major Global Public Health Problem in the 21st Century. *Microbiology Spectrum*, **4(3)**:10.1128.
34. Galarza PG, Alcalá B, Salcedo C, Canigia LF, Buscemi L, Pagano I, Oviedo C, Vázquez JA. 2009. Emergence of High Level Azithromycin-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* Strain Isolated in Argentina. *Sexually Transmitted Diseases*, **36**:787–788.
35. European Centre for Disease Prevention and Control. 2018. Extensively drug-resistant (XDR) *Neisseria gonorrhoeae* in the United Kingdom and Australia-7 May 2018, Stockholm: ECDC.
36. Lewis DA. 2019. New treatment options for *Neisseria gonorrhoeae* in the era of emerging antimicrobial resistance. *Sex Health*, **16**:449-456.
37. Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. 2012. Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics , 12^a ed. , The McGraw-Hill Companies, New York.
38. Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. 2016. Aminoglycosides: An overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **6(6)**:a027029.

39. Warner DM, Folster JP, Shafer WM, Jerse AE. 2007. Regulation of the MtrC-MtrD-MtrE efflux-pump system modulates the in vivo fitness of *Neisseria gonorrhoeae*. The Journal of Infectious Diseases, **196**:1804–1812.
40. Rouquette-Loughlin C, Dunham SA, Kuhn M, Balthazar JT, Shafer WM. 2003. The NorM efflux pump of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* recognizes antimicrobial cationic compounds. Journal of Bacteriology, **185**:1101–1106.
41. Rouquette-Loughlin CE, Balthazar JT, Shafer WM. 2005. Characterization of the MacA-MacB efflux system in *Neisseria gonorrhoeae*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **56**:856–860.
42. Golparian D, Shafer WM, Ohnishi M, Unemo M. 2014. Importance of multidrug efflux pumps in the antimicrobial resistance property of clinical multidrug-resistant isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **58**:3556–3559.
43. Hagman KE, Shafer WM. 1995. Transcriptional control of the mtr efflux system of *Neisseria gonorrhoeae*. Journal of Bacteriology, **177**(14):4162-5.
44. Zalucki YM, Dhulipala V, Shafer WM. 2012. Dueling regulatory properties of a transcriptional activator (MtrA) and repressor (MtrR) that control efflux pump gene expression in *Neisseria gonorrhoeae*. mBio, **3**(6):e00446-12.
45. Ohnishi M, Golparian D, Shimuta K, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, Nakayama SI, Kitawaki J, Unemo M. 2011. Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhea?: Detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **55**:3538–3545.
46. Chen S, Connolly KL, Rouquette-Loughlin C, Andrea AD, Jerse AE, Shafer WM. 2019. Could dampening expression of the *Neisseria gonorrhoeae* mtrcde-encoded efflux pump be a strategy to preserve currently or resurrect formerly used antibiotics to treat gonorrhea? MBio, **10**(4):e01576-19.
47. Lomovskaya O, Bostian KA. 2006. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic - A vision for applied use. Biochemical Pharmacology, **71**:910–918.
48. Black PA, Warren RM, Louw GE, van Helden PD, Victor TC, Kana BD. 2014. Energy Metabolism and Drug Efflux in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **58**:2491–2503.
49. Gupta S, Cohen KA, Winglee K, Maiga M, Diarra B, Bishai WR. 2014. Efflux inhibition with verapamil potentiates bedaquiline in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial Agents and

Chemotherapy, **58**:574–576.

50. Chen C, Gardete S, Jansen RS, Shetty A, Dick T, Rhee KY, Dartois V. 2018. Verapamil Targets Membrane Energetics in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **62**(5):e02107-17.
51. Martins M, Viveiros M, Kristiansen JE, Molnar J, Amaral L. 2007. The curative activity of thioridazine on mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *In Vivo*, **21**:771–5.
52. Mohs RC, Greig NH. 2017. Drug discovery and development: Role of basic biological research. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, **3**(4):651-657.
53. Matthews H, Hanison J, Nirmalan N. 2016. “Omics”-informed drug and biomarker discovery: Opportunities, challenges and future perspectives. *Proteomes*, **4**(3):28.
54. De Freitas LC. 2017. WHO (2017) Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *Cad Pesqui*, **43**:348–365.
55. Van Bambeke F, Tulkens PM. 2016. The role of solithromycin in the management of bacterial community-acquired pneumonia. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, **14**(3):311-24.
56. Llano-Sotelo B, Dunkle J, Klepacki D, Zhang W, Fernandes P, Cate JHD, Mankin AS. 2010. Binding and action of CEM-101, a new fluoroketolide antibiotic that inhibits protein synthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **54**:4961–4970.
57. Golparian D, Fernandes P, Ohnishi M, Jensen JS, Unemo M. 2012. In vitro activity of the new fluoroketolide solithromycin (CEM-101) against a large collection of clinical *Neisseria gonorrhoeae* isolates and international reference strains, including those with high-level antimicrobial resistance: Potential treatment option for gonorrhea?. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **56**:2739–2742.
58. Hook EW, Golden M, Jamieson BD, Dixon PB, Harbison HS, Lowens S, Fernandes P. 2015. A Phase 2 Trial of Oral Solithromycin 1200 mg or 1000 mg as Single-Dose Oral Therapy for Uncomplicated Gonorrhea. *Clinical Infectious Diseases*, **61**:1043–1048.
59. Chen MY, McNulty A, Avery A, Whiley D, Tabrizi SN, Hardy D, Das AF, Nenninger A, Fairley CK, Hocking JS, Bradshaw CS, Donovan B, Howden BP, Oldach D. 2019. Solithromycin versus ceftriaxone plus azithromycin for the treatment of uncomplicated genital gonorrhoea (SOLITAIRE-U): a randomised phase 3 non-inferiority trial. *The Lancet Infectious Diseases*, **19**:833–842.

60. Cempira Inc. 2016. Cempira Receives Complete Response Letter From FDA For Solithromycin NDAs. , GlobalNewsWire, .
61. O'Donnell J, Lawrence K, Vishwanathan K, Hosagrahara V, Mueller JP. 2019. Single-dose pharmacokinetics, excretion, and metabolism of zoliflodacin, a novel spiropyrimidinetrione antibiotic, in healthy volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **63(1)**:e01808-18.
62. Taylor SN, Marrazzo J, Batteiger BE, Hook EW, Seña AC, Long J, Wierzbicki MR, Kwak H, Johnson SM, Lawrence K, Mueller J. 2018. Single-Dose Zoliflodacin (ETX0914) for Treatment of Urogenital Gonorrhea. *New England Journal of Medicine*, **379**:1835–1845.
63. GARDP.2021.Thailand Activates First Site in Global Phase 3 Clinical Study of Zoliflodacin as a New Gonorrhoea Treatment. , GARDP, .
64. Farrell DJ, Sader HS, Rhomberg PR, Scangarella-Oman NE, Flamm RK. 2017. *In vitro* activity of gepotidacin (GSK2140944) against *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **61(3)**:e02047-16.
65. Biedenbach DJ, Bouchillon SK, Hackel M, Miller LA, Scangarella-Oman NE, Jakielaszek C, Sahm DF. 2016. *In vitro* activity of gepotidacin, a novel triazaacenaphthylene bacterial topoisomerase inhibitor, against a broad spectrum of bacterial pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **60**:1918–1923.
66. Scangarella-Oman NE, Hossain M, Dixon PB, Ingraham K, Min S, Tiffany CA, Perry CR, Raychaudhuri A, Dumont EF, Huang J, Hook EW, Miller LA. 2018. Microbiological analysis from a phase 2 randomized study in adults evaluating single oral doses of gepotidacin in the treatment of uncomplicated urogenital gonorrhea caused by *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **62(12)**:e01221-18.
67. Taylor SN, Morris DH, Avery AK, Workowski KA, Batteiger BE, Tiffany CA, Perry CR, Raychaudhuri A, Scangarella-Oman NE, Hossain M, Dumont EF. 2018. Gepotidacin for the treatment of uncomplicated urogenital gonorrhea: A phase 2, randomized, doseranging, single-oral dose evaluation. *Clinical Infectious Diseases*, **67**:504–512.
68. GlaxoSmithKline. 2019. GSK starts a phase III clinical programme for a potential first-in-class antibiotic, gepotidacin. , GSK, .
69. Neves BJ, Braga RC, Bezerra JCB, Cravo PVL, Andrade CH. 2015. In Silico Repositioning-Chemogenomics Strategy Identifies New Drugs with Potential Activity against Multiple Life Stages of *Schistosoma mansoni*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, **9(1)**:e3435.

70. Rao VS, Srinivas K. 2011. Modern drug discovery process: An *in silico* approach. *Journal of Bioinformatics and Sequence Analysis*, **2**:89–94.
71. Alhashimi M, Mayhoub A, Seleem MN. 2019. Repurposing salicylamide for combating multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **63**(12): e01225-19.
72. Seong YJ, Alhashimi M, Mayhoub A, Mohammad H, Seleem MN. 2020. Repurposing fenamic acid drugs to combat multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **64**(7):e02206-19.
73. Bispo NA, Culleton R, Silva LA, Cravo P. 2013. A Systematic In Silico Search for Target Similarity Identifies Several Approved Drugs with Potential Activity against the *Plasmodium falciparum* Apicoplast. *PLoS One*, **8**(3):e59288.
74. Tanabe M, Kanehisa M. 2012. Using the KEGG database resource. *Current Protocols in Bioinformatics*, **1**:Unit1.12.
75. UniProt Consortium. 2015. UniProt: A hub for protein information. *Nucleic Acids Research*, **43**:D204–D212.
76. Gyung TC, Jeong SY, Hee BO, Yeong SL, Sun HC, Sang JK, Cheon KY. 2008. Complete genome sequence of *Neisseria gonorrhoeae* NCCP11945. *Journal of Bacteriology*, **190**:6035–6036.
77. Snyder LA, Davies JK, Saunders NJ. 2004. Microarray genotyping of key experimental strains of *Neisseria gonorrhoeae* reveals gene complement diversity and five new neisserial genes associated with Minimal Mobile Elements. *BMC Genomics*, **5**(1):23.
78. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, Sajed T, Johnson D, Li C, Sayeeda Z, Assempour N, Iynkkaran I, Liu Y, Maciejewski A, Gale N, Wilson A, Chin L, Cummings R, Le D, Pon A, Knox C, Wilson M. 2018. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Research*, **46**(D1):D1074-D1082.
79. Szklarczyk D, Santos A, von Mering C, Jensen LJ, Bork P, Kuhn M. 2016. STITCH 5: augmenting protein–chemical interaction networks with tissue and affinity data. *Nucleic Acids Research*, **44**:D380–D384.
80. Kuhn M, Szklarczyk D, Pletscher-Frankild S, Blicher TH, Von Mering C, Jensen LJ, Bork P. 2014. STITCH 4: Integration of protein-chemical interactions with user data. *Nucleic Acids Research*, **42**:D401–D407.

81. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuik Y, McGinnis S, Madden TL. 2008. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research*, **36**:W5–W9.
82. Ashkenazy H, Abadi S, Martz E, Chay O, Mayrose I, Pupko T, Ben-Tal N. 2016. ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Research*, **44**:W344–W350.
83. Rodrigues L, Cravo P, Viveiros M. 2020. Efflux pump inhibitors as a promising adjunct therapy against drug resistant tuberculosis: a new strategy to revisit mycobacterial targets and repurpose old drugs. *Expert Rev Anti Infect Ther* 18.
84. Calado J, Castro R, Lopes Â, Campos MJ, Rocha M, Pereira F. 2019. Antimicrobial resistance and molecular characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from men who have sex with men. *International Journal of Infectious Diseases*, **79**:116-122.
85. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2021. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0. <http://www.eucast.org>.
86. Foerster S, Desilvestro V, Hathaway LJ, Althaus CL, Unemo M. 2017. A new rapid resazurin-based microdilution assay for antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherap*, **72**:1961–1968.
87. Tozar T, Santos Costa S, Udrea A-M, Nastasa V, Couto I, Viveiros M, Pascu ML, Romanitan MO. 2020. Anti-staphylococcal activity and mode of action of thioridazine photoproducts. *Scientific Reports*, **10**:18043.
88. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP. 2008. Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. *Chemotherapy*, **54**(4):328–330.
89. Odds FC. 2003. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **52**(1):1.
90. Viveiros M, Rodrigues L, Martins M, Couto I, Spengler G, Martins A, Amaral L. 2010. Evaluation of Efflux Activity of Bacteria by a Semi-automated Fluorometric System. *Methods in Molecular Biology*, **642**:159-72.
91. Paixão L, Rodrigues L, Couto I, Martins M, Fernandes P, de Carvalho CC, Monteiro GA, Sansonetty F, Amaral L, Viveiros M. 2009. Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Engineering*, **3**:18.
92. Costa SS, Lopes E, Azzali E, Machado D, Coelho T, da Silva PEA, Viveiros M, Pieroni M,

- Couto I. 2016. An Experimental Model for the Rapid Screening of Compounds with Potential Use Against *Mycobacteria*. *Assay and Drug Development Technologies*, **14**:524–534.
93. Chitsaz M, Booth L, Blyth MT, O'Mara ML, Brown MH. 2019. Multidrug Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Identification of Functionally Important Residues in the MtrD Efflux Protein. *MBio*, **10**(6): e02277-19.
 94. Foerster S, Gustafsson TN, Brochado AR, Desilvestro V, Typas A, Unemo M. 2020. The first wide-scale drug repurposing screen using the Prestwick Chemical Library (1200 bioactive molecules) against *Neisseria gonorrhoeae* identifies high in vitro activity of auranofin and many additional drugs. *APMIS*, **128**:242–250.
 95. Nafi BM, Miles RJ, Butler LO, Carter ND, Kelly C, Jeffery S. 1990. Expression of carbonic anhydrase in *Neisseriae* and other heterotrophic bacteria. *Journal of Medical Microbiology*, **32**:1–7.
 96. Elkashif A, Seleem MN. 2020. Investigation of auranofin and gold-containing analogues antibacterial activity against multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Nature*, **10**:5602.
 97. Edwards et al., "Compositions and methods for inhibiting the growth of *Neisseria gonorrhoeae*", US 10,201,526 B2, Feb 12, 2019. V. F.
 98. Loo PS, Ridgway GL, Oriel JD. 1985. Single dose ciprofloxacin for treating gonococcal infections in men. *Sexually Transmitted Infections*, **61**:302–305.
 99. Ito A, Sato T, Ota M, Takemura M, Nishikawa T, Toba S, Kohira N, Miyagawa S, Ishibashi N, Matsumoto S, Nakamura R, Tsuji M, Yamano Y. 2018. *In Vitro* Antibacterial Properties of Cefiderocol, a Novel Siderophore Cephalosporin, against Gram-Negative Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **62**(1):e01454-17.
 100. Paixão L, Rodrigues L, Couto I, Martins M, Fernandes P, de Carvalho CC, Monteiro GA, Sansonetty F, Amaral L, Viveiros M. 2009. Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Engineering*, **3**:18.
 101. Viveiros M, Martins A, Paixão L, Rodrigues L, Martins M, Couto I, Fährnich E, Kern WV., Amaral L. 2008. Demonstration of intrinsic efflux activity of *Escherichia coli* K-12 AG100 by an automated ethidium bromide method. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **31**:458–462.
 102. Akhoun BA, Tiwari H, Nargotra A. 2019. *In Silico Drug Design Repurposing Techniques and Methodologies*, 1st ed. , Academic Press.

103. Supuran CT. 2020. Exploring the multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases for novel drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, **15(6)**:671-686.
104. Nocentini A, Hewitt CS, Mastrolorenzo MD, Flaherty DP, Supuran CT. 2021. Anion inhibition studies of the α -carbonic anhydrases from *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **36(1)**: 1061–1066.
105. Sanders E, Maren TH. 1967. Inhibition of carbonic anhydrase in *Neisseria*: effects on enzyme activity and growth. *Molecular Pharmacology*, **3(2)**:204-15.
106. Main ER, Locke A. 1944. Carbonic Anhydrase: III. Effect on Growth of the Type I Pneumococcus, in Vitro. *Journal of Bacteriology*, **48(1)**:77-81.
107. European Centre for Disease Prevention and Control. 2019. Response plan to control and manage the threat of mult multi- and extensively drug drug-resistant gonorrhoea in Europe – 2019 update, Stockholm: ECDC.
108. Hewitt CS, Abutaleb NS, Elhassanny AEM, Nocentini A, Cao X, Amos DP, Youse MS, Holly KJ, Marapaka AK, An W, Kaur J, Krabill AD, Elkashif A, Elgammal Y, Graboski AL, Supuran CT, Seleem MN, Flaherty DP. 2021. Structure-Activity Relationship Studies of Acetazolamide-Based Carbonic Anhydrase Inhibitors with Activity against *Neisseria gonorrhoeae*. *ACS Infectious Diseases*, **7(7)**:1969-1984.
109. Mather MW, Darrouzet E, Valkova-Valchanova M, Cooley JW, McIntosht MT, Daldal F, Vaidya AB. 2005. Uncovering the molecular mode of action of the antimalarial drug atovaquone using a bacterial system. *Journal of Biological Chemistry*, **280**:27458–27465.
110. Li Y, Hopper A, Overton T, Squire DJP, Cole J, Tovell N. 2010. Organization of the electron transfer chain to oxygen in the obligate human pathogen *Neisseria gonorrhoeae*: Roles for cytochromes c4 and c5, but not cytochrome c2, in oxygen reduction. *Journal of Bacteriology*, **192**:2395–2406.
111. Fisher N, Meunier B, Biagini GA. 2020. The cytochrome *bc*₁ complex as an antipathogenic target. *FEBS Letters*, **594(18)**:2935-2952.
112. Fiorillo M, Lamb R, Tanowitz HB, Mutti L, Krstic-Demonacos M, Cappello AR, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. 2016. Repurposing atovaquone: Targeting mitochondrial complex III and OXPHOS to eradicate cancer stem cells. *Oncotarget*, **7(23)**:34084–34099.
113. Mendling W, Palmeira-de-Oliveira A, Biber S, Prasauskas V. 2019. An update on the role of *Atopobium vaginae* in bacterial vaginosis: what to consider when choosing a treatment? A mini

- review. Archives of Gynecology Obstetrics, **300(1)**:1-6.
114. Enna SJ, Bylund DB, Elsevier Science (Firm). 2007. xPharm: the comprehensive pharmacology reference, 1^a ed. , Elsevier, Nebraska.
 115. Carvalho C, Santos R, Cardoso S, Correia S, Oliveira P, Santos M, Moreira P. 2009. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. Current Medicinal Chemistry, **16**:3267–3285.
 116. Rangel-Vega A, Bernstein LR, Mandujano-Tinoco EA, García-Contreras SJ, García-Contreras R. 2015. Drug repurposing as an alternative for the treatment of recalcitrant bacterial infections. Frontiers in Microbiology, **6**:282.
 117. Mukherjee S, Das L, Kole L, Karmakar S, Datta N, Das PK. 2004. Targeting of parasite-specific immunoliposome-encapsulated doxorubicin in the treatment of experimental visceral leishmaniasis. The Journal of Infectious Diseases, **189**:1024–1034.
 118. Wong TWL, Yu HY, Kong SK, Fung KP, Kwok TT. 2000. The decrease of mitochondrial NADH dehydrogenase and drug induced apoptosis in doxorubicin resistant A431 cells. Life Sciences, **67**:1111–1118.
 119. Madi M, Shetty S, Babu S, Achalli S. 2015. Amlodipine-induced Gingival Hyperplasia - A Case Report and Review. West Indian Medical Journal, **64(3)**:279-82.
 120. Puscas I. 2000. Hypotensive effect of calcium channel blockers is parallel with carbonic anhydrase I inhibition. Clinical Pharmacology & Therapeutics, **68(4)**:443-9.
 121. Hollander E, Kaplan A, Allen A, Cartwright C. 2000. Pharmacotherapy for obsessive-compulsive disorder. Psychiatric Clinics of North America, **23**:643–656.
 122. Gunics G, Motohashi N, Amaral L, Farkas S, Molnár J. 2000. Interaction between antibiotics and non-conventional antibiotics on bacteria. International Journal of Antimicrobial Agents, **14**:239–242.
 123. LaMoia TE, Shulman GI. 2021. Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin Action. Endocrine Reviews, **42**:77–96.
 124. Chang R. 2021. Repurposing of Metformin as a Multifaceted and Multitasking Preventative and Treatment for Cancer. IntechOpen.
 125. Pryor R, Cabreiro F. 2015. Repurposing metformin: an old drug with new tricks in its binding pockets. Biochemical Journal, **471(3)**:307-22.

126. El-Rashid M, Nguyen-Ngo D, Minhas N, Meijles DN, Li J, Ghimire K, Julovi S, Rogers NM. 2020. Repurposing of metformin and colchicine reveals differential modulation of acute and chronic kidney injury. *Nature*, **10**:21968.
127. Lyseng-Williamson KA, Yang LPH. 2007. Topiramate: a review of its use in the treatment of epilepsy. *Drugs*, **67(15)**:2231-56.
128. Parikh SK, Silberstein SD. 2019. Current Status of Antiepileptic Drugs as Preventive Migraine Therapy. *Current Treatment Options in Neurology*, **21(4)**:16.
129. Dodgson SJ, Shank RP, Maryanoff BE. 2000. Topiramate as an inhibitor of carbonic anhydrase isoenzymes. *Epilepsia*, **41**:35–39.
130. Kim D, Kim W, Jeong S, Kim D, Yoo J-W, Jung Y. 2019. Therapeutic switching of sulpiride, an anti-psychotic and prokinetic drug, to an anti-colic drug using colon-specific drug delivery. *Drug Delivery and Translational Research*, **9(1)**:334-343.
131. Lianos GD, Alexiou GA, Rausei S, Galani V, Mitsis M, Kyritsis AP. 2021. Repurposing antipsychotic drugs for cancer treatment: current evidence and future perspectives. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 1-4.
132. DrugBank. 2021. Thiabendazole: Uses, Interactions, Mechanism of Action. , DrugBank Online,.
133. Armson A, Grubb WB, Mendis AHW. 1995. The effect of electron transport (ET) inhibitors and thiabendazole on the fumarate reductase (FR) and succinate dehydrogenase (SDH) of *Strongyloides ratti* infective (L3) larvae. *International Journal for Parasitology*, **25(2)**:261-3.
134. DrugBank. 2021. Benzthiazide: Uses, Interactions, Mechanism of Action. , DrugBank Online, .
135. DrugBank. 2021. Verapamil: Uses, Interactions, Mechanism of Action. , DrugBank Online, .
136. DrugBank. 2021. Thioridazine: Uses, Interactions, Mechanism of Action. , DrugBank Online, .
137. DrugBank. 2021. Chlorpromazine: Uses, Interactions, Mechanism of Action. , DrugBank Online, .
138. Crowle AJ, Douvas GS, May MH. 1992. Chlorpromazine: A Drug Potentially Useful for Treating Mycobacterial Infections. *Chemotherapy*, **38(6)**:410-9.
139. Ordway D, Viveiros M, Leandro C, Bettencourt R, Almeida J, Martins M, Kristiansen JE, Molnar J, Amaral L. 2003. Clinical Concentrations of Thioridazine Kill Intracellular Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **47(3)**: 917–922.

140. Pinto M, Rodrigues JC, Matias R, Água-Doce I, Cordeiro D, Correia C, Gomes JP, Borrego MJ. 2020. Fifteen years of a nationwide culture collection of *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial resistance in Portugal. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **39(9)**:1761-1770.
141. Cole MJ, Spiteri G, Chisholm SA, Hoffmann S, Ison CA, Unemo M, Van de Laar M. 2014. Emerging cephalosporin and multidrug-resistant gonorrhoea in Europe. *Eurosurveillance*, **19(45)**:20955.
142. Yu R, Yin Y, Wang G, Chen S, Zheng B, Dai X, Han Y, Li Q, Zhang G, Chen X. 2014. Worldwide Susceptibility Rates of *Neisseria gonorrhoeae* Isolates to Cefixime and Cefpodoxime: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*, **9(1)**:e87849.
143. Poncin T, Fouere S, Braille A, Camelena F, Agsous M, Bebear C, Kumanski S, Lot F, Mercier-Delarue S, Ngangro NN, Salmona M, Schnepf N, Timsit J, Unemo M, Bercot B. 2018. Multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* failing treatment with ceftriaxone and doxycycline in France, November 2017. *Eurosurveillance*, **23(21)**:1800264.
144. Eyre DW, Sanderson ND, Lord E, Regisford-Reimmer N, Chau K, Barker L, Morgan M, Newnham R, Golparian D, Unemo M, Crook DW, Peto TE, Hughes G, Cole MJ, Fifer H, Edwards A, Andersson MI. 2018. Gonorrhoea treatment failure caused by a *Neisseria gonorrhoeae* strain with combined ceftriaxone and high-level azithromycin resistance, England, February 2018. *Eurosurveillance*, **23(27)**:1800323.
145. Portal do SNS. Doenças de Declaração Obrigatória - Transparência. , SNS, .



2021

ANDRÉ PINHO DE PINA

Identificação de novos fármacos para *Neisseria gonorrhoeae* através de uma estratégia de reposicionamento *in silico*

