



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Avaliação da atividade antimicrobiana de compostos inibidores do
metabolismo energético em *Escherichia coli*

Ana Filipa Brito Mendes

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

OUTUBRO, 2022



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Avaliação da atividade antimicrobiana de compostos inibidores do
metabolismo energético em *Escherichia coli*

Autor: Ana Filipa Brito Mendes

Orientadora: Professora Doutora Liliana Rodrigues

Coorientadora: Doutora Sofia Santos Costa

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do
grau Mestre em Ciências Biomédicas

Apoio financeiro do projeto DrugsForNg, financiado pelo centro de *investigação Global
Health and Tropical Medicine* do IHMT-NOVA (GHTM–UID/04413/2020, Fundação
para a Ciência e a Tecnologia, Portugal).

Comunicações

Os resultados apresentados nesta Dissertação foram aceites para apresentação sob a forma de poster, em coautoria, no seguinte congresso internacional:

Mendes A., Santos Costa S., Rodrigues L. Evaluation of the activity of repurposed drugs that target energy metabolism in *Escherichia coli*. 33rd *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15-18 Abril 2023, híbrido online/Copenhaga, Dinamarca.

AGRADECIMENTOS

Chegado este momento tenho de dar os mais sinceros agradecimentos à minha Orientadora Doutora Professora Liliana Rodrigues, por toda a aprendizagem prestada durante a realização deste projeto e pela forma como estruturou todo este trabalho. Tenho de agradecer a confiança que depositou em mim, o incentivo, compreensão e disponibilidade que teve ao longo deste tempo para comigo. Tenho também de agradecer à Doutora Sofia Santos Costa, por estar sempre disponível a ajudar a melhorar este projeto tanto prático como teórico. À Unidade de Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, agradeço as condições disponibilizadas.

Agradeço à minha colega Inês Vítor por todos os momentos de felicidade e descontração que me proporcionou ao longo desta caminhada, e por toda a ajuda partilhada. À Rafaela e à Mafalda as amigas de sempre, agradeço por todo o apoio e amizade nos bons e nos maus momentos, e por acreditarem em mim mais que eu própria.

Um obrigado eterno à minha mãe, que me motivou, nunca desistiu de mim, e que me proporcionou a oportunidade de prosseguir os meus estudos ao longo dos anos. À minha irmã Diana, que sempre acreditou nas minhas capacidades, e que é graças a ela que me inscrevi na dissertação deste mestrado. À minha prima Márcia, que não é só prima, é a minha melhor amiga, que em todos os momentos menos felizes ao longo deste percurso deu-me sempre força para não desistir, como sempre fez ao longo da minha vida.

Por fim, agradeço a uma pessoa muito especial que já não se encontra presente entre nós, e que é a razão principal de eu estar aqui, a quem eu devo tudo o que conquistei até ao dia de hoje, pois sem ela não seria possível. Hoje espero que esteja orgulhosa de mim.

RESUMO

Ao longo dos anos, as bactérias desenvolveram vários mecanismos de resistência aos antimicrobianos, nomeadamente bombas de efluxo. Uma estratégia promissora para combater e prevenir a resistência mediada por sistemas de efluxo em bactérias Gram-negativas, incluindo *Escherichia coli*, é a utilização de fármacos não antibióticos que, quando utilizados em combinação com antibióticos, promovem ou restauram a atividade destes últimos. Vários estudos sugerem que os inibidores de efluxo mais eficazes atuam a nível do metabolismo energético, nomeadamente na fosforilação oxidativa.

Uma estratégia para a identificação de inibidores de efluxo consiste no reposicionamento de fármacos, uma abordagem menos dispendiosa e mais curta do que o processo convencional de desenvolvimento de novos medicamentos.

Nesta Dissertação, avaliou-se a atividade *in vitro* de fármacos aprovados, identificados previamente por um método de reposicionamento *in silico* como potenciais inibidores de proteínas envolvidas no metabolismo energético, em *E. coli*.

Os compostos candidatos a reposicionamento testados neste trabalho foram: doxorubicina, acetazolamida, tiabendazol, atovaquone, benzotiazida, topiramato, amlodipina, sulpirida e metformina. Para estudar o mecanismo de ação dos compostos candidatos, utilizou-se um sistema modelo de expressão de bombas de efluxo em *E. coli*, que inclui as estirpes seguintes: AG100, com o sistema de efluxo AcrAB-TolC funcional; AG100A, com o sistema AcrAB-TolC inativo; AG100_{TET}, que apresenta sobre-expressão de bombas de efluxo, incluindo AcrAB-TolC. Estes compostos foram também avaliados quanto ao seu efeito adjuvante da atividade de antibióticos selecionados em *E. coli*, através da determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de antibióticos na presença e na ausência do composto candidato, e quanto à sua capacidade de inibição de efluxo, através de um método fluorométrico semiautomático. Os resultados obtidos demonstraram que a doxorubicina, a amlodipina e o atovaquone apresentam maior atividade antimicrobiana na estirpe AG100, do que os restantes compostos. No entanto, a doxorubicina demonstrou ser substrato do sistema de efluxo AcrAB-TolC.

Por outro lado, verificou-se efeito significativo dos compostos na redução da CMI da gentamicina e do brometo de etídio na estirpe AG100A, que apresenta o sistema AcrAB-TolC inativo. Este estudo também demonstrou que a amlodipina foi o composto com atividade inibitória de efluxo mais promissora nos ensaios de fluorimetria em tempo real. Este composto também promoveu a redução significativa da CMI da tetraciclina, gentamicina e brometo de etídio em isolados clínicos de *E. coli* resistentes à tetraciclina. Concluindo, os resultados obtidos neste trabalho permitiram identificar a amlodipina como um composto promissor, com potencial aplicação no desenvolvimento de estratégias terapêuticas futuras para combater a emergência de resistência em *E. coli* e outras bactérias Gram-negativas.

Palavras-chave:

***Escherichia coli*, resistência aos antibióticos, bombas de efluxo, inibidor de efluxo, reposicionamento de fármacos.**

ABSTRACT

Over the years, bacteria developed several drug resistance mechanisms, namely efflux pumps. A promising strategy to fight and prevent efflux systems-mediated resistance in Gram-negative bacteria, including *Escherichia coli*, is the use of non-antibiotics that, when used in combination with antibiotics, promote or restore the latter's activity. Several studies have suggested that the most effective efflux inhibitors act at the level of energy metabolism, namely oxidative phosphorylation.

A strategy for the identification of efflux inhibitors consists in drug repositioning, a more inexpensive and shorter approach than the conventional drug development process.

In this Dissertation, we evaluated the *in vitro* activity of approved drugs, previously identified by an *in silico* repositioning method as potential inhibitors of proteins involved in energy metabolism, in *E. coli*.

The repositioning candidate compounds tested in this work were: doxorubicin, acetazolamide, thiabendazole, atovaquone, benzthiazide, topiramate, amlodipine, sulpiride and metformin. To study the mechanism of action of the candidate compounds, we used an efflux pump expression model system in *E. coli* that includes the following strains: AG100, with a functional AcrAB-TolC efflux system; AG100A, with an inactive AcrAB-TolC system; AG100_{TET} that presents overexpression of efflux pumps, including AcrAB-TolC. These compounds were also evaluated for their adjuvant effect of the activity of selected antibiotics in *E. coli*, by the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of antibiotics in the presence and absence of compound, and for their efflux inhibition capacity, by a semiautomatic fluorometric method.

The obtained results demonstrated that doxorubicin, amlodipine and atovaquone present higher antimicrobial activity in the AG100 strain, than the remaining compounds. However, doxorubicin was shown to be a substrate of the AcrAB-TolC efflux system.

On the other hand, there was a significant effect of the compounds in the reduction of the MIC of gentamycin and ethidium bromide in the strain AG100A, which presents an inactive AcrAB-TolC system. This study also demonstrated that amlodipine was the compound with the most promising efflux inhibition activity in the real time fluorometric assays. This compound also promoted significant reduction of the MIC of tetracycline, gentamycin, and ethidium bromide in *E. coli* clinical isolates resistant to tetracycline.

In conclusion, the results obtained in this work allowed the identification of amlodipine as a promising compound, with potential application in the development of future therapeutic options to fight the emergence of resistance in *E. coli* and other Gram-negative bacteria.

Keywords:

***Escherichia. coli*, antibiotic resistance, efflux pumps, efflux inhibitor, drug repositioning.**

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	IV
RESUMO	V
ABSTRACT.....	VI
ÍNDICE	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. <i>Bactérias Gram-negativas clinicamente relevantes</i>	3
1.1.1. <i>Escherichia coli</i>	5
1.2. <i>Agentes antimicrobianos e mecanismos de ação</i>	6
1.2.1. Antibióticos para o tratamento de infecções por <i>E. coli</i>	8
1.2.1.1. β -lactâmicos	8
1.2.1.2. Fluoroquinolonas	10
1.2.1.3. Aminoglicosídeos	11
1.2.1.4. Trimetoprim-sulfametoxazol	11
1.3. <i>Mecanismos de resistência aos antibióticos</i>	11
1.3.1. Evolução da resistência aos antibióticos em <i>E. coli</i>	12
1.4. <i>Sistemas de efluxo em E. coli</i>	15
1.4.1. Transportadores primários.....	16
1.4.2. Transportadores secundários.....	17
1.5. <i>Inibidores de efluxo e modo de ação</i>	18
1.5.1. Fenotiazinas	20
1.6. <i>Estratégias para o desenvolvimento de novos fármacos</i>	21
1.6.1. Reposicionamento de fármacos	22
1.6.2. Interações sinérgicas entre fármacos reposicionados e antibióticos	24
1.7. <i>Objetivos</i>	25
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
2.1. <i>Materiais</i>	26
2.1.1. Estirpes bacterianas	26
2.1.2. Meios de cultura	28
2.1.3. Reagentes e soluções	28
2.2. <i>Métodos</i>	30

2.2.1.	Comparação das sequências proteicas dos alvos preditivos dos fármacos candidatos identificados em <i>N. gonorrhoeae</i> com a sequência de <i>E. coli</i>	30
2.2.2.	Crescimento e manutenção das estirpes bacterianas	30
2.2.3.	Determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMI) pelo método de microdiluição.	30
2.2.3.1.	Preparação do inóculo	30
2.2.3.2.	Determinação de CMIs dos compostos candidatos, antibióticos e EtBr	31
2.2.3.3.	Determinação do efeito dos novos compostos sobre o valor de CMIs de antibióticos e EtBr	35
2.2.4.	Ensaio de fluorimetria em tempo-real	36
2.2.4.1.	Preparação da suspensão bacteriana	37
2.2.4.2.	Ensaio de acumulação de EtBr na presença dos compostos candidatos	37
2.2.4.3.	Ensaio de efluxo de EtBr na presença dos compostos candidatos	38
3.	RESULTADOS	40
3.1.	Caracterização dos alvos dos compostos candidatos a reposicionamento em <i>E. coli</i>	40
3.2.	CMIs dos compostos candidatos nas estirpes <i>E. coli</i> AG100, AG100A e AG100 _{TET}	42
3.3.	Efeito dos compostos candidatos nas CMIs dos antibióticos e do EtBr nas estirpes de <i>E. coli</i> , AG100, AG100A, AG100 _{TET}	43
3.4.	Avaliação da atividade de efluxo por fluorimetria em tempo real	47
3.4.1.	Efeito dos compostos candidatos na acumulação de EtBr	47
3.4.2.	Efeito dos compostos candidatos no efluxo de EtBr	50
3.5.	Efeito da amlodipina nas CMIs de antibióticos em isolados clínicos de <i>E. coli</i>	52
4.	DISCUSSÃO	55
4.1.	Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro dos compostos candidatos nas estirpes <i>E. coli</i> AG100, AG100A e AG100 _{TET}	55
4.1.1.	Doxorubicina	56
4.1.2.	Acetazolamida	57
4.1.3.	Tiabendazol	58
4.1.4.	Atovaquone	58
4.1.5.	Benzotiazida	59
4.1.6.	Amlodipina	60
4.1.7.	Topiramato	61
4.1.8.	Sulpirida	61
4.1.9.	Metformina	61
4.1.10.	Clorpromazina	62
4.2.	Avaliação da atividade antimicrobiana do composto mais promissor contra isolados clínicos de <i>E. coli</i>	63
4.3.	Desenvolvimento de IES: desafios e perspectivas futuras	64
5.	CONCLUSÃO	66
6.	REFERÊNCIAS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - LISTA DA OMS DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS E GRAM-POSITIVAS AGRUPADAS EM TRÊS CATEGORIAS PRIORITÁRIAS DE ACORDO COM A SUA RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS: CRÍTICA, ALTA E MÉDIA, PARA INCENTIVAR A PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS ANTIBIÓTICOS.....	2
FIGURA 2 - COMPARAÇÃO ENTRE AS PAREDES CELULARES DE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS.	3
FIGURA 3 – CRONOLOGIA DA DESCOBERTA DAS DIFERENTES CLASSES DE ANTIBIÓTICOS.	7
FIGURA 4 - CLASSES DE ANTIBIÓTICOS E RESPECTIVOS MECANISMOS DE AÇÃO EM BACTÉRIAS.	8
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS EM BACTÉRIAS.	12
FIGURA 6 - DIAGRAMA DA CLASSIFICAÇÃO DE AMBLER BASEADO NA ESTRUTURA PRIMÁRIA DA PROTEÍNA DE CADA ENZIMA.	13
FIGURA 7 - ESQUEMA DAS PRINCIPAIS FAMÍLIAS DOS TRANSPORTADORES TRANSMEMBRANARES	16
FIGURA 8 - ESQUEMA DO SISTEMA TRIPARTIDO AcrAB-TolC	17
FIGURA 9 - COMPARAÇÃO DO CRONOGRAMA DA DESCOBERTA DE NOVOS ANTIBIÓTICOS COM O CRONOGRAMA DE REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS.	22
FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA MICROPLACA DE 96 POÇOS PARA DETERMINAÇÃO DE CMIs.....	34
FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA MICROPLACA DE 96 POÇOS PARA DETERMINAÇÃO DE CMIs DOS ANTIBIÓTICOS NA PRESENÇA DOS COMPOSTOS A 1/4 DA CMI.	36
FIGURA 12 - TERMOCICLADOR EM TEMPO REAL ROTORGENE™ 3000	37
FIGURA 13 - ENSAIO DE ACUMULAÇÃO DE EtBr NA PRESENÇA DOS 9 COMPOSTOS A 1/4 DA SUA CMI A 37°C NA PRESENÇA DE GLUCOSE A 0,4%. CONCENTRAÇÃO DE EtBr (1MG/L PARA AG100 E AG100 _{TET} , E 0, 25 MG/L PARA A ESTIRPE AG100A)..	48
FIGURA 14 - ENSAIO DE EFLUXO DE EtBr NA PRESENÇA DOS COMPOSTOS QUE PROMOVERAM ACUMULAÇÃO DE EtBr A 1/4 DA SUA CMI, NA ESTIRPE AG100 (GRÁFICO A), AG100A (GRÁFICO B) E AG100 _{TET} (GRÁFICO C).....	51

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - POTENCIAIS IES, RESPECTIVOS ALVOS EM <i>E. COLI</i> , E ANTIBIÓTICOS COM OS QUAIS SE DEMONSTROU EFEITO SINÉRGICO.	19
TABELA 2 - ESTIRPES E ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>E. COLI</i> UTILIZADAS NESTE ESTUDO.	26
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NESTE TRABALHO.	28
TABELA 4 - PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES <i>STOCK</i> DE ANTIBIÓTICOS, FÁRMACOS CANDIDATOS A REPOSICIONAMENTO E OUTROS REAGENTES UTILIZADOS NESTE TRABALHO.	29
TABELA 5 - GAMA DE CONCENTRAÇÕES (MG/L) TESTADA PARA CADA COMPOSTO E ANTIBIÓTICO.	31
TABELA 6 - RECOMENDAÇÕES DE ACORDO COM A EUCAST E CLSI DOS <i>BREAKPOINTS</i> DA CMI DOS ANTIBIÓTICOS TESTADOS EM <i>E. COLI</i>	34
TABELA 7 - ALVOS PREDITIVOS DOS 9 COMPOSTOS CANDIDATOS, IDENTIFICADOS EM <i>N. GONORRHOEAE</i> POR REPOSICIONAMENTO IN SILICO, E CORRESPONDENTE ALVO EM <i>E. COLI</i> DETERMINADO POR ANÁLISE BLAST.	40
TABELA 8 - CIM DOS 9 COMPOSTOS (MG/L) EM ESTUDO NAS TRÊS ESTIRPES DE <i>E. COLI</i>	42
TABELA 9 - EFEITO DOS COMPOSTOS NA CMI DOS ANTIBIÓTICOS E DO EtBr NAS ESTIRPES AG100, AG100A E AG100 _{TET}	44
TABELA 10 - VALORES DE FLUORESCÊNCIA FINAL RELATIVA (FFR) PARA OS COMPOSTOS CANDIDATOS OBTIDOS APÓS OS ENSAIOS DE ACUMULAÇÃO DE EtBr.	50
TABELA 11 - CMI DA AMLODIPINA PARA CADA UM DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>E. COLI</i> ESTUDADOS.	53
TABELA 12 - EFEITO DA AMLODIPINA NA CMIs DE ANTIBIÓTICOS E EtBr NOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>E. COLI</i>	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC – *ATP-binding cassette*

AC - Anidrase carbónica

Acet - Acetazolamida

AINEs - Anti-inflamatórios não esteroides

Amlo – Amlodipina

Atov – Atovaquone

Benz – Benzotiazida

CAN – Canamicina

CCCP – Carbonilcianeto m-clorofenilhidrazona (do inglês *Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone*)

CEF – Ceftriaxona

CIP – Ciprofloxacina

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMI – Concentração mínima inibitória

CPZ - Clorpromazina

CTX-M - Cefotaxima β -lactamase

DM - Domínio de membrana

DMSO - Dimetil sulfóxido

Doxo – Doxorubicina

ECDC – Centro europeu de prevenção e controle de doenças (do inglês *European Centre for Disease Prevention and Control*)

ERI - Eritromicina

ESBL - β -lactamase de largo espectro (do inglês *Extended spectrum β -lactamase*)

EtBr - Brometo de etídio

UE - União Europeia

EUCAST - *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing*

FAD - Flavina-adenina dinucleótido

FPM - Força Proto-Motriz

GEN – Gentamicina

IE - Inibidor de efluxo

IMP - Imipenemase

ITU - Infecções do trato urinário
 KPC - *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase
 LA - Luria Bertani Agar
 LPS- Lipopolissacarídeo
 MATE – *Multidrug and toxic compounds extrusion*
 MFS – *Major facilitator superfamily*
 MH - Muller-Hinton Broth
 NaOH - Hidróxido de sódio.
 NBD - Domínio de ligação de nucleotídeo intracelular (do inglês *nucleotide binding domain*)
 NDM-1 – *New Delhi metalobetalactamase*
 OFL – Ofloxacina
 OMS - Organização Mundial da Saúde
 OXA - Oxacilinase
 PACE – *Proteobacterial antimicrobial compound efflux*
 PaβN – *Phenylalanine-arginine β-naphthylamide*
 PBPs – *Penicillin-binding proteins*
 PBS - Tampão fosfato salino
 QRDR – *quinolone resistance determining regions*
 ROS – Espécies reativas de oxigênio (do inglês *Reactive oxygen species*)
 RND – *Resistance-nodulation-cell division*
 SHV - Variável sulfidríla (do inglês *Sulphydryl Variable*)
 SMR – “*Small multidrug resistance*”
 Sulpi – Sulpirida
 TEM - Temoniera
 TET - Tetraciclina
 Tia – Tiabendazol
 SMX - Trimetoprim-sulfametoxazol
 Topi – Topiramato
 TZ – Tioridazina
 UCI - Unidades de Cuidados Intensivos
 VIM – *Verona integron-borne metallo-β-lactamase*

AMP - Ampicilina
AMO - Amoxicilina
PRL - Piperacilina
OXA - Oxacilina
CXM - Cefuroxima
LEV - Levofloxacina
NA - Ácido nalidíxico
NOR - Norfloxacina
W - Trimetoprim
SXT - Trimetoprim – sulfametoxazol

1. INTRODUÇÃO

Os antibióticos são fármacos utilizados na prevenção e tratamento de infecções bacterianas (1). Desde a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, foram desenvolvidos vários antibióticos que permitiram combater grande parte das doenças infecciosas, diminuindo as elevadas taxas de mortalidade provocadas por infecções bacterianas em todo o mundo (2). Nos últimos anos, a utilização dos antibióticos de forma contínua tem vindo a contribuir para a resistência aos antibióticos (3), fenómeno que ocorre quando as bactérias se adaptam em resposta ao uso desses medicamentos (1). Infecções como a pneumonia, tuberculose, gonorreia e doenças associadas a alimentos contaminados, como infecções gastrointestinais, são exemplos de doenças contra as quais os antibióticos se estão a tornar ineficazes para tratamento (1). A resistência aos antibióticos ocorre como consequência de: i) falta de recomendações de tratamento padrão em certos países (1); ii) uso prolongado e inapropriado dos antibióticos; iii) escassas condições de higiene; iv) fluxo de viajantes; e v) elevado período de tempo por vezes necessário ao diagnóstico de infecções bacterianas (2).

Até ao ano 2000, a resistência a antibióticos era mais predominante em ambiente hospitalar, mas atualmente encontra-se presente também na comunidade (4). De facto, o desenvolvimento e produção de novos antibióticos para a prevenção e tratamento de doenças infecciosas não tem conseguido acompanhar a emergência de vários mecanismos de resistência bacteriana (5).

A EARS-Net é uma Rede Europeia de Vigilância da Resistência Antimicrobiana, gerida e coordenada pelo Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC). Esta rede funciona como banco de dados central e abrangente da União Europeia (UE), concentrando-se em oito bactérias patogénicas distintas, entre as quais: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* (6). A situação da resistência aos antibióticos é comunicada anualmente à EARS-Net pelos países da UE (6). Entre 2016 e 2020, observou-se uma diminuição de bactérias resistentes, mas um aumento de resistência aos carbapenemos em *E. coli* e *K. pneumoniae*, bem como um aumento significativo de resistência à vancomicina em *E. faecium* (7).

Um estudo recente demonstrou que, em 2019, ocorreram cerca de 1,27 milhão de mortes atribuíveis a bactérias resistentes aos antibióticos e as taxas de mortalidade foram mais

altas em alguns países de baixa e média renda (8). No entanto, estima-se que este número tenderá a aumentar exponencialmente para mais de 10 milhões de mortes anuais em 2050 (9).

Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou uma lista de bactérias resistentes aos antibióticos de acordo com o seu nível de prioridade: crítica, alta e média (10). Esta categorização tem como objetivo orientar a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos de acordo com os impactos negativos causados por bactérias resistentes aos antibióticos, em termos de morbidade e mortalidade, em todo mundo (11).

Dentro da categoria de prioridade crítica, encontram-se as bactérias Gram-negativas, em particular da ordem *Enterobacterales*, como a *E. coli*. (Figura 1).

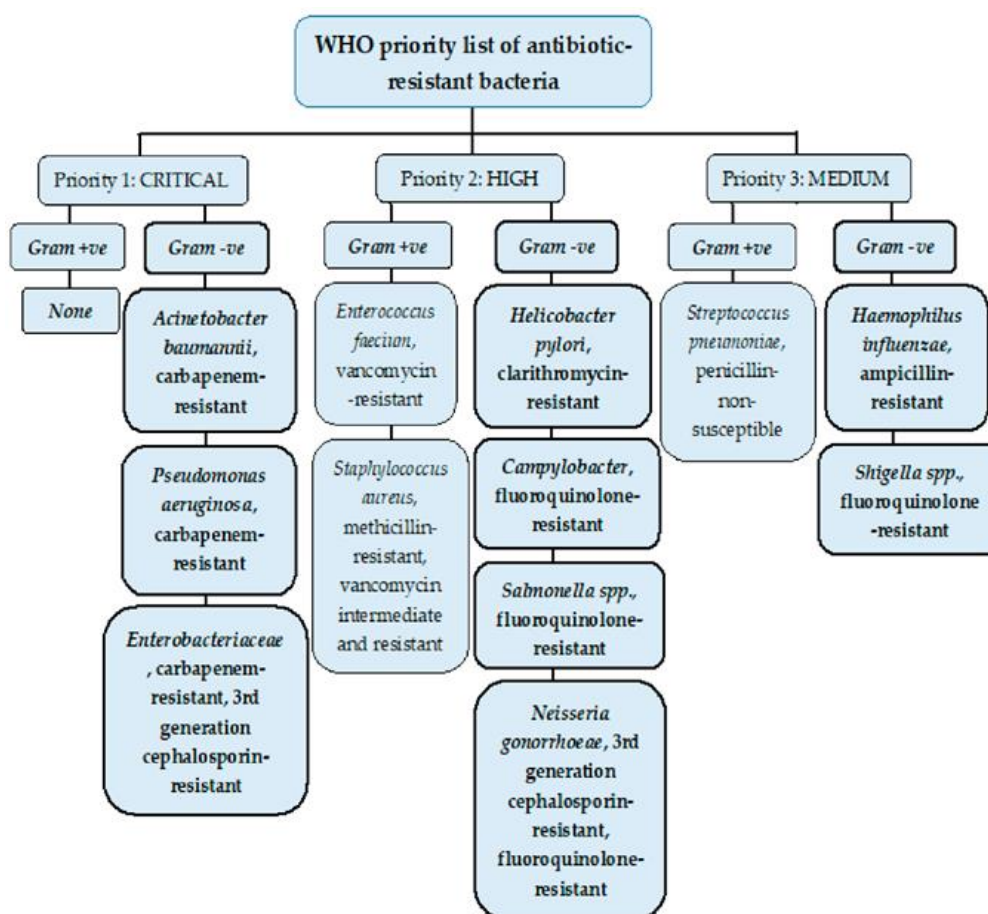


Figura 1 - Lista da OMS de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas agrupadas em três categorias prioritárias de acordo com a sua resistência a antibióticos: crítica, alta e média, para incentivar a pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos [adaptado de (11)].

1.1. Bactérias Gram-negativas clinicamente relevantes

As células bacterianas possuem um invólucro celular constituído por várias camadas, que as protege do ambiente adverso e permite a sua distinção, pela técnica de coloração de Gram, em dois grupos principais: Gram-positivas e Gram-negativas. As bactérias Gram-positivas não possuem membrana externa, mas apresentam uma camada espessa de peptidoglicano. Pelo contrário, a parede celular das bactérias Gram-negativas é constituída por um envelope celular complexo contendo uma membrana externa, que possui um folheto interno e, na maioria das bactérias, um folheto externo, em que o principal componente é um glicolípido anfifílico (lipopolissacarídeo, LPS), particular das bactérias Gram-negativas (12). O LPS é fundamental para a forma e função da membrana externa, determina as propriedades de proteção da membrana externa, e intervém na interação hospedeiro-agente patogénico (12). Estas diferenças de paredes celulares são demonstradas na Figura 2.

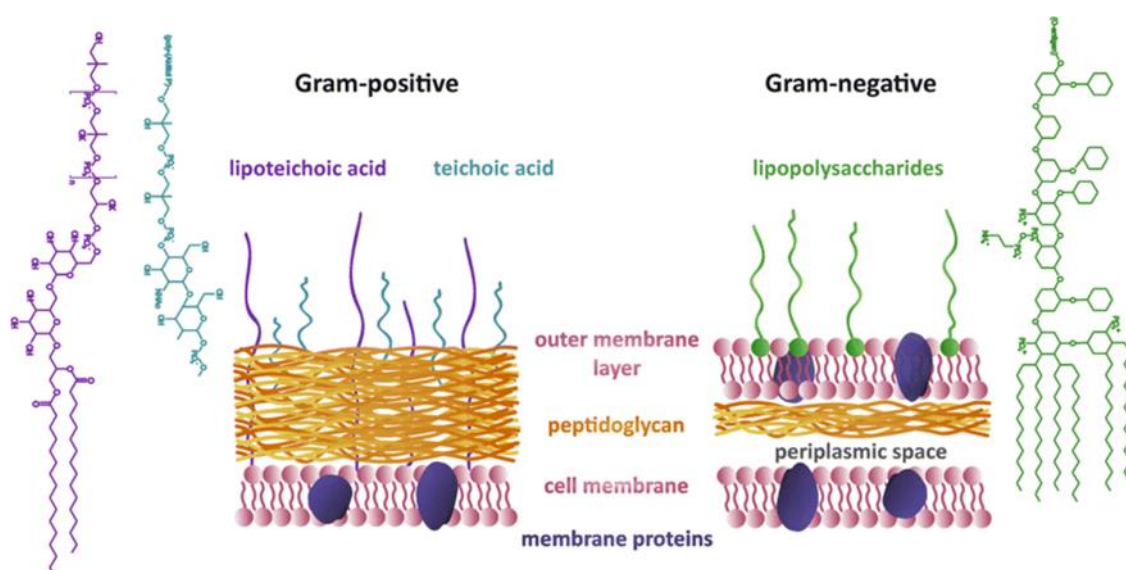


Figura 2 - Comparação entre as paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas [Adaptado de (13)].

As bactérias Gram-negativas com elevado nível de resistência a diversas classes de antibióticos estão a aumentar no ambiente hospitalar, em particular nas Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), sendo responsáveis por elevadas taxas de mortalidade (14). O perfil das infeções bacterianas pode ser distinto em ambiente hospitalar das infeções adquiridas na comunidade, em particular no que respeita à frequência, ao local de infeção

e ao tipo de microrganismo (15). As infecções adquiridas no ambiente hospitalar e durante o tratamento hospitalar são designadas de infecções nosocomiais (16). Entre elas as mais recorrentes são as do trato urinário, respiratório e ao nível da corrente sanguínea (15) provocadas por bactérias pertencentes à ordem *Enterobacterales*, tais como *Enterobacter* spp., *K. pneumoniae*, *E. coli*, e por outros bacilos Gram-negativos não fermentadores, tais como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (14). Como referido anteriormente, de acordo com a lista publicada em 2017 pela OMS, estas bactérias encontram-se categorizadas como prioridade crítica para o desenvolvimento de novos fármacos.

A bactéria *A. baumannii* é causa frequente de infecções em UCI e depressa tornou-se resistente à maioria dos antibióticos. Esta bactéria tem a capacidade de colonizar feridas abertas, cateteres e tubos de ventilação (17). A bactéria *P. aeruginosa* é uma bactéria oportunista, umas das principais causas de infecção nosocomial e, por vezes, a principal causa de morte, uma vez que a falha terapêutica é cada vez mais comum (18). Um estudo recente demonstrou que *A. baumannii* foi a principal bactéria a contaminar o equipamento de proteção individual dos profissionais de saúde, enquanto *P. aeruginosa* foi o segundo agente patogénico multirresistente mais comum (19).

A ordem *Enterobacterales* é constituída por bacilos Gram-negativos, aeróbios-anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, imóveis ou móveis, fermentadores de glucose, catalase positivos, citocromo-oxidase negativos, que se encontram na natureza ou como parte da flora natural do Homem (20). O habitat da bactéria *Enterobacter* spp. é o solo e a água, sendo que também pode ser encontrada nas fezes humanas e no trato respiratório (21). Esta bactéria pode causar diversas infecções nosocomiais, onde essas bactérias são contaminantes de superfícies, equipamentos médicos e equipamento hospitalar pessoal (22). Muitas infecções por *K. pneumoniae* são nosocomiais, frequentemente em UCI, sendo a pneumonia e bacteremia as infecções mais recorrentes (23). Estas infecções podem ocorrer em indivíduos saudáveis, mas normalmente desenvolvem-se em doentes imunocomprometidos, e estão associadas aos ventiladores hospitalares. Alguns fatores de risco como a idade, alcoolismo ou diabetes *mellitus* podem complicar estas infecções (22). A espécie *E. coli* é a bactéria mais comum causadora de diarreia e infecções do trato urinário (ITU). Cerca de 80% das infecções urinárias são adquiridas na comunidade e 30% em ambiente hospitalar (16).

1.1.1. *Escherichia coli*

A espécie *E. coli* foi descoberta em 1885, através de estudos da flora intestinal de bebês, tendo sido designada inicialmente por *Bacterium coli commune* pelo pediatra alemão Theodor Escherich (24). Tal como referido anteriormente, *E. coli* pertence à ordem *Enterobacterales*, apresenta a forma de bacilo com coloração Gram-negativa, é anaeróbio facultativo (25) fermenta carboidratos, incluindo a lactose (24) e não produz esporos (26). Possui cerca de 2 µm de comprimento, 1 µm de diâmetro, e apresenta forma de bastonete (27). Podem ser imóveis, ou móveis, neste caso com flagelos laterais ou fímbrias por forma a aderirem a outras células ou aos tecidos do hospedeiro (28). Uma vez que cada serotipo é característico/associado a diferentes tipos de infeção, a serotipagem dos isolados clínicos é relevante (29). Na sua parede celular, a bactéria *E. coli* apresenta o antígeno somático O, próprio de cada estirpe, o antígeno flagelar H e, por vezes, o antígeno capsular K (30).

A bactéria *E. coli* faz parte da microbiota natural de diferentes hospedeiros e, normalmente, não causa infeção. No entanto, tem a capacidade de causar infeções graves em humanos e animais através de diferentes vias de transmissão. Por exemplo, através de contato direto, pelo contato com excreções de animais e pela cadeia alimentar (26). Ao entrar no organismo, esta bactéria pode aderir às superfícies mucosas ou disseminar-se por todo o corpo (25).

Tal como referido, *E. coli* é conhecida comumente por ser a principal causa de infeções do trato urinário, mas também pode causar meningite, abscessos em diferentes órgãos do corpo, enterite aguda em humanos e animais, e a conhecida 'diarreia do viajante' (24). As estirpes de *E. coli* que causam infeções diarreicas distribuem-se em diferentes grupos, cada um com mecanismos distintos que originam doença diarreica com sintomas clínicos diferentes: enterotoxigénicas que causam a diarreia do viajante; entero-hemorrágica, associadas com colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urémica; enteroagregantes, que causam diarreia persistente; e enteropatogénicas associadas por exemplo à diarreia aquosa de lactentes (25).

Até à data, uma das estirpes de *E. coli* mais estudada é a estirpe entero-hemorrágica O157:H7, pelo seu elevado nível de patogenicidade (24). Esta estirpe adapta-se a diversas condições tornando-se hábil para causar doença em humanos. É o serotipo mais frequentemente isolado em doentes nos Estados Unidos, Japão e Reino Unido e, devido

ao elevado número de surtos e aos custos anuais associados a estas infeções, tornou-se uma das bactérias patogénicas mais importantes de origem alimentar (31).

Ao longo dos anos, as infeções causadas por *E. coli* têm vindo a apresentar um aumento de morbilidade e mortalidade, tornando-se cada vez mais um problema de saúde pública, na comunidade e em meio hospitalar, precisamente pelo surgimento de estirpes resistentes aos antibióticos (32).

1.2. Agentes antimicrobianos e mecanismos de ação

A descoberta dos antibióticos foi muito importante até aos dias de hoje no controlo das doenças infecciosas (3). Desta forma, ao longo dos anos foram vários os avanços no desenvolvimento destes fármacos, sendo o marco a descoberta da penicilina em 1928 (33). A definição de antibiótico “ideal” é aquele que inibe o crescimento de bactérias patogénicas de um hospedeiro, sem prejudicar a microbiota natural do intestino, independentemente do local de infeção, e sem ser tóxico para o hospedeiro (34). Os antibióticos podem ser naturais ou sintéticos, e caracterizam-se pela capacidade de inibir o crescimento ou causar a morte da célula bacteriana sendo assim designados de bacteriostáticos ou bactericidas, respetivamente (35).

Até aos dias de hoje, os antibióticos naturais ou semissintéticos são classificados como β -lactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, glicopeptídeos, lipopeptídeos, estreptograminas, lincosamidas, cloranfenicol e rifamicinas (4). Já os antibióticos sintéticos são constituídos pelas sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (4). A Figura 3 ilustra as datas da patente inicial ou descoberta para cada antibiótico.

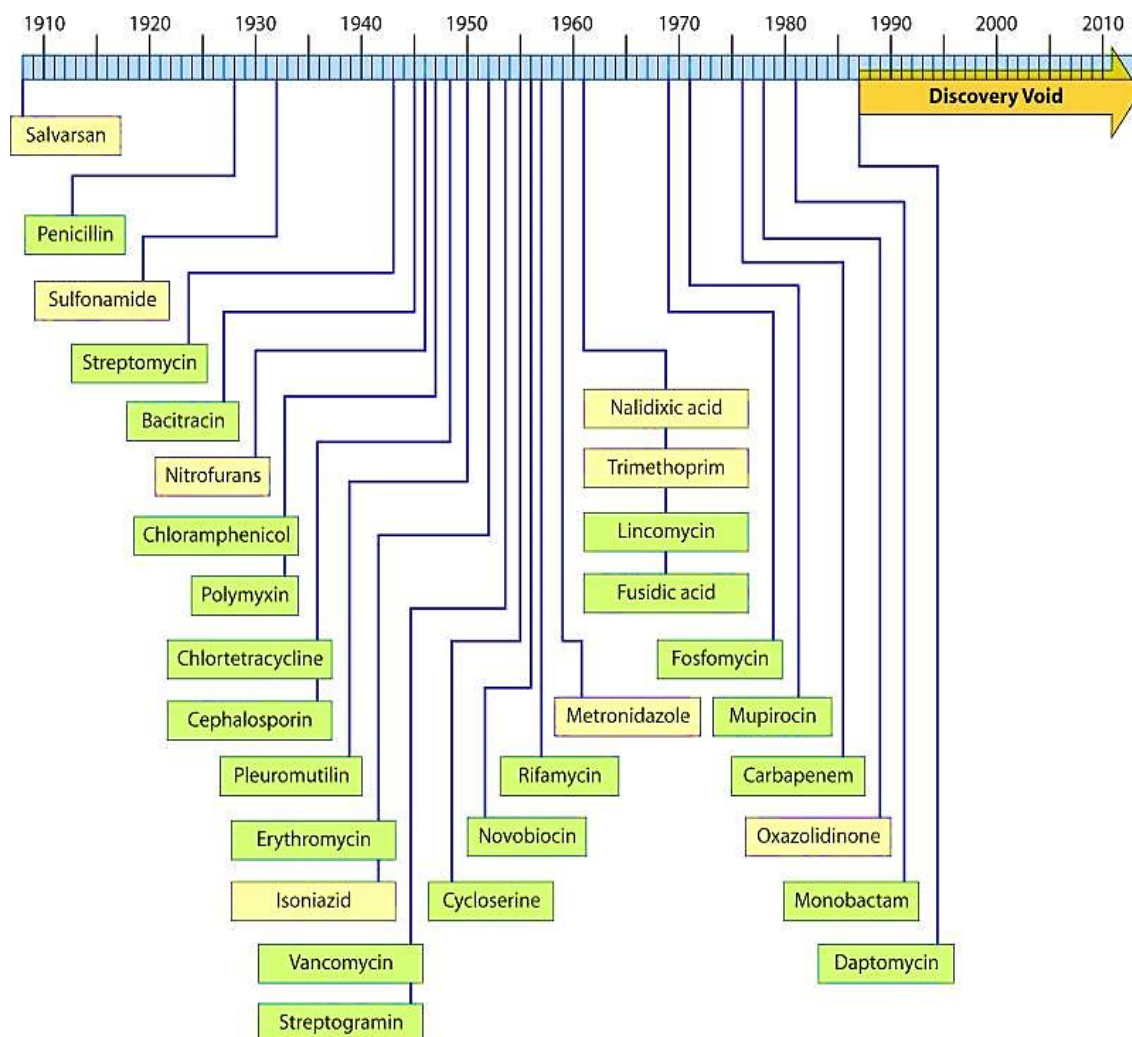


Figura 3 – Cronologia da descoberta das diferentes classes de antibióticos [Adaptado de (36)].

As diferentes classes de antibióticos distinguem-se não só pela sua estrutura química, mas também pelo seu mecanismo de ação, que lhes confere a capacidade de atuar de forma distinta (37). Os antibióticos possuem diversos mecanismos de ação dentro da célula bacteriana inibindo diferentes processos celulares tais como a replicação, tradução, transcrição, síntese da parede celular (38), síntese proteica, incluindo ainda a alteração da permeabilidade da membrana celular (39). A Figura 4, demonstra as diferentes classes de antibióticos e seus mecanismos de ação em bactérias.

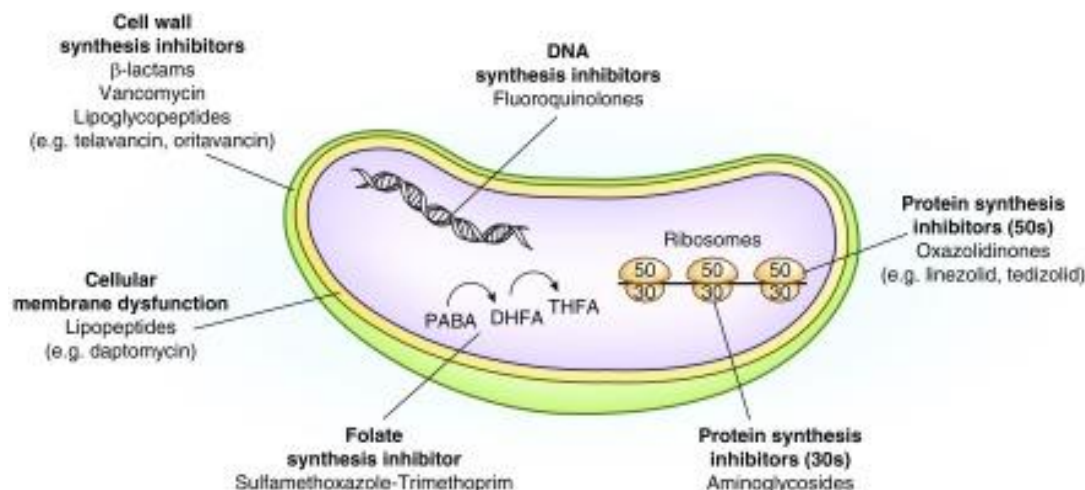


Figura 4 - Classes de antibióticos e respectivos mecanismos de ação em bactérias [adaptado de (40)].

1.2.1. Antibióticos para o tratamento de infecções por *E. coli*

No ano de 2015, *E. coli* foi a bactéria patogénica resistente a antibióticos mais frequentemente isolada na UE, tendo sido responsável por mais de 300000 infecções e mais de 9000 mortes (41). A identificação destas bactérias e a determinação da sua suscetibilidade aos antibióticos é fundamental para o tratamento destas infecções (42). Normalmente, têm sido administrados antibióticos da classe dos β -lactâmicos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e trimetoprim-sulfametoxazol, para o tratamento de infecções comunitárias e hospitalares provocadas por *E. coli* ao longo dos anos (43).

1.2.1.1. β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos constituem a classe mais vezes prescrita para o tratamento às infecções bacterianas, representando cerca de 65% do consumo total de antibióticos (44). No entanto, nos dias de hoje o uso desta classe de antibióticos está associado à resistência bacteriana (44). Os antibióticos β -lactâmicos possuem, em comum, um anel composto por três carbonos e um azoto, tornando este anel bastante reativo (44). O mecanismo de ação desta classe de antibióticos envolve a inibição da última etapa da síntese do peptidoglicano por acilação da transpeptidase (45). Esta classe de antibióticos atravessa a membrana externa, tendo como alvo as *Penicillin-binding proteins* (PBPs) que catalisam a transpeptidação da camada de peptidoglicano em bactérias Gram-

negativas (46). Quando o antibiótico atinge este alvo, ocorre interrupção do processo de transpeptidação e, como consequência, perda de viabilidade e lise da célula bacteriana (45).

Dentro desta classe existem diferentes subclasses: penicilinas, cefalosporinas, monobactams e carbapenems (47). Todas as subclasses apresentam o anel β -lactâmico na sua estrutura, e ligam-se e inativam as PBPs responsáveis pela formação da parede celular bacteriana (48).

As **penicilinas** inibem a síntese da parede celular bacteriana, e a sua atividade antibacteriana depende do grupo ao qual pertencem, por exemplo as penicilinas de origem natural apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas e as aminopenicilinas contra algumas Gram-negativas e Gram-positivas (49).

As **cefalosporinas** contêm um anel de dihidrothiazina junto ao núcleo β -lactâmico e são mais resistentes à abertura do anel β -lactâmico por hidrólise, quando comparadas com as penicilinas (50). As cefalosporinas de primeira geração são mais eficientes contra bactérias Gram-positivas, mas apresentam alguma ação em bactérias Gram-negativas como *E. coli* (50). Estas cefalosporinas incluem os antibióticos cefalexina, cefadroxil, cefalotina e cefapirina (50). A segunda geração de cefalosporinas é mais eficiente contra bactérias Gram-negativas, constituindo o grupo terminal C3 a principal diferença relativamente à primeira geração. Esta geração de cefalosporinas inclui os antibióticos cefaclor, loracarbef, cefprozil, cefuroxima, cefprozil e cefamandol (50).

A terceira geração de cefalosporinas contém diferentes graus de hidrofília, cujo aumento contribui para a difusão através de porinas da parede celular de bactérias Gram-negativas (50), e apresenta maior estabilidade à ação das β -lactamases do que as duas gerações anteriores, em particular às β -lactamases produzidas por bactérias Gram-negativas. Cefotaxima, ceftizoxima, ceftriaxona e cefoperazona são alguns exemplos de cefalosporinas de 3ª geração (50).

Quando comparadas às de terceira geração, as cefalosporinas de quarta geração possuem o mesmo espectro de atividade em bactérias Gram-negativas, maior atividade contra Gram-positivas, e são menos sensíveis à hidrólise por β -lactamases. Estes antibióticos também apresentam uma difusão rápida pela membrana externa das bactérias Gram-negativas, devido ao aumento da polaridade. Este grupo inclui os antibióticos semissintéticos cefepime e ceftipirina (50). Por último, as cefalosporinas de quinta

geração incluem ceftarolina e ceftobiprole (50), sendo as primeiras ativas contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, e organismos produtores de β -lactamases (51), e as segundas ativas contra *E. faecalis* produtores de β -lactamase e resistentes à vancomicina (52).

Os **monobactams** podem ser sintetizados, como o aztreonam aprovado em 1984, ou podem ser encontrados na natureza, porém estes têm menor atividade antimicrobiana (50). O aztreonam contém uma estrutura monobactâmica ligada ao ácido sulfônico, no grupo de azoto do anel β -lactâmico (50). A estabilidade do aztreonam às β -lactamases deve-se a presença do substituinte metil no carbono β (C2) do anel β -lactâmico (50). Devido às suas propriedades físico-químicas singulares, este antibiótico tem um espectro amplo contra bactérias aeróbias Gram-negativas, pela fácil difusão na membrana externa, todavia não apresenta atividade contra bactérias anaeróbias ou Gram-positivas (50).

Os **carbapenemos**, que incluem o doripenem, ertapenem, imipenem e meropenem, são considerados os antibióticos β -lactâmicos mais promissores contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (48). São resistentes à hidrólise pela maioria das β -lactamases, podendo em alguns casos agir como inibidores de β -lactamases (50). Os carbapenemos já foram considerados o último recurso mais confiável no tratamento de infecções por microrganismos Gram-negativos de tratamento mais difícil em doentes hospitalares (48). No entanto, já existem bactérias produtoras de carbapenemases, atualmente (41).

1.2.1.2. Fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas foram introduzidas após os antibióticos β -lactâmicos e são conhecidas por possuírem um sistema bicíclico na sua estrutura. O mecanismo de ação das fluoroquinolonas deve-se à inibição da replicação do DNA bacteriano. A DNA girase constitui o alvo primário de ação das fluoroquinolonas. Esta enzima promove uma estrutura super-helicoidal do DNA da bactéria, pelo que a sua inibição impede a replicação do material genético da bactéria (53). Para além da inibição da atividade da DNA girase, as fluoroquinolonas também podem inibir a atividade das topoisomerasas IV responsável pelo relaxamento do DNA (53). É uma classe de antibióticos altamente ativa contra bactérias aeróbias Gram-positivas e Gram-negativas (53). As fluoroquinolonas de primeira geração incluem por exemplo a cinoxacina, a segunda

geração é constituída por norfloxacin, lomefloxacin, enoxacin, ofloxacin e ciprofloxacin, e as de terceira geração incluem levofloxacin, esparfloxacin, gatifloxacin, e moxifloxacin (53). Por último, as fluoroquinolonas de quarta geração incluem o antibiótico trovafloxacin (53).

1.2.1.3. Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são constituídos por um grupo amino e um grupo de açúcar e a sua atividade é mais favorável a pH alcalino (54). O seu mecanismo de ação consiste em inibir a síntese proteica, através da ligação à pequena subunidade (30S) dos ribossomas das células bacterianas (55). Em termos de espetro de atividade, os aminoglicosídeos são eficazes contra a maioria das bactérias aeróbias Gram-negativas adquiridas na comunidade, *P. aeruginosa* e *E. coli* multirresistentes. No entanto, são ineficazes contra bactérias anaeróbias porque não existe energia derivada do metabolismo aeróbio e, consequentemente, não ocorre absorção do antibiótico através das membranas celulares bacterianas (56). Os principais aminoglicosídeos incluem tobramicina, gentamicina, estreptomicina, ampicacina, netilmicina, canamicina e a neomicina (57). Entre estes, a gentamicina é a mais utilizada, não só pelo seu baixo custo, mas também pela sua atividade segura no tratamento de infeções por bactérias aeróbias Gram-negativas (57).

1.2.1.4. Trimetoprim-sulfametoxazol

O trimetoprim-sulfametoxazol (SMX) é uma combinação de trimetoprim com sulfametoxazol, um fármaco da classe de antibióticos das sulfonamidas. É frequentemente utilizada no tratamento de várias infeções bacterianas, pela interferência com a biossíntese de ácido tetrahidrofólico, fundamental para a síntese de proteínas e nucleotídeos das bactérias (58). Na sua forma individual, ambos os medicamentos atuam apenas de forma bacteriostática (40).

1.3. Mecanismos de resistência aos antibióticos

Os antibióticos permitiram, ao longo das últimas décadas, reduzir o impacto das doenças infecciosas, em milhões de pessoas em todo o mundo (59). Contudo, estes benefícios foram confrontados pelo surgimento de estirpes bacterianas resistentes aos antibióticos ao longo dos anos (59).

A resistência bacteriana pode ser intrínseca ou adquirida (60). A resistência intrínseca é independente da pressão seletiva antibiótica e da transferência horizontal de genes e pode dever-se a: i) ausência de afinidade do antimicrobiano pelo alvo celular; ii) inacessibilidade do antimicrobiano, devido a permeabilidade reduzida ou à sua expulsão por bombas de efluxo; iii) degradação enzimática (61) (62). A resistência adquirida é mediada por mecanismos tais como: a transferência horizontal de genes (transformação, transdução e conjugação); mutações no DNA cromossômico da bactéria (modificação do alvo, inativação do fármaco, sobre-expressão de bombas de efluxo); transmissão de genes de resistência mediada por plasmídeos (63). Esta diversidade de mecanismos de resistência encontra-se demonstrada na Figura 5 (64).

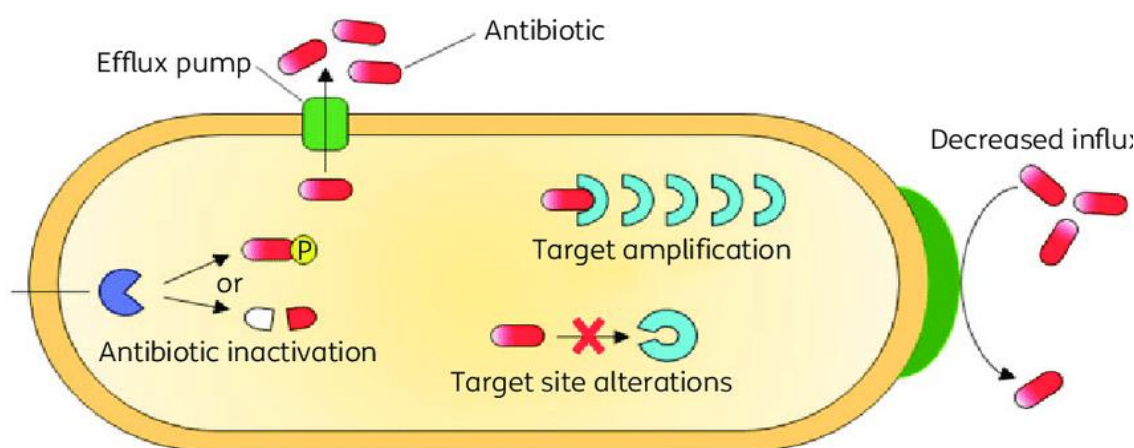


Figura 5 - Representação esquemática de mecanismos de resistência aos antibióticos em bactérias [Adaptado de (64)].

1.3.1. Evolução da resistência aos antibióticos em *E. coli*

O principal mecanismo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em *E. coli* é a produção de β -lactamases (59). Estas enzimas hidrolisam o anel β -lactâmico, formando-se um metabolito que não se liga as PBPs e, como consequência, não ocorre inibição da síntese do peptidoglicano (50). Os genes que codificam para as β -lactamases encontram-se frequentemente em plasmídeos que codificam para diferentes genes de resistência. A aquisição desses genes de resistência e a sua transferência dão origem a bactérias multirresistentes (59). Desde a sua descoberta, foi necessário utilizar determinados critérios para diferenciar e classificar as β -lactamases, nomeadamente: ponto isoelétrico; massa molecular; atividade relativa para diferentes β -lactâmicos; interação com

inibidores; características do sítio ativo; sequência de aminoácidos; e estrutura tridimensional (50). De acordo com a sua homologia de sequência e características do sítio ativo, as β -lactamases podem ser categorizadas em quatro classes de enzimas (41). As classes A, C e D contêm no seu sítio ativo um resíduo de serina (para a hidrólise do anel β -lactâmico), enquanto a classe B (metalo- β -lactamases) requer o cofator de íon zinco (41) (50). A Figura 6 demonstra o diagrama da classificação de Ambler das β -lactamases.

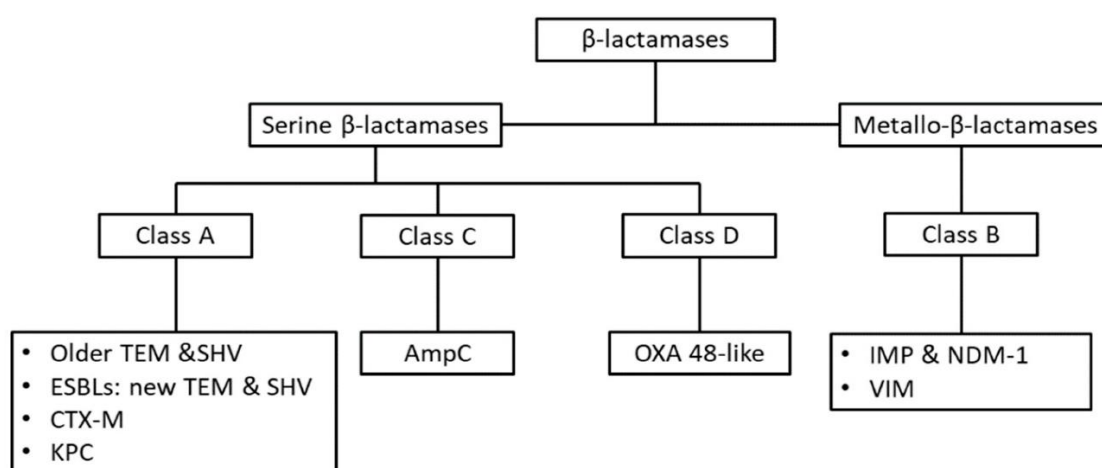


Figura 6 - Diagrama da classificação de Ambler baseado na estrutura primária da proteína de cada enzima [adaptado de (41)]. Abreviaturas: ESBL: β -lactamase de largo espectro; TEM, Temoniera; SHV, variável sulfidril; CTX-M, Cefotaxima β -lactamase; KPC, *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase; OXA, oxacilinase; IMP, imipenemase; NDM-1, *New Delhi metalobetalactamase*; VIM, *Verona integron-borne metallo-beta-lactamase*.

Em *E. coli*, foram identificadas diversas β -lactamases, tais como a AmpC, β -lactamase de largo espectro (ESBL), e carbapenemases das classes A, B e D (41). As ESBLs incluem as variantes SHV-ESBLs, TEM-ESBLs e CTX-M-ESBLs (41). A utilização de cefalosporinas de terceira geração e de fluoroquinolonas foi identificada como fator de risco para seleção de ESBLs (65). De facto, as estirpes de *E. coli* resistentes às cefalosporinas de terceira geração foram responsáveis por 297000 infeções anuais na UE das quais 88,6% foram provocadas por *E. coli* produtoras de ESBLs (41). De forma a contornar este mecanismo de resistência, tentou-se desenvolver uma série de penicilinas semissintéticas (66).

O uso combinado de antibióticos β -lactâmicos de largo espectro e inibidores de β -lactamases tem sido frequentemente utilizado no tratamento destas infeções (50). No

entanto, devido ao aumento da resistência às cefalosporinas de terceira geração e de estirpes produtoras de ESBL e AmpC, a utilização de carbapenemos tornou-se a única opção de tratamento para infecções graves por *E. coli* e outras bactérias Gram-negativas (67). Porém, nos últimos anos, têm se vindo a observar resistência aos carbapenemos em *E. coli* e outras bactérias Gram-negativas, por carbapenemases, resultando na resistência a todos os antibióticos β -lactâmicos disponíveis (67). Para além da produção de carbapenemases, a resistência aos carbapenemos pode resultar também da produção das bombas de efluxo e superexpressão de AmpC ou ESBLs (41). As carbapenemases mais prevalentes em *E. coli* incluem a NDM (Classe A) e a OXA-48 (Classe D) (41). Na UE, entre os anos 2007-2015, o número de infecções por *E. coli* resistente a carbapenemases aumentou em cerca de 2000 e 5 vezes mais em mortalidade (41). O tratamento com antibióticos de último recurso como tigeciclina ou colistina poderá ser uma estratégia para tratamento de infecções por *E. coli* resistente aos carbapenemos (67). Porém, já foi observada resistência à colistina por aquisição mediada por plasmídeo dos genes *mcr-1* e *mcr-2*, o primeiro identificado em 32 países e o segundo em apenas um país (41).

As principais enzimas encontradas em *E. coli*, associadas à resistência aos aminoglicosídeos, por modificarem estes antibióticos, incluem as acetiltransferases, fosfotransferases e nucleotidiltransferases (41).

A combinação de SMX, utilizado para o tratamento da infeção urinária adquirida na comunidade, caiu em desuso, devido ao desenvolvimento de resistência. Os mecanismos de resistência incluem a superprodução de diidrofolato redutase por mutação do promotor, causando resistência ao trimetoprim, ou por mutações no gene do dihidropteroato sintase que causa resistência ao sulfametoxazol (41).

As fluoroquinolonas e quinolonas foram bastante usadas no tratamento de infeções provocadas por bactérias Gram-negativas, nomeadamente infeções urinárias (4). No entanto, devido ao seu uso generalizado, surgiu resistência a esta classe de antibióticos (68). Atualmente, a resistência às fluoroquinolonas em *E. coli* é elevada em países europeus, variando de 25% a 50% e a incidência de estirpes resistentes tem vindo a aumentar (69). A resistência às fluoroquinolonas encontra-se associada a: mutações nas regiões conservadas dos genes alvo *gyrA/B*, *parC/E* e *gyrB*; concentrações reduzidas do fármaco no local alvo devido a mutações na porina OmpF localizada na membrana externa; e sobre-expressão da bomba de efluxo AcrAB-TolC (69). Em condições “wild-

type”, a expressão desta bomba de efluxo é baixa devido à regulação negativa exercida por AcrR (repressor local). No entanto, foi descrito que mutações em *acrR* contribuem para a sobre-expressão deste sistema de efluxo (68).

Dos mecanismos de resistência referidos, o trabalho efetuado nesta Dissertação focou-se na resistência mediada por bombas de efluxo em *E. coli*.

1.4. Sistemas de efluxo em *E. coli*

As bombas de efluxo atuam como mecanismo de resistência em bactérias Gram-negativas, pela extrusão de solutos para exterior da célula (70). Este mecanismo, permite às bactérias regular o seu ambiente intracelular removendo substâncias tóxicas, que incluem antimicrobianos, metais pesados e poluentes orgânicos (71). As bombas de efluxo podem ser de espectro específico e exportar apenas um substrato ou substratos da mesma classe química, ou amplo e exportar substratos estruturalmente diferentes (72). O primeiro mecanismo de resistência a antibióticos mediado por bombas de efluxo foi descoberto para a tetraciclina. Atualmente, reconhece-se que as bombas de efluxo constituem um mecanismo de resistência presente em todos os organismos (71).

Os sistemas de efluxo podem ser classificados de acordo com as suas características bioenergéticas e estruturais: transportadores primários e transportadores secundários (Figura 7). Os primeiros incluem as proteínas do tipo *ATP-binding cassette* (ABC), e os segundos, são constituídos por 4 famílias: *Major Facilitator Superfamily* (MFS), *Small Multidrug Resistance* (SMR), *Resistance/Nodulation/cell Division* (RND), e *Multidrug And Toxic compounds Extrusion* (MATE) (73).

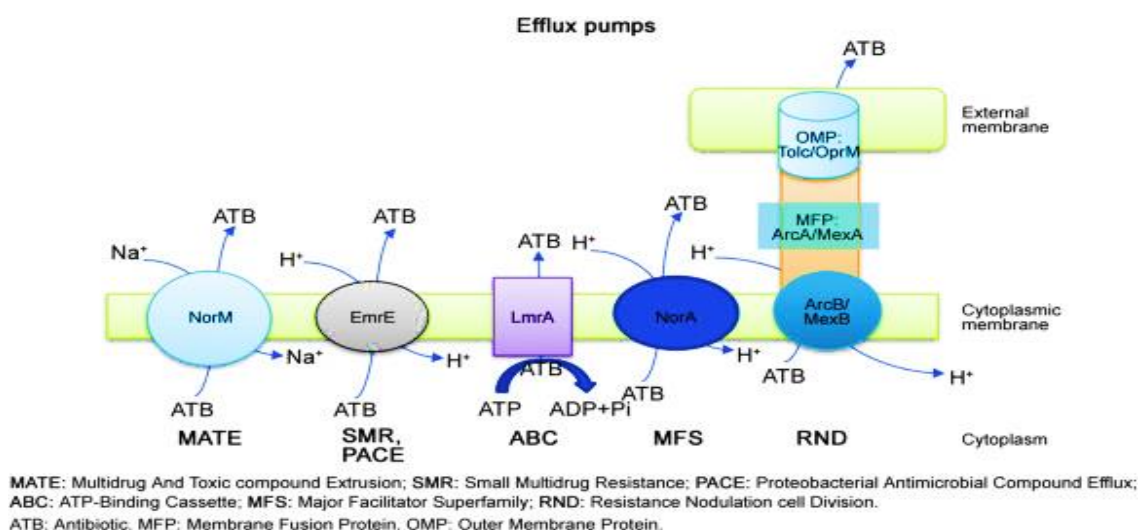


Figura 7 - Esquema das principais famílias dos transportadores transmembranares [Adaptado de (74)].

Qualquer uma destas famílias apresenta domínios transmembranares que vão alterando a sua conformação consoante as diferentes condições de transporte do substrato (73). Recentemente, foi descoberta a família *Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux* (PACE). Não se sabe muito acerca desta família de transportadores, mas pensa-se que estará envolvida no efluxo de antimicrobianos (73).

1.4.1. Transportadores primários

A família de transportadores ABC (73) é constituída por proteínas de membrana cuja função é transportar ativamente substratos (75) contra o gradiente de concentração, através da hidrólise de ATP (78). Estas proteínas possuem um papel fulcral no transporte de agentes antimicrobianos, açúcares, toxinas, proteínas, polissacáridos, aminoácidos e iões (78). Os transportadores ABC possuem duas unidades centrais: um dímero de domínio de ligação de nucleotídeo intracelular (NBD) e um dímero de domínio de membrana (DM). O NBD liga-se e hidrolisa ATP na interface do dímero, enquanto o DM atua como uma via transmembranar para substratos (73). A proteína MsbA faz o transporte de LPS da camada interna (citoplasmática) para a camada externa da membrana interna (periplasmática), e reconhece e transporta um amplo espectro de moléculas de fármacos (77).

1.4.2. Transportadores secundários

Os transportadores secundários usam um gradiente eletroquímico e um gradiente de prótons, designado de Força Proto-Motriz (FPM), para efetuarem o transporte de moléculas (73). Relativamente à atividade de efluxo, estas bombas dependem da utilização de um gradiente de prótons, trocando um ião H^+ por uma molécula de antibiótico, mediado por dois domínios transmembranares, o TM4 e o TM10 (78). Os transportadores mais relevantes, em bactérias Gram-negativas, são membros da superfamília RND (78), sendo que o genoma de *E. coli* revelou a presença de pelo menos 7 proteínas transportadoras desta família (79). Até ao momento, o sistema de efluxo RND melhor caracterizado é o AcrAB-TolC de *E. coli*. Trata-se de um sistema tripartido (Figura 8) constituído por uma proteína transportadora na membrana interna (AcrB) que aprisiona os substratos dentro da bicamada fosfolipídica da membrana interna da célula e, posteriormente, transporta-os para o meio extracelular através de um canal de proteína da membrana externa (TolC). No entanto, esta associação AcrB e TolC só é possível devido a uma proteína acessória periplasmática, a AcrA (78). Em *E. coli*, a proteína MarA tem um papel importante, uma vez que é a responsável por controlar a expressão do operão *acrAB* e *tolC* (78).

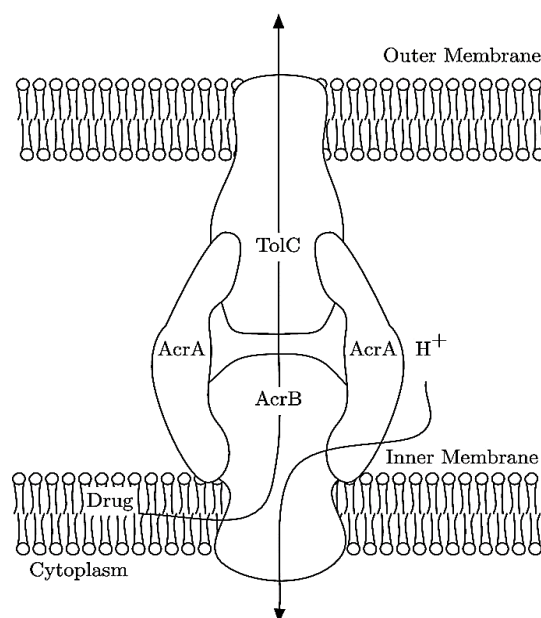


Figura 8 - Esquema do sistema tripartido AcrAB-TolC [Adaptado de (80)]

A maior família de transportadores secundários é a MFS. A nível estrutural é muito conservada e têm especificidades de substrato distintas (73). A família MFS é constituída por sistemas de efluxo tripartidos, estimulados pela FPM, responsáveis pelo transporte de açúcares, aminoácidos, vitaminas e outros iões, através de 3 formas distintas: uniporte, simporte ou antiporte (81). Já foram descritas pelo menos 3 proteínas de membrana do tipo MFS em *E. coli*: Bcr, EmrD e MdfA (82). A proteína Bcr é responsável pela resistência à biciclomicina e, possivelmente, a outros antibióticos estruturalmente não relacionados (82). A proteína EmrD protege contra desacopladores, por exemplo, o carbonilcianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP), enquanto MdfA está associada com a resistência ao cloranfenicol (82).

Os transportadores da família SMR são compostos por cerca de 100 a 120 resíduos de aminoácidos, por vezes compostos por duas subunidades homólogas (73). A proteína ErmE de é um transportador desta família, que através do antiporte substrato/protão pela FPM, promove a saída de catiões lipofílicos como etídio, detergentes, desinfetantes, tetraciclina, eritromicina, entre outros (73). A proteína YnfA é outro transportador SMR em *E. coli* que se pensa estar associado com a resistência aos antibióticos (83).

Os transportadores da família MATE usam um gradiente eletroquímico, por vezes mediado por iões de sódio, para efetuar a extrusão de substâncias catiónicas endógenas, substâncias lipofílicas e xenobióticos (73). Pensa-se que estarão associados ao desenvolvimento de resistência a múltiplos fármacos tais como aciclovir, procainamida, cefalexina, cimetidina e metformina (84).

Dada a sua importância na emergência de resistência aos antimicrobianos, as bombas de efluxo constituem alvos atrativos para o desenvolvimento de fármacos que possam ser utilizados em novas estratégias terapêuticas.

1.5. Inibidores de efluxo e modo de ação

Atualmente, devido ao aumento de bactérias Gram-negativas multirresistentes, existe uma redução das opções terapêuticas disponíveis, e, por isso, estamos perante um problema grave para a saúde humana (85). Portanto, é crucial o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos ou novos adjuvantes da ação de antibióticos atuais que permitam combater a emergência da resistência (85).

O desenvolvimento de inibidores de efluxo (IEs) aumenta a suscetibilidade das bactérias Gram-negativas aos antibióticos, uma vez que já foi demonstrado que estes compostos promovem a atividade dos antibióticos em bactérias resistentes (85). Para além disso, os IEs permitem reduzir a seleção de mutantes resistentes e diminuir a virulência de estirpes patogênicas (85). A inibição das bombas de efluxo por compostos IEs, pode ocorrer através da inibição da atividade, da expressão ou da montagem do sistema de efluxo (85). Por exemplo, a família RND pode ser inibida através do comprometimento da FPM, ou pela inibição do local de ligação do composto nessa mesma bomba (86).

Para identificar potenciais IEs, pode-se fazer uma pesquisa de fármacos que já sejam usados em uso clínico e reposicioná-los para este alvo. No entanto, existem duas condições que devem estar bem descritas: a sua farmacocinética e toxicologia. Esta estratégia é vantajosa uma vez que é mais rápida e o custo associado é menor, comparativamente com o que seria necessário ao desenvolver um novo fármaco (87). Atualmente, já foram identificadas diferentes classes de IEs, tais como: peptidomiméticos, piperazinas, piridopirimidinas e piranopirimidinas (87). No entanto, estes inibidores não estão disponíveis clinicamente (88) devido à sua toxicidade (87). A Tabela 1 demonstra alguns dos exemplos de potenciais IEs em *E. coli*.

Tabela 1 - Potenciais IEs, respetivos alvos em *E. coli*, e antibióticos com os quais se demonstrou efeito sinérgico.

Potenciais IEs	Alvo	Sinergia com antibióticos	Referência
CCCP	FPM	-	(89)
PaßN e cloranfenicol	Transportador RND	Cefalosporinas	(90)
NMP	Transportador RND	Fluoroquinolonas, ciprofloxacina, tetraciclina e florfenicol	(86) (91)
Cpz Tz	Transportador RND	Aminoglicosídeos	(92)
MBX2319	AcrB	Ciprofloxacina, levofloxacina e piperacilina	(93) (94)
Ácido clorogénico	AcrB	Tetraciclina e ácido nalidíxico	(95)

CCCP, Cianeto de carbonil m -clorofenilhidrazona. NMP, 1-(1-naftilmetil)-piperazina. Cpz, Clorpromazina, Tz, tioridazina.

Estudos anteriores descreveram outros potenciais IEs. O PA-Fluor apresentou um efeito sinérgico com o brometo de etídio (EtBr), clorpromazina (Cpz) e com os antibióticos ciprofloxacina, e norfloxacina (96). O 4-bromopirrol-2-carboxilato de etila demonstrou um potencial efeito como adjuvante da atividade de vários antibióticos em bactérias Gram-negativas (88). Para além destes, o composto Difenilmetano também demonstrou ser um potencial inibidor das bombas de efluxo em *E. coli* resistente a antibióticos (97). O uso de inibidores de efluxo, em combinação com antibióticos, tem vindo a demonstrar resultados promissores ao tornar suscetíveis bactérias que eram resistentes a esse antibiótico (86). No entanto, este efeito depende do antibiótico em estudo, concentração em que é testado, diferentes locais de ligação do antibiótico, e/ou do inibidor em estudo. Assim, é importante clarificar a classificação dos diferentes potenciais IEs, relativamente à sua atividade nos sistemas de efluxos e, a sua eventual sinergia com as diversas classes de antimicrobianos, de forma a obter informação essencial para próximos estudos e pesquisas (98).

1.5.1. Fenotiazinas

As fenotiazinas são utilizadas para tratar patologias do foro psiquiátrico, tais como esquizofrenia, comportamentos violentos e transtornos de bipolaridade. Estes agentes atuam nos recetores dopaminérgicos bloqueando a neurotransmissão através da ligação a diversos recetores, como os da dopamina (99). As fenotiazinas destabilizam o potencial de membrana por serem bloqueadoras dos canais de cálcio (100). Em células procariotas, as fenotiazinas atuam ao nível da membrana plasmática, nomeadamente na regulação da permeabilidade, na inibição de enzimas envolvidas na produção de energia (ATPases), e nos sistemas de efluxo (101).

A primeira fenotiazina utilizada como antipsicótico foi a Cpz (99), originalmente administrada em indivíduos com esquizofrenia ou maníaco-depressivos (102). Verificou-se que existiam menos casos de infeções bacterianas nas enfermarias psiquiátricas quando comparadas a outros serviços hospitalares, levando a que nos anos seguintes fosse determinada a atividade antimicrobiana da Cpz (101).

Após aproximadamente 30 anos de investigação, este fármaco demonstrou atividade antimicrobiana em concentrações elevadas (101). No entanto, observou-se que em concentrações mais baixas, a Cpz promove a ação de vários antibióticos e aumenta a

acumulação de EtBr e outros substratos da bomba de efluxo AcrB dentro da célula (87). A fenotiazina tioridazina (Tz) é também um antipsicótico conhecido por ter propriedades de inibição de efluxo, semelhantes aos da Cpz (100).

1.6. Estratégias para o desenvolvimento de novos fármacos

A resistência aos antimicrobianos está a aumentar cada vez mais e a tornar-se um problema mundial severo (103). Existem algumas estratégias utilizadas para tentar contornar esta problemática, tais como usar antibióticos de espectro estreito, uso combinado de fármacos, e o desenvolvimento de novos antibióticos (103). Porém, o processo de desenvolvimento de novos antibióticos não está a conseguir acompanhar a emergência de resistência (103).

São muitos os desafios no desenvolvimento de novos fármacos, sendo algumas das limitações o tempo prolongado (superior a 10 anos) e altos custos associados à sua pesquisa e desenvolvimento (104). As principais limitações que contribuem para as falhas do desenvolvimento de um novo medicamento são as condições de segurança na fase inicial e, posteriormente, a baixa eficácia em ensaios clínicos de Fase III (105). Frequentemente, a eficácia de um novo antibiótico requer a utilização de doses mais altas, quando comparado a outros fármacos e, consequentemente, pode ocorrer a falha em estudos de toxicidade (103).

Assim, é importante encontrar estratégias mais eficientes quanto ao desenvolvimento de novos antibióticos eficazes e que entrem em uso clínico. Atualmente, o reaproveitamento ou reposicionamento de medicamentos tem sido uma estratégia utilizada na identificação de novos potenciais antimicrobianos (104). É considerada uma estratégia mais económica porque identifica novas indicações para fármacos já aprovados ou em investigação, contorna o alto risco em termos de segurança e apresenta menores custos e tempo de desenvolvimento associados à sua investigação e desenvolvimento (106). Por estes motivos, o reposicionamento de fármacos tem mostrado ser uma estratégia promissora, que acelera o todo o processo de desenvolvimento de um novo medicamento (104).

A Figura 9 demonstra a comparação do processo convencional de descoberta de novos medicamentos com o reposicionamento de fármacos, até os mesmos chegarem ao mercado.

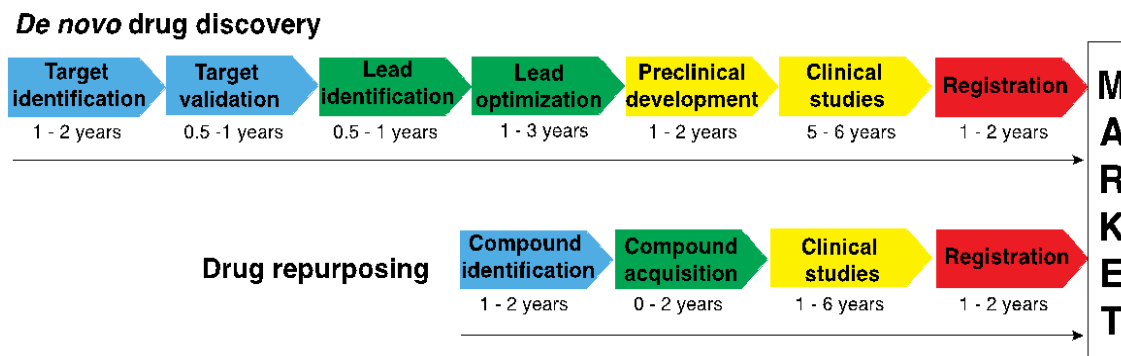


Figura 9 - Comparação do cronograma da descoberta de novos antibióticos com o cronograma de reposicionamento de fármacos [Adaptado de (107)].

Observando a Figura 9, é possível verificar que o processo de desenvolvimento de um novo fármaco demora cerca de 10 a 17 anos até chegar ao mercado, e o reposicionamento cerca de 3 a 12 anos. O segundo processo tem maiores probabilidades de sucesso, quando comparado ao primeiro, pois os parâmetros de segurança e farmacocinética já são previamente conhecidos (107).

1.6.1. Reposicionamento de fármacos

O reposicionamento é uma estratégia atraente em termos comerciais e sociais (105). O risco de falha em ensaios clínicos é menor, possui a possibilidade de prolongar a patente de um medicamento, e promove colaborações mútuas e oportunidades financeiras (108). Desta forma, tem sido considerada uma estratégia promissora, uma vez que permite o desenvolvimento de medicamentos mais seguros para os doentes e oferece benefícios a quem os desenvolver (105). Porém, existem algumas limitações nesta estratégia, tais como: investimento inicial, diretrizes regulatórias bem definidas, potencial perda de tempo de desenvolvimento, requer conhecimento das vias biológicas e moleculares e as interações com biomoléculas endógenas, e por vezes, disponibilidade limitada de voluntários (108).

Os progressos na área da bioinformática permitiram desenvolver ainda mais as estratégia de reposicionamento, ao disponibilizar uma variedade de ferramentas *in silico* (106). De

facto, o reposicionamento de fármacos é constituído por duas estratégias (108): experimental, correspondente a ensaios de ligação, triagem fenotípica, interações de ligação de moléculas e identificação de compostos candidatos a partir de bibliotecas de compostos; e computacional que inclui abordagens fundamentadas em mecanismos através da bioinformática e que exploram alvos conhecidos, fármacos, biomarcadores ou vias de doenças para estabelecer novos métodos. Por outro lado, distinguem-se três métodos principais de reposicionamento: o primeiro consiste na realização de ensaios fenotípicos através da triagem de compostos em bibliotecas de compostos farmacêuticos comerciais; o segundo envolve a utilização de abordagens de genómica e bioinformática; e o terceiro baseia-se numa abordagem de descoberta aleatória independentemente dos tipos de configurações. Se for identificada uma molécula com resultados promissores, esta será sujeita as etapas de avaliação clínica (109). As triagens virtuais reduzem o tempo e custos, ao permitir a identificação rápida e económica de ligantes-alvo a partir de grandes bibliotecas de compostos aprovados, com características farmacológicas e citotoxicidade já conhecidas (110).

Alguns compostos anti-inflamatórios, antidepressivos, antipsicóticos e estatinas já demonstraram potencial em inibir/reduzir o crescimento de microrganismos (111). Entre esses compostos estão incluídos os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), tais como: acetaminofeno, ácido acetilsalicílico, diclofenaco e ibuprofeno. Os inibidores da recaptação de serotonina são a principal classe de antidepressivos, e têm demonstrado atividade antimicrobiana, nomeadamente pela inibição de bombas de efluxo (111). O mesmo estudo determinou a atividade da sertralina, de forma individual e em combinação com sete antibióticos, em estirpes de referência de *E. coli*, demonstrando algum efeito antibacteriano (111). As estatinas constituem medicamentos hipolipemiantes, que incluem a atorvastatina e a sinvastatina, e também já foram destacadas pelos seus efeitos antimicrobianos (111).

Geralmente, quando é identificada uma nova atividade de um composto aprovado, este na sua forma isolada poderá não ser o suficiente como terapêutica clínica. Porém, é expectável que, ao utilizar combinações sinérgicas com outros fármacos, seja possível aumentar a sua eficácia (112).

1.6.2. Interações sinérgicas entre fármacos reposicionados e antibióticos

A utilização de um fármaco reposicionado em combinação com um antibiótico em uso clínico pode constituir uma estratégia mais promissora no combate contra bactérias resistentes aos antimicrobianos (113). Os fármacos reposicionados podem apresentar capacidade de adjuvante, através da modulação da atividade de antibióticos já conhecidos, potenciando a entrada de outros antimicrobianos nas células-alvo. Desta forma, são designados de compostos adjuvantes (104). Esta estratégia é vantajosa, pois permite utilizar concentrações inferiores às que seriam necessárias se os compostos fossem utilizados individualmente (113), expande a gama de antibióticos disponível e diminui o desenvolvimento de resistência (112). Porém, são necessários novos ensaios clínicos por forma a garantir a segurança e eficácia destas combinações (112), pois os efeitos colaterais tóxicos podem ser mais significativos (109).

O reposicionamento de fármacos, e combinações sinérgicas dos mesmos com antibióticos, poderá constituir uma estratégia promissora para futuras investigações como novas opções terapêuticas contra estirpes resistentes de *E. coli*.

1.7. Objetivos

Esta Dissertação tem como objetivo principal avaliar a atividade de fármacos já aprovados e potenciais candidatos a reposicionamento em *E. coli*.

Os compostos estudados neste trabalho foram identificados num estudo anterior de reposicionamento *in silico* de fármacos contra *Neisseria gonorrhoeae* (118). Partindo do pressuposto de que alvos semelhantes (116) possuem fármacos semelhantes, então os fármacos que foram identificados para *N. gonorrhoeae* poderão também ser promissores contra *E. coli*.

Assim, pretende-se avaliar a atividade antimicrobiana ou ação adjuvante de antibióticos, dos compostos candidatos a reposicionamentos, em estirpes de referência e isolados clínicos de *E. coli*. Pretende-se também determinar se estes compostos apresentam atividade de inibição da atividade de bombas de efluxo, em particular o sistema de efluxo AcrAB-TolC, envolvidas na resistência aos antimicrobianos.

Os objetivos específicos deste trabalho consistem em:

- i) determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos fármacos candidatos a reposicionamento contra três estirpes de referência e um painel de isolados clínicos de *E. coli* com diferentes perfis de suscetibilidade aos antibióticos;
- ii) avaliar o efeito dos fármacos candidatos sobre o valor de CMI de antibióticos e determinar a existência de uma potencial ação adjuvante;
- iii) avaliar o efeito dos fármacos candidatos na atividade de efluxo de *E. coli*, por fluorometria em tempo real.

Este estudo poderá contribuir para o desenvolvimento de uma nova abordagem de identificação de fármacos eficazes contra *E. coli* e para o combate e prevenção da resistência aos antimicrobianos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

2.1.1. Estirpes bacterianas

Neste trabalho, utilizaram-se três estirpes isogênicas e seis isolados clínicos de *E. coli* com diferentes perfis de suscetibilidade aos antibióticos (Tabela 2).

Tabela 2 - Estirpes e isolados clínicos de *E. coli* utilizadas neste estudo.

<i>E. coli</i> ¹		Características de interesse ²
Estirpes de referência	AG100 ⁽¹¹⁵⁾	Wild-type''
	AG100A ⁽¹¹⁵⁾	CAN ^R
	AG100 _{TET} ⁽⁸⁹⁾	TET ^R
Isolados clínicos	27	ERI ^R OXA ^R
	30	TET ^R ERI ^R AMP ^R AMO ^R OXA ^R W ^R SXT ^R
	31	TET ^R ERI ^R CIP ^R OFL ^R AMP ^R AMO ^R PRL ^R OXA ^R CIP ^R LEV ^R NA ^R NOR ^R CXM ^R
	159	TET ^R ERI ^R AMP ^R AMO ^R OXA ^R W ^R SXT ^R
	181	TET ^R ERI ^R AMP ^R AMO ^R OXA ^R W ^R SXT ^R
	182	ERI ^R OXA ^R W ^R SXT ^R

¹Coleção da Unidade de Microbiologia Médica do IHMT-NOVA, ²Perfil de suscetibilidade determinado pelo método de difusão em disco, de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (114). TET, tetraciclina; ERI, eritromicina; CIP, ciprofloxacina; OFL, ofloxacina; GEN, gentamicina; AMP, ampicilina; AMO, amoxicilina; PRL, piperacilina; OXA, oxacilina; CXM, cefuroxima; LEV, levofloxacina; NA, ácido nalidíxico; NOR, norfloxacina; W, trimetoprim; SXT, Trimetoprim – sulfametoxazol; S, suscetível; R, resistente.

As estirpes de *E. coli* utilizadas neste trabalho foram as seguintes: *E. coli* K-12 AG100, de tipo selvagem, que possui o sistema de bomba de efluxo AcrAB-TolC funcional (*argE3 thi-l rpsL xil mtl-(galuvrB)supE44*); *E. coli* AG100A, com o sistema de bomba de efluxo AcrAB-TolC inativo (Δ *acrAB::Tn903Kan^r*), resultado da inserção do transposão Tn903 no operão *acrAB* da estirpe AG100 (115). *E. coli* AG100_{TET} que derivou da estirpe AG100, por exposição a concentrações crescentes de tetraciclina, até se obter uma CMI

de 12 mg/L devida à sobreexpressão de diferentes genes que codificam para bombas de efluxo, nomeadamente o sistema AcrAB (89).

Os isolados clínicos 27, 30, 31, 159, 181 e 182 são parte da coleção do Laboratório de IST da Unidade de Microbiologia Médica do IHMT. O perfil de suscetibilidade de cada isolado foi determinado pelo método de difusão em disco, de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), para os seguintes antibióticos: penicilinas (ampicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, oxacilina, piperacilina, piperacilina-tazobactam e temocilina); cefalosporinas (cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepime e cefuroxima); monobactams (aztreonam); carbapenems (doripenem, imipenem e meropenem); tetraciclina e tigeciclina; quinolonas e fluoroquinolonas (ácido nalidíxico, ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina e ofloxacina); aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina, netilmicina, tobramicina); macrólidos (eritromicina); cloranfenicol; trimetoprim e trimetoprim-sulfametoxazol.

Os isolados 27 e 182 apresentam resistência à eritromicina e à oxacilina. No entanto, o isolado 182 também demonstra resistência ao trimetoprim e a trimetoprim-sulfametoxazol. No caso dos isolados 30, 159 e 181, ocorre resistência a alguns antibióticos da subclasse das penicilinas (ampicilina, amoxicilina-ácido clavulânico e oxacilina), à tetraciclina, à eritromicina, ao trimetoprim, e trimetoprim-sulfametoxazol. O isolado 31 apresenta resistência a alguns antibióticos da subclasse das penicilinas (ampicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, piperacilina e oxacilina), à tetraciclina, à eritromicina, cefuroxima e a todos os antibióticos testados da classe das fluoroquinolonas. A manipulação laboratorial dos microrganismos utilizados nesse trabalho efetuou-se de acordo com as regras de biossegurança para agentes patogénicos de nível 2.

2.1.2. Meios de cultura

A composição dos meios de cultura utilizados para o crescimento das estirpes e isolados clínicos de *E. coli* encontra-se descrita na Tabela 3. Os meios de cultura foram preparados em água destilada e esterilizados por autoclavagem a 121°C durante 15 minutos.

Tabela 3 - Composição dos meios de cultura utilizados neste trabalho.

MEIO DE CULTURA	COMPOSIÇÃO (L)
LURIA BERTANI AGAR (LA)	5 g de extrato de levedura ¹
	10 g de peptona de caseína ¹
	10 g de cloreto de sódio ²
	20 g agar ³
MULLER-HINTON BROTH (MH)³	300 g de infusão desidratada de carne
	17,5 g de caseína hidrolisada
	1,5 g de amido
	0,4347 g Ca ²⁺
	0,6202 g Mg ²⁺

¹Merck (Darmstadt, Alemanha), ²Panreac Química SA, Barcelona, Espanha, ³Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra.

2.1.3. Reagentes e soluções

A composição e modo de preparação dos antibióticos, compostos, glucose e EtBr utilizados neste trabalho encontra-se descrita na Tabela 4. Todas as soluções *stock* dos compostos foram armazenadas a -20°C, exceto as soluções de EtBr, glucose e resazurina, que foram armazenadas a 4°C, ao abrigo da luz.

Tabela 4 - Preparação das soluções *stock* de antibióticos, fármacos candidatos a reposicionamento e outros reagentes utilizados neste trabalho.

COMPOSTOS ¹	NOME	PESO MOLECULAR g/mol	CONCENTRAÇÃO STOCK
FÁRMACOS	Acetazolamida	222,245	10 mg/mL em ddH ₂ O
	Amlodipina	408,879	10 mg/mL em DMSO
	Atovaquone	366,837	10 mg/mL em DMSO
	Benzotiazida	431,940	10 mg/mL em DMSO
	Clorpromazina	318,860	10 mg/mL em ddH ₂ O
	Doxorubicina	543,520	10 mg/mL em ddH ₂ O
	Metformina	129,164	6,7 mg/mL em ddH ₂ O
	Sulpirida	341,427	10 mg/mL em ddH ₂ O
	Tiabendazol	201,249	10 mg/mL em DMSO
	Topiramato	339,363	10 mg/mL em ddH ₂ O
ANTIBIÓTICOS	Canamicina	484,499	10 mg/mL em ddH ₂ O
	Ceftriaxona	554,580	10 mg/mL em DMSO
	Ciprofloxacina	331,346	10 mg/mL em ddH ₂ O + NaOH 0,1M 1:1 (v/v)
	Eritromicina	733,93	10 mg/mL em metanol
	Gentamicina	477,596	10 mg/mL em ddH ₂ O + NaOH 0,1M 1:1 (v/v)
	Ofloxacina	361,368	20 mg/mL em ddH ₂ O + NaOH 0,1M 1:1 (v/v)
	Tetraciclina	444,435	10 mg/mL em DMSO
OUTROS REAGENTES	Brometo de etídio	394,294	10 mg/mL em ddH ₂ O
	Glucose	180,16	20% (p/v) em ddH ₂ O
	Tampão fosfato salino (PBS)	-	Dissolução de uma pastilha em 200 mL H ₂ O
	Resazurina	251,173	10 mg/mL em ddH ₂ O

¹Merck (Darmstadt, Alemanha). ²0,01 M tampão fosfato; 0,0027 M KCl; 0,137 M NaCl; pH 7,4; autoclavado a 12°C por 15 minutos e armazenamento à temperatura ambiente. Soluções preparadas em DMSO diluídas em ddH₂O. ddH₂O, água bidestilada estéril; DMSO, dimetil sulfoxido; NaOH, Hidróxido de sódio; EtBr, brometo de etídio; Cpz, clorpromazina; PBS, tampão fosfato salino.

2.2. Métodos

2.2.1. Comparação das sequências proteicas dos alvos preditivos dos fármacos candidatos identificados em *N. gonorrhoeae* com a sequência de *E. coli*

Com base na identificação *in silico* de fármacos candidatos a reposicionamento contra *N. gonorrhoeae* (116, 117, 118), selecionou-se um grupo de nove compostos que apresentaram como alvos preditivos proteínas envolvidas no metabolismo energético.

Para verificar se estes alvos em *N. gonorrhoeae* seriam semelhantes aos presentes em *E. coli*, fez-se um alinhamento das sequências proteicas de *N. gonorrhoeae*, contra as sequências de *E. coli*. Desta forma, determinou-se a percentagem de identidade entre as proteínas de *N. gonorrhoeae* e *E. coli*, de modo a prever a potencial afinidade pelo mesmo fármaco.

Para esta análise, recorreu-se à base de dados UniProt (<https://www.uniprot.org/>), que contem inúmeras sequências de proteínas e respetivas anotações (119), para obter a sequência proteica em formato FASTA do alvo em *N. gonorrhoeae*. De seguida, utilizou-se a plataforma *online* NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e selecionou-se o algoritmo *blastp* (*protein-protein BLAST*). Inseriu-se a sequência de aminoácidos em formato FASTA da proteína de *N. gonorrhoeae*, e selecionaram-se os seguintes parâmetros de pesquisa: *Standard databases; Non-redundant protein sequences; Escherichia coli* K-12 (120).

2.2.2. Crescimento e manutenção das estirpes bacterianas

O crescimento das estirpes de referência e isolados clínicos de *E. coli* foi realizado em meio LA, após repicagem do *stock* armazenado a -70°C, com incubação a 37°C durante a noite. No caso das estirpes AG100A e AG100_{TET}, o meio de cultura foi suplementado com 100 mg/L de canamicina e com 8 mg/L de tetraciclina, respetivamente.

2.2.3. Determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMI) pelo método de microdiluição.

2.2.3.1. Preparação do inóculo

A partir das culturas das 3 estirpes de *E. coli* e dos 6 isolados clínicos em meio sólido, foram preparadas culturas em 5 mL de meio MH, suplementado com 100 mg/L de canamicina e com 8 mg/L de tetraciclina, para AG100A e AG100_{TET}, respetivamente.

Posteriormente, incubou-se a 37°C com agitação de 220 rpm, até se atingir a uma densidade ótica a 600 nm (DO₆₀₀) de 0,8, medida através de um espectrofotômetro Ultrospec 10 (Biochrom, Cambridge, Reino Unido). Este tempo de incubação foi mais longo para AG100_{TET} (aproximadamente 24 h). De seguida, preparou-se uma suspensão bacteriana em PBS correspondente a 0,5 da escala McFarland Standard e, desta suspensão, efetuou-se uma diluição de 1/20 em meio líquido MH.

2.2.3.2. Determinação de CMIs dos compostos candidatos, antibióticos e EtBr

Para a determinação das CMIs dos compostos candidatos a reposicionamento, antibióticos e EtBr, utilizou-se o método de microdiluição, segundo as recomendações do CLSI (114). Assim, para cada composto em estudo e antibiótico, estabeleceu-se uma gama de concentrações a testar, de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5 - Gama de concentrações (mg/L) testada para cada composto e antibiótico.

Gama de concentração testada (mg/L)		Estirpe
Compostos	Doxorubicina	125-0, 2
		AG100
		AG100A
		AG100 _{TET}
	Acetazolamida	1000-2
		AG100
		AG100A
		AG100 _{TET}
	Tiabendazol	1000-2
		AG100
		AG100A
		AG100 _{TET}
	Atovaquone	1000-2
		AG100
		AG100A
		AG100 _{TET}
	Benzotiazida	1000-2
		AG100
		AG100A
		AG100 _{TET}
	Amlodipina	1000-2
		AG100
		AG100A
		AG100 _{TET}
		1000-2
		Isolados clínicos
	Topiramato	1500-2,9
		AG100
		AG100A
		AG100 _{TET}

¹ Excepto a estirpe 27, em que a gama de concentrações testada para a tetraciclina foi de 3,12-0,05 mg/L. ² Excepto a estirpe 31, em que a gama de concentrações testada para a ciprofloxacina foi de 100-1,56 mg/L.

Tabela 5 - Gama de concentrações (mg/L) testada para cada composto e antibiótico (continuação).

Gama de concentração testada (mg/L)		Estirpe
Compostos	Sulpirida	AG100
		AG100A
		AG100 _{TET}
	Metformina	1500-2,9
Antibióticos	Tetraciclina	1500-2,9
		AG100
		AG100A
		AG100 _{TET}
	Eritromicina	10-0,02
		AG100
		AG100A
	Ciprofloxacina	15-0,03
		AG100A
		AG100 _{TET}
	Canamicina	100-0,2
		AG100 _{TET}
		Isolados clínicos ¹
	Ofloxacina	200-3,12
		AG100
		AG100A
	Ceftriaxona	500- 0,01
		AG100
		AG100A
	Gentamicina	50-0,1
		AG100A
		AG100 _{TET}
EtBr	Ciprofloxacina	800-1,6
		AG100
		AG100A
	Ofloxacina	AG100 _{TET}
		AG100
		AG100A
	Ceftriaxona	1,6-0,003
		AG100
		AG100A
Antibióticos	Canamicina	AG100 _{TET}
		Isolados clínicos ²
		0,04-0,0006
	Ofloxacina	60-0,12
		AG100
		AG100A
	Ceftriaxona	500-0, 98
		AG100A
		AG100 _{TET}
	Gentamicina	40-0,1
		AG100
		AG100A
	EtBr	3-0,006
		AG100
		AG100A
Antibióticos	Ceftriaxona	AG100 _{TET}
		4-0,01
		AG100
	Gentamicina	AG100A
		0,8-0,002
		AG100
	EtBr	0,6- 0,001
		AG100A
		AG100 _{TET}
Antibióticos	Ceftriaxona	0,8-0,002
		AG100
		AG100A
	Gentamicina	AG100 _{TET}
		8-0,02
		AG100
	EtBr	AG100A
		AG100 _{TET}
		Isolados clínicos
EtBr	EtBr	3,12-0,04
		Isolados clínicos
		600-1,2
		AG100
EtBr	EtBr	10-0,02
		AG100A
		500-1,0
		AG100 _{TET}
EtBr	EtBr	600-1,2
		Isolados clínicos
		AG100
		AG100A

¹ Excepto a estirpe 27, em que a gama de concentrações testada para a tetraciclina foi de 3,12-0,05 mg/L. ²

Excepto a estirpe 31, em que a gama de concentrações testada para a ciprofloxacina foi de 100-1,56 mg/L.

Distribuiu-se 0,090 mL de MH ao longo dos poços da placa, à exceção da primeira coluna que diz respeito à concentração mais alta do composto a testar. Posteriormente, adicionou-se 0,180 mL da concentração mais alta para cada composto ao primeiro poço, retirou-se 0,090 mL dos poços da primeira coluna fazendo diluições de 1:2 ao longo da linha, rejeitando 0,090 mL da última. Reservou-se uma coluna para o controlo positivo (com inóculo, sem composto) e uma coluna para controlo negativo (sem inóculo). Por último, adicionou-se 0,010 mL de inóculo, previamente preparado, e incubou-se na estufa a 37°C (121). Após 18 h de incubação, efetuou-se a leitura visual dos resultados e adicionou-se 0,030 mL de uma solução de resazurina a 0,1 mg/mL a todos os poços. Na presença de células viáveis, este composto é convertido na sua forma reduzida (resorufina), mudando a sua cor de azul para cor-de-rosa. Ao fim de cerca de 1 h de incubação a 37°C, efetuou-se a leitura dos resultados sendo a CMI definida como a menor concentração de composto para a qual não se observou crescimento de *E. coli*. Nos poços onde ocorreu crescimento de *E. coli*, observou-se uma mudança de cor de azul para rosa, enquanto nos poços do controlo negativo permaneceu a cor azul.

Os ensaios foram validados pela presença de crescimento no controlo positivo (controlo de crescimento) e ausência de crescimento na coluna do controlo negativo (controlo de esterilidade). Foram realizados três ensaios independentes para as estirpes de referência AG100, AG100A, AG100_{TET}, e para os isolados clínicos de forma a confirmar os resultados obtidos. Nos casos em que obtiveram valores de CMI discrepantes, calculou-se a média dos três ensaios.

As placas de 96 poços foram preparadas de acordo com a representação da Figura 10.

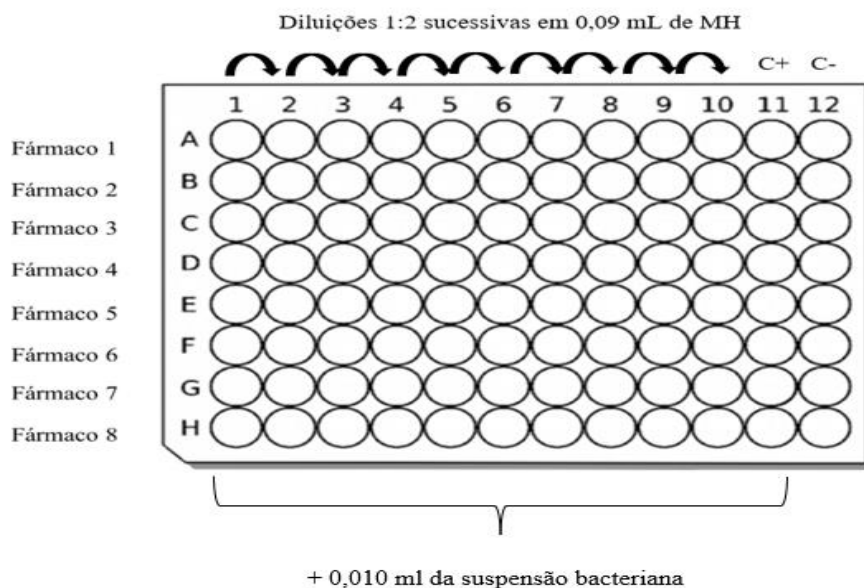


Figura 10 - Representação esquemática de uma microplaca de 96 poços para determinação de CMIs [adaptado de (122)]. C⁺, Controlo positivo; C⁻, Controlo negativo; MH, Muller Hinton Broth

Para avaliação da suscetibilidade aos antibióticos através da determinação das CMIs, os resultados obtidos foram interpretados por comparação com valores de *breakpoint* de referência, disponíveis em diretrizes e recomendações como o *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (123) e o CLSI (114).

Tabela 6 - Recomendações de acordo com a EUCAST e CLSI dos *breakpoints* da CMI dos antibióticos testados em *E. coli*.

Antibiótico	Suscetível ≤	Resistente ^{1,2}	Referência
Tetraciclina	4	16	(114)
Eritromicina	-	-	-
Ciprofloxacina	0,25	0,5	(123)
Canamicina	16	64	(114)
Ofloxacina	0,25	0,5	(123)
Ceftriaxona	1	2	(123)
Gentamicina	2	2	(123)

¹EUCAST R > (123). ²CLSI R ≥ (114).

2.2.3.3. Determinação do efeito dos novos compostos sobre o valor de CMIs de antibióticos e EtBr

De modo a determinar o efeito dos compostos candidatos a reposicionamento na CMI de antibióticos e do EtBr, determinaram-se as CMIs destes últimos na presença dos compostos a $\frac{1}{4}$ da CMI. Assim, distribuiu-se 0,080 mL de MH em todos dos poços da placa, à exceção da primeira coluna que corresponde à concentração mais alta do composto a testar. De seguida, adicionou-se 0,160 mL da concentração mais alta do antibiótico/EtBr ao primeiro poço, retirou-se 0,080 mL dos poços da primeira coluna fazendo diluições de 1:2 ao longo da linha, rejeitando 0,080 mL da última. Adicionou-se 0,010 mL de cada composto a $\frac{1}{4}$ da sua CMI a cada poço, reservando uma coluna para o controlo positivo (com inóculo, sem composto), uma coluna para controlo negativo (sem inóculo), e uma coluna para o controlo de inibidor (com inóculo e inibidor). Por fim adicionou-se 0,010 mL de inóculo, preparado de acordo com a descrição em 2.2.3.1. e incubou-se na estufa a 37°C. Após 18 h de incubação, a leitura foi realizada visualmente e, posteriormente, para uma melhor visualização dos resultados adicionou-se 0,030 mL de uma solução de resazurina a 0,1 mg/mL a todos os poços. A interpretação dos resultados foi efetuada do mesmo modo como descrito no ponto 2.2.3.2. Foram realizados três ensaios independentes de forma a confirmar os resultados obtidos. Nos casos em que se obteve valores de CMI discrepantes, calculou-se a média dos três ensaios. As placas de 96 poços foram preparadas de acordo com a representação da Figura 11.

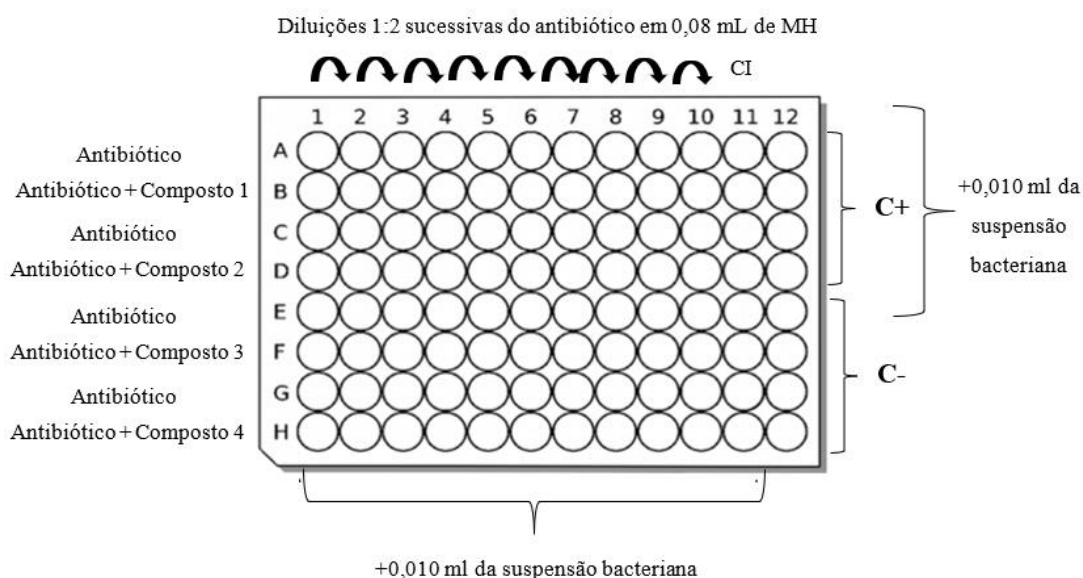


Figura 11 - Representação esquemática de uma microplaca de 96 poços para determinação de CMIs dos antibióticos na presença dos compostos a 1/4 da CMI [Adaptado de (122)]. CI, Controlo de inibidor; C+, Controlo positivo; C-, Controlo negativo; MH, Muller Hinton Broth.

2.2.4. Ensaios de fluorometria em tempo-real

O efeito dos compostos candidatos a reposicionamento na atividade de efluxo das três estirpes de referência de *E. coli* foi avaliado pelo método de fluorometria em tempo-real, desenvolvido na Unidade de Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (124, 125).

O EtBr é um substrato fluorescente e frequentemente utilizado como marcador, uma vez que emite fluorescência fraca em solução aquosa (fora das células) e emite forte fluorescência em meio não polar e hidrofóbico, como por exemplo, no espaço periplasmático de bactérias Gram-negativas (125). Assim, este método permite a monitorização em tempo real da acumulação de EtBr no interior das células, da sua extrusão por efluxo, e avaliar a potencial atividade de inibição de efluxo dos compostos em estudo (124).



Figura 12 - Termociclador em tempo real RotorGene™ 3000 [Adaptado de (126)]

2.2.4.1. Preparação da suspensão bacteriana

A partir das culturas em LA das 3 estirpes de referência de *E. coli*, foram preparadas culturas com 5mL de meio MH, durante a noite a 37°C e agitação a 220 rpm, como descrito em 2.2.2. O crescimento celular foi acompanhado, através da medição da DO₆₀₀, através de um espectrofotômetro Ultrospec 10, até atingir uma DO₆₀₀ de 0,6 (fase exponencial de crescimento).

As bactérias foram recolhidas por centrifugação a 12000 rpm, durante três minutos, à temperatura ambiente numa centrífuga Biofuge Pico Heraeus (Kendro Laboratory Products, Osterode, Alemanha). Lavou-se o sedimento bacteriano duas vezes em PBS e ajustou-se a DO₆₀₀ a 0,3 (para ensaios de acumulação) ou 0,6 (para ensaios de efluxo) (124, 125).

2.2.4.2. Ensaio de acumulação de EtBr na presença dos compostos candidatos

Para avaliar a sua potencial atividade de inibição de efluxo, efetuaram-se ensaios de acumulação de EtBr na presença dos compostos candidatos a reposicionamento. Como controlo positivo de inibição de efluxo, utilizou-se o composto clorpromazina, tal como descrito na literatura (124).

Assim, preparam-se tubos de 0,2 mL contendo 0,095 mL de suspensão celular a DO₆₀₀ de 0,3, na presença ou ausência de glucose a 0,4% (v/v), com EtBr na concentração de 1 mg/L para AG100 e AG100_{TET} e 0,25 mg/L para AG100A (123). Adicionou-se 0,005 mL

do composto em estudo ao tubo respectivo ou de água destilada estéril ao controle sem composto. Assim, as condições de reação testadas foram as seguintes:

- (i) Bactérias em PBS com glucose;
- (ii) Bactérias em PBS com glucose e EtBr;
- (iii) Bactérias em PBS com glucose, EtBr e o composto a ¼ da CMI;
- (iv) PBS com EtBr;
- (v) PBS com EtBr e composto a ¼ da CMI;

Posteriormente, os microtubos de 0,2 mL foram colocados no Rotor-Gene™ 3000 (Corbett Research, Sydney, Austrália), e a medição de fluorescência ocorreu durante 60 minutos, sendo que as leituras foram realizadas em ciclos de 60 segundos a 37°C, com aquisição de fluorescência a cada minuto a comprimento de onda de excitação e emissão de 530 nm e 585 nm, respectivamente.

Após a leitura de fluorescência no Rotor-Gene™ 3000, foi feita a análise dos resultados de forma a quantificar o efeito do composto em estudo. Assim, determinou-se o valor de Fluorescência Final Relativa (FFR). Este parâmetro foi determinado através da seguinte fórmula:

$$\text{FFR}(\Delta 60\text{min}) = \frac{\text{Fluorescência final (E. coli com EtBr e fármaco)} - \text{Fluorescência final (E. coli com EtBr)}}{\text{Fluorescência final (E. coli com EtBr)}}$$

Equação 1 – Equação para a determinação da Fluorescência Final Relativa (FFR).

2.2.4.3. Ensaio de efluxo de EtBr na presença dos compostos candidatos

Para efetuar o ensaio de efluxo, é necessário preparar previamente as células bacterianas “carregadas” com EtBr nas condições que promovem a acumulação máxima (ausência de glucose, presença do composto que promoveu maior acumulação de EtBr, e incubação à temperatura ambiente) (125).

Assim, começou-se por tratar as culturas para as três estirpes de referência de *E. coli* como descrito no ponto 2.2.2. Quando se atingiu uma DO₆₀₀ de 0,6, as células foram centrifugadas a 12000 rpm durante 3 min, lavadas em PBS, e a sua D.O₆₀₀ ajustada a 0,6. Posteriormente, as células foram incubadas ao longo de 60 min, à temperatura ambiente, com EtBr (1 mg/L para AG100 e AG100_{TET} e 0,25 mg/L para AG100A) e com o

composto que promoveu maior acumulação de EtBr a $\frac{1}{4}$ da sua CIM, na ausência de glucose (125).

Após o período de incubação, centrifugaram-se as células a 12000 rpm durante 3 min, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em PBS frio de forma a obter uma suspensão bacteriana a uma DO_{600} de 0,6. De seguida, adicionou-se 0,095 mL de suspensão bacteriana aos microtubos de 0,2 mL de modo a testar as seguintes condições:

- i) Bactérias “carregadas”, com glucose a 0,4% (v/v);
- ii) Bactérias “carregadas”, sem glucose;
- iii) Bactérias “carregadas”, sem glucose + 0,005 mL de composto a $\frac{1}{4}$ da CMI
- iv) Bactérias “carregadas”, com glucose a 0,4% (v/v) + 0,005 mL de composto a $\frac{1}{4}$ da CMI.

Por fim, os microtubos foram colocados no Rotor-GeneTM 3000 e a fluorescência foi registada a cada 30 segundos durante 30 minutos a 37°C, a comprimento de onda de excitação e emissão de 530 nm e 585 nm, respetivamente.

Para efetuar a análise dos resultados de efluxo, realizou-se uma normalização dos dados obtidos pelo Rotor-GeneTM 3000, na qual a fluorescência produzida pelas células “carregadas” com EtBr na presença do composto e ausência de glucose, foi definido como o valor de fluorescência máximo. A fluorescência relativa das restantes condições testadas foi obtida através do rácio entre os valores de fluorescência de efluxo para cada estirpe testada e o valor de fluorescência máxima, por unidade de tempo.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização dos alvos dos compostos candidatos a reposicionamento em *E. coli*

Através da identificação dos genes envolvidos no metabolismo energético e transporte membranar em *N. gonorrhoeae* (116, 117, 118), determinou-se percentagem de identidade dessas sequências com o alvo correspondente em *E. coli*. Com esta análise foi permitido estimar a probabilidade de ambas as proteínas de *N. gonorrhoeae* e *E. coli* partilharem afinidade pelo mesmo fármaco. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Alvos preditivos dos 9 compostos candidatos, identificados em *N. gonorrhoeae* por reposicionamento *in silico*, e correspondente alvo em *E. coli* determinado por análise BLAST.

Composto	Classe	Alvo Ng FA 1090 (118)	Alvo em <i>E. coli</i>	Query Cover (%)	E-value	Identidade (%)
Doxorubicina	Tratamento do cancro	NADH-quinona oxirredutase NGO1750	Subunidade NuoB da NADH-quinona oxidoreductase HBP1535419	91	2e ⁻³⁹	48,98
			Subunidade NuoB da NADH-quinona oxidoreductase WP_046608242	93	1e ⁻³⁹	48,98
		NADH-quinona oxirredutase NGO1749	Subunidade C/D da NADH-quinona oxidoreductase HBP1713931	57	8e ⁻¹⁷	31,90
			Subunidade C da NADH-quinona oxidoreductase WP_208324317	54	4e ⁻¹⁷	33,03
		NADH-quinona oxirredutase NGO1748	Subunidade C/D da NADH-quinona oxidoreductase HBP1713931	97	4e ⁻⁹⁹	39,81

Tabela 7 - Alvos preditivos dos 9 compostos candidatos, identificados em *N. gonorrhoeae* por reposicionamento *in silico*, e correspondente alvo em *E. coli* determinado por análise BLAST (continuação).

Composto	Classe	Alvo Ng FA 1090 (118)	Alvo em <i>E. coli</i>	Query Cover (%)	E-value	Identidade (%)
Tiabendazol	Inibidor de Anidrase Carbônica (AC)	Succinato desidrogenase NGO0921	Flavoproteína da subunidade da succinato desidrogenase CQR80312	100	0,0	55,01
			Flavoproteína da subunidade da succinato desidrogenase WP_000775527	100	0,0	55,01
Atovaquone	Inibidor de AC	Citocromo B NGO2030	Citocromo B MRF39042	91	0,0	69,93
Acetazolamida	Inibidor de AC	AC NGO0574	AC EFH8032264	93	5e ⁻⁷²	46,41
Benzotiazida	Inibidor de AC	AC NGO0574	AC EFH8032264	93	5e ⁻⁷²	46,41
Topiramato	Anticonvulsivo	AC NGO0574	AC EFH8032264	93	5e ⁻⁷²	46,41
Amlodipina	Bloqueador de canais de cálcio	AC NGO0574	AC EFH8032264	93	5e ⁻⁷²	46,41
Sulpirida	Antipsicótico	AC NGO0574	AC EFH8032264	93	5e ⁻⁷²	46,41
Metformina	Anti-hiperglicêmico	Flavoproteína-ubiquinona oxidoreductase NGO1396	Proteína de ligação a NAD(P) MRF67502	100	0,0	57,19

O *E-value* descreve o número de ocorrências que se prevê que surjam ao pesquisar um banco de dados de um determinado tamanho. A percentagem de identidade indica a semelhança da sequência da *N. gonorrhoeae* com a sequência de *E. coli*, sendo que quanto maior for esta percentagem mais evidente é a identidade.

Através da análise dos resultados obtidos, verifica-se que se obteve um valor de *Query cover* entre 91-100% e que a percentagem de identidade variou aproximadamente entre 30% a 70%, sendo a mais elevada verificada para o alvo do composto atovaquone (citocromo B, 69,93 %). É possível que exista elevado nível de conservação de resíduos funcionais de aminoácidos entre os alvos de *N. gonorrhoeae* e *E. coli*, que permita uma afinidade semelhante para estes compostos.

3.2. CMIs dos compostos candidatos nas estirpes *E. coli* AG100, AG100A e AG100_{TET}.

Começou-se por estudar três estirpes de *E. coli* que serviram de modelo para o estudo do sistema de efluxo AcrAB-TolC. Para tal, utilizou-se uma estirpe que possui um sistema AcrAB-TolC funcional (AG100), uma estirpe com o sistema AcrAB-TolC inativo (AG100A) e uma estirpe com sobre-expressão deste sistema (AG100_{TET}). Através do uso deste modelo, foi possível avaliar o efeito dos compostos candidatos a reposicionamento no sistema AcrAB-TolC.

Desta forma, determinaram-se as CMIs dos compostos candidatos para avaliação da sua atividade antimicrobiana e para definir as concentrações dos compostos a $\frac{1}{4}$ da CMI a serem utilizadas em ensaios posteriores, nomeadamente na determinação do efeito dos compostos na CMI de antibióticos e nos ensaios de fluorimetria em tempo-real. A Tabela 8 apresenta os valores de CMIs dos compostos candidatos a reposicionamento para as três estirpes de *E. coli* AG100, AG100A e AG100_{TET}.

Tabela 8 - CIM dos 9 compostos (mg/L) em estudo nas três estirpes de *E. coli*

Composto	CMI (mg/L)			$\frac{1}{4}$ da CMI (mg/L)		
	AG100	AG100A	AG100 _{TET}	AG100	AG100A	AG100 _{TET}
Doxorrubicina	125	0,5	15,6	31,25	0,12	3,9
Acetazolamida	>1000	>1000	>1000	500	500	500
Tiabendazol	>1000	>1000	1000	500	500	250
Atovaquone	250	>250	>500	62,5	125	250
Benzotiazida	>1000	>1000	1000	500	500	250
Amlodipina	125	125	250	31,25	31,25	62,5
Topiramato	>1500	>1500	1500	750	750	375

Tabela 8 - CIM dos 9 compostos (mg/L) em estudo nas três estirpes de *E. coli* (continuação).

Composto	CMI (mg/L)			$\frac{1}{4}$ da CMI (mg/L)		
	AG100	AG100A	AG100 _{TET}	AG100	AG100A	AG100 _{TET}
Sulpirida	1500	1500	1500	375	375	375
Metformina	>1500	>1500	>1500	750	750	750

Entre os compostos testados, os que apresentaram valores de CMI mais baixas foram a doxorubicina, o atovaquone e a amlodipina, sugerindo potencial atividade antimicrobiana destes compostos. No entanto, os restantes compostos (CMI >1000 mg/L) não foram excluídos dos ensaios seguintes, uma vez que poderão apresentar efeito adjuvante na redução da CMI de antibióticos e potencial atividade inibitória de efluxo nas estirpes padrão de *E. coli* estudadas

Na estirpe AG100A, em que o sistema AcrAB-TolC está inativo, a CMI da doxorubicina diminuiu, sugerindo que este composto é substrato de sistemas de efluxo AcrAB-TolC, o que está de acordo com a literatura (127). Na estirpe AG100_{TET}, na qual o sistema de efluxo AcrAB-TolC encontra-se sobre-expresso, verificou-se um aumento de CMI do atovaquone e da amlodipina, quando comparada à estirpe AG100 (*wild-type*), demonstrando que estes compostos poderão ser substratos deste sistema de efluxo.

Por outro lado, a CMI da amlodipina apenas apresentou um ligeiro aumento (2x) na estirpe AG100_{TET}, enquanto a CMI do atovaquone aumentou tanto na estirpe AG100A como na AG100_{TET}. Este resultado para o composto atovaquone poderá tratar-se de um problema de solubilidade, dado que este problema foi observado durante a execução do protocolo de determinação de CMI.

3.3. Efeito dos compostos candidatos nas CMIs dos antibióticos e do EtBr nas estirpes de *E. coli*, AG100, AG100A, AG100_{TET}.

Para avaliar o efeito compostos em estudo nas CMIs de antibióticos e do EtBr, determinaram-se as CMIs destes últimos na presença dos compostos a $\frac{1}{4}$ da sua CMI (para garantir que os compostos não interferiam com a viabilidade bacteriana). Os resultados obtidos apresentam-se na Tabela 9. Para a interpretação e análise dos resultados considerou-se uma diminuição significativa de CMI do antibiótico ou do EtBr, quando o composto em estudo promoveu uma redução de pelo menos 4x (128).

Tabela 9 - Efeito dos compostos na CMI dos antibióticos e do EtBr nas estirpes AG100, AG100A e AG100_{TET}.

Antibiótico	Composto	CMI mg/L		
		AG100	AG100A	AG100 _{TET}
Tetraciclina	-	1,5	1,0	25
	Doxorubicina	0,6 ↓2,5x	1,0	25
	Acetazolamida	1,1*	1,2*	12,5 ↓2x
	Tiabendazol	4,5*	1,0	12,5 ↓2x
	Atovaquone	0,5 ↓3x	1,0	25
	Benzotiazida	1,1*	1,0	12,5 ↓2x
	Amlodipina	1,1*	0,7*	12,5 ↓2x
	Topiramato	1,1*	0,7*	12,5 ↓2x
	Sulpirida	0,7* ↓2x	1,0	25
	Metformina	1,5	1,5	25
Eritromicina	-	62,5	1,6	100
	Doxorubicina	62,5	0,8 ↓2x	100
	Acetazolamida	62,5	1,6	50 ↓2x
	Tiabendazol	46,9*	1,6	50 ↓2x
	Atovaquone	125	1,6	50 ↓2x
	Benzotiazida	46,9*	1,6	100
	Amlodipina	62,5	0,8 ↓2x	100
	Topiramato	62,5	0,8 ↓2x	100
	Sulpirida	31,3 ↓2x	0,8 ↓2x	50 ↓2x
	Metformina	62,5	0,8 ↓2x	100
Ciprofloxacina	-	0,01	0,006	0,05
	Doxorubicina	0,01	0,003 ↓2x	0,05
	Acetazolamida	0,02	0,003	0,05
	Tiabendazol	0,02	0,003	0,05
	Atovaquone	0,03	0,006	0,03 ↓2x
	Benzotiazida	0,02	0,003 ↓2x	0,05
	Amlodipina	0,03	0,006	0,05
	Topiramato	0,02	0,006	0,05
	Sulpirida	0,02	0,006	0,05
	Metformina	0,02	0,006	0,05

EtBr, Brometo de etídio; Clorpromazina; Compostos testados a ¼ da sua CMI. CMI da clorpromazina = 60 mg/L para AG100, 20 mg/L para AG100A e 140 mg/L para AG100_{TET}, respetivamente (89). *valor correspondente à média de três ensaios independentes.

Tabela 9 - Efeito dos compostos na CMI dos antibióticos e do EtBr nas estirpes AG100, AG100A e AG100_{TET} (continuação).

Antibiótico	Composto	CMI mg/L		
		AG100	AG100A	AG100 _{TET}
Canamicina	-	1,9	>500	1,3
	Doxorubicina	0,9 ↓2x	500	0,6 ↓2x
	Acetazolamida	0,9 ↓2x	500	0,6 ↓2x
	Tiabendazol	1,9	250 ↓2x	1,3
	Atovaquone	3,8	500	0,6 ↓2x
	Benzotiazida	0,9 ↓2x	250 ↓2x	1,3
	Amlodipina	1,9	500	1,3
	Topiramato	0,9 ↓2x	250 ↓2x	1,3
	Sulpirida	1,9	500	1,3
	Metformina	1,9	500	1,3
Ofloxacina	-	0,1	0,01	0,25
	Doxorubicina	0,05 ↓2x	0,01	0,50
	Acetazolamida	0,1	0,03	0,50
	Tiabendazol	0,1	0,01	0,50
	Atovaquone	0,1	0,03	0,50
	Benzotiazida	0,05 ↓2x	0,01	0,25
	Amlodipina	0,1	0,03	0,13 ↓2x
	Topiramato	0,1	0,006 ↓2x	0,50
	Sulpirida	0,1	0,03	0,50
	Metformina	0,1	0,013	0,50
Ceftriaxona	-	0,03	0,04	0,05
	Doxorubicina	0,06	0,04	0,10
	Acetazolamida	0,03	0,04	0,10
	Tiabendazol	0,03	0,08	0,05
	Atovaquone	0,06	0,04	0,05
	Benzotiazida	0,03	0,08	0,05
	Amlodipina	0,06	0,04	0,05
	Topiramato	0,03	0,08	0,05
	Sulpirida	0,06	0,04	0,05
	Metformina	0,03	0,04	0,10

EtBr, Brometo de etídio; Clorpromazina; Compostos testados a ¼ da sua CMI. CMI da clorpromazina = 60 mg/L para AG100, 20 mg/L para AG100A e 140 mg/L para AG100_{TET}, respetivamente (89). *valor correspondente à média de três ensaios independentes.

Tabela 9 - Efeito dos compostos na CMI dos antibióticos e do EtBr nas estirpes AG100, AG100A e AG100_{TET} (continuação).

Antibiótico	Composto	CMI mg/L		
		AG100	AG100A	AG100 _{TET}
Gentamicina	-	0,48	1,30	0,16
	Doxorubicina	0,48	0,65 ↓2x	0,16
	Acetazolamida	0,48	0,65 ↓2x	0,33
	Tiabendazol	0,48	0,33 ↓4x	0,33
	Atovaquone	0,48	0,65 ↓2x	0,16
	Benzotiazida	0,48	0,33 ↓4x	0,16
	Amlodipina	0,48	0,33 ↓4x	0,33
	Topiramato	0,48	0,33 ↓4x	0,16
	Sulpirida	0,24 ↓2x	0,33 ↓4x	0,16
	Metformina	0,48	0,65 ↓2x	0,16
EtBr	-	150	2,50	250
	Doxorubicina	75 ↓2x	2,50	250
	Acetazolamida	150	2,50	250
	Tiabendazol	150	2,50	125 ↓2x
	Atovaquone	150	2,50	500
	Benzotiazida	150	2,50	125 ↓2x
	Amlodipina	150	0,3 ↓8x	250
	Topiramato	150	1,25 ↓2x	250
	Sulpirida	150	2,50	250
	Metformina	150	2,50	250
	Clorpromazina	75 ↓2x	0,6 ↓4x	250

EtBr, Brometo de etídio; Clorpromazina; Compostos testados a ¼ da sua CMI. CMI da clorpromazina = 60 mg/L para AG100, 20 mg/L para AG100A e 140 mg/L para AG100_{TET}, respetivamente (89). *valor correspondente à média de três ensaios independentes.

A clorpromazina foi utilizada como controlo positivo uma vez que há estudos que indicam que aumenta o potencial de muitos antibióticos e promove a acumulação de EtBr dentro da célula. Relativamente aos valores de CMIs dos antibióticos e do EtBr para as três estirpes, observou-se que a estirpe AG100A (Δ acrAB::Tn903Kan^r) apresentou maior suscetibilidade à tetraciclina, eritromicina, ciprofloxacina, ofloxacina e EtBr, relativamente à estirpe selvagem AG100. Pelo contrário, a estirpe AG100_{TET} apresentou valores de CIM mais elevados para estes antibióticos e EtBr, relativamente à estirpe selvagem AG100. Estes resultados sugerem que estes compostos poderão ser substratos do sistema de efluxo AcrAB, o que está de acordo com o descrito na literatura (72, 89).

Considerou-se uma diminuição significativa de CMI quando o composto em estudo promoveu uma redução de pelo menos 4x na CMI do antibiótico ou EtBr (128).

Assim, a partir da análise dos resultados descritos na Tabela 9, verificou-se um efeito significativo dos compostos apenas na estirpe AG100A: a CMI gentamicina diminuiu 4x na presença de tiabendazol, benztiazida, amlodipina, topiramato e sulpirida; e a CMI do EtBr apresentou uma redução de 4x e 8x na presença de clorpromazina e amlodipina, respetivamente.

Para as estirpes AG100 e AG100_{TET}, apenas se observou uma redução ligeira (2-3x) da CMI para algumas combinações de antibióticos e compostos.

Tendo em conta os resultados obtidos, é importante perceber se estes compostos promoveram a redução da CMI dos antibióticos e do EtBr por inibição dos sistemas de efluxo, em particular do sistema de efluxo AcrAB-TolC de *E. coli*. De forma a analisar este efeito, utilizou-se uma metodologia que permite a visualização do efluxo e a sua inibição por um determinado composto em tempo real, identificando potenciais inibidores de efluxo, e selecionando o(s) composto(s) mais promissor(es).

3.4. Avaliação da atividade de efluxo por fluorometria em tempo real

3.4.1. Efeito dos compostos candidatos na acumulação de EtBr

Para avaliar o efeito do transporte do EtBr na presença dos compostos candidatos procedeu-se de acordo com o descrito em 2.2.4.2. dos Materiais e Métodos. Realizaram-se dois tipos de ensaios: de acumulação de EtBr e de efluxo de EtBr. A acumulação de EtBr resulta do equilíbrio entre a entrada do composto e a expulsão do mesmo pelos sistemas de bombas de efluxo, em particular do AcrAB-TolC (124). Assim, na presença de um IE, quanto maior a acumulação de EtBr observada (relativamente ao controlo sem IE), maior será a inibição da atividade de efluxo. Para verificar se os compostos candidatos promoviam a acumulação de EtBr no interior da célula, começou-se por realizar os ensaios de acumulação por fluorometria em tempo real. Não foi possível avaliar o efeito da doxorrubicina e da benztiazida, pois estes compostos emitem fluorescência que interfere na leitura da fluorescência do EtBr. Por esta razão, os resultados destes compostos não se encontram representados nas figuras seguintes. Assim, os resultados destes ensaios para as três estirpes de *E. coli* encontram-se apresentados na Figura 13.

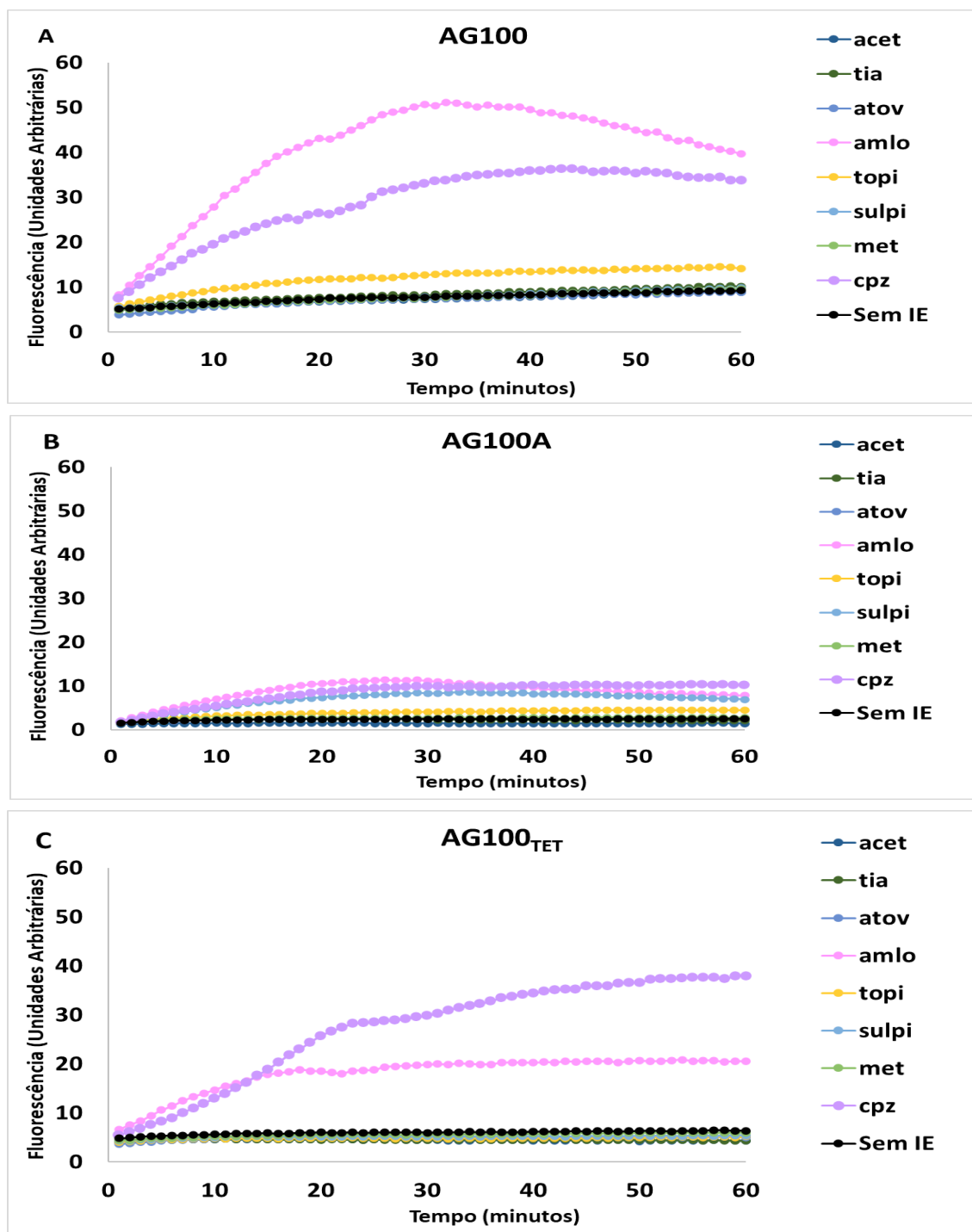


Figura 13 - Ensaio de acumulação de EtBr na presença dos 9 compostos a 1/4 da sua CMI a 37°C na presença de glucose a 0,4%. Concentração de EtBr (1 mg/L para AG100 e AG100_{TET}, e 0,25 mg/L para a estirpe AG100A). Acet, acetazolamida; tia, tiabendazol; atov, atovaquone; amlo, amlodipina; topi, topiramato; sulpi, sulpirida; met, metformina; cpz, clorpromazina; IE, inibidor de efluxo.

Neste estudo, a clorpromazina foi incluída como controlo positivo de inibição de efluxo nos ensaios de acumulação e de efluxo de EtBr, tal como descrito anteriormente (124) (125). As concentrações de equilíbrio de EtBr selecionadas para cada estirpe são essenciais para garantir que a concentração de EtBr utilizada não interfere com a viabilidade celular ao intercalar no cromossoma da bactéria, comprometendo a sua replicação celular (124).

De acordo com os resultados obtidos, nas três estirpes de *E. coli* AG100, AG100A e AG100_{TET} o composto que promoveu maior acumulação de EtBr foi a amlodipina, o que sugere que este composto é um potencial inibidor de efluxo. Na estirpe AG100A, observaram-se valores de fluorescência mais reduzidos devido à utilização de uma concentração de equilíbrio de EtBr mais baixa (0,25 mg/L) do que para as restantes estirpes. Nesta estirpe, a concentração de equilíbrio de EtBr utilizada foi de 0,25 mg/L porque uma concentração maior iria representar um aumento da concentração intracelular de EtBr relativamente à sua extrusão, aumentando em demasia o sinal de fluorescência para esta estirpe. Por outro lado, a utilização de uma concentração inferior, representaria uma situação na qual a acumulação de EtBr é residual relativamente à taxa de efluxo do EtBr (124).

Por fim, estes resultados indicam que a amlodipina apresenta um potencial efeito inibitório nos sistemas de efluxo de *E. coli*, em particular sobre o sistema AcrAB-TolC. Com base nos valores de fluorescência no final de 60 min de ensaio, determinou-se a FFR, um parâmetro que reflete a capacidade do composto em estudo em promover a acumulação do substrato (neste caso EtBr) no interior da célula (129). Considera-se um composto potencial inibidor de efluxo se apresentar $FFR \geq 1$, sendo que quanto maior for a diferença entre o valor da fluorescência na presença do composto, em relação à fluorescência da estirpe na ausência desse composto, maior é o efeito inibitório exercido sobre os sistemas de efluxo. Os resultados obtidos para os valores de FFR encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores de fluorescência final relativa (FFR) para os compostos candidatos obtidos após os ensaios de acumulação de EtBr

Composto	FFR (média ± desvio padrão)		
	AG100	AG100A	AG100_{TET}
Acetazolamida	-0,09 ± 0,05	-0,42 ± 0,05	-0,14 ± 0,14
Tiabendazol	0,13 ± 0,11	- 0,21 ± 0,06	-0,14 ± 0,21
Atovaquone	-0,02 ± 0,07	0,03 ± 0,08	-0,07 ± 0,11
Amlodipina	3,55 ± 0,73	2,22 ± 0,25	3,19 ± 1,48
Topiramato	0,97 ± 0,44	0,51 ± 0,37	0,10 ± 0,26
Sulpirida	0,27 ± 0,33	1,29 ± 1,12	-0,04 ± 0,08
Metformina	0,06 ± 0,06	0,01 ± 0,13	0,03 ± 0,12
Clorpromazina	3,41 ± 0,71	2,26 ± 1,11	4,55 ± 2,88

Os valores de FFR correspondem à média ± desvio padrão de três ensaios independentes.

Para a estirpe AG100, verificou-se que os compostos que apresentaram uma maior capacidade para promover a acumulação de EtBr foram a amlodipina, seguida da clorpromazina. Na estirpe AG100A, a clorpromazina foi o composto que apresentou um maior efeito na acumulação de EtBr, seguida da amlodipina e da sulpirida. Por último, na estirpe AG100_{TET}, verificou-se que os compostos que apresentaram maior capacidade para promover a acumulação de EtBr foram a clorpromazina e a amlodipina.

Entre os compostos potenciais a inibidores de efluxo, à exceção da clorpromazina que já foi descrita anteriormente (124), a amlodipina foi o composto com atividade de inibição de efluxo mais promissora.

3.4.2. Efeito dos compostos candidatos no efluxo de EtBr

Os ensaios de efluxo de EtBr foram realizados como descrito nos Materiais e Métodos, ponto 2.2.4.3. De forma a confirmar os resultados obtidos nos ensaios de acumulação, foram realizados ensaios de efluxo de EtBr (124, 125), que permitiram a visualização em tempo real do efluxo e da sua inibição pela presença dos compostos que promoveram acumulação significativa de EtBr (FFR >1), a sulpirida (apenas para a AG100A), a

amlodipina e a clorpromazina. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Figura 14.

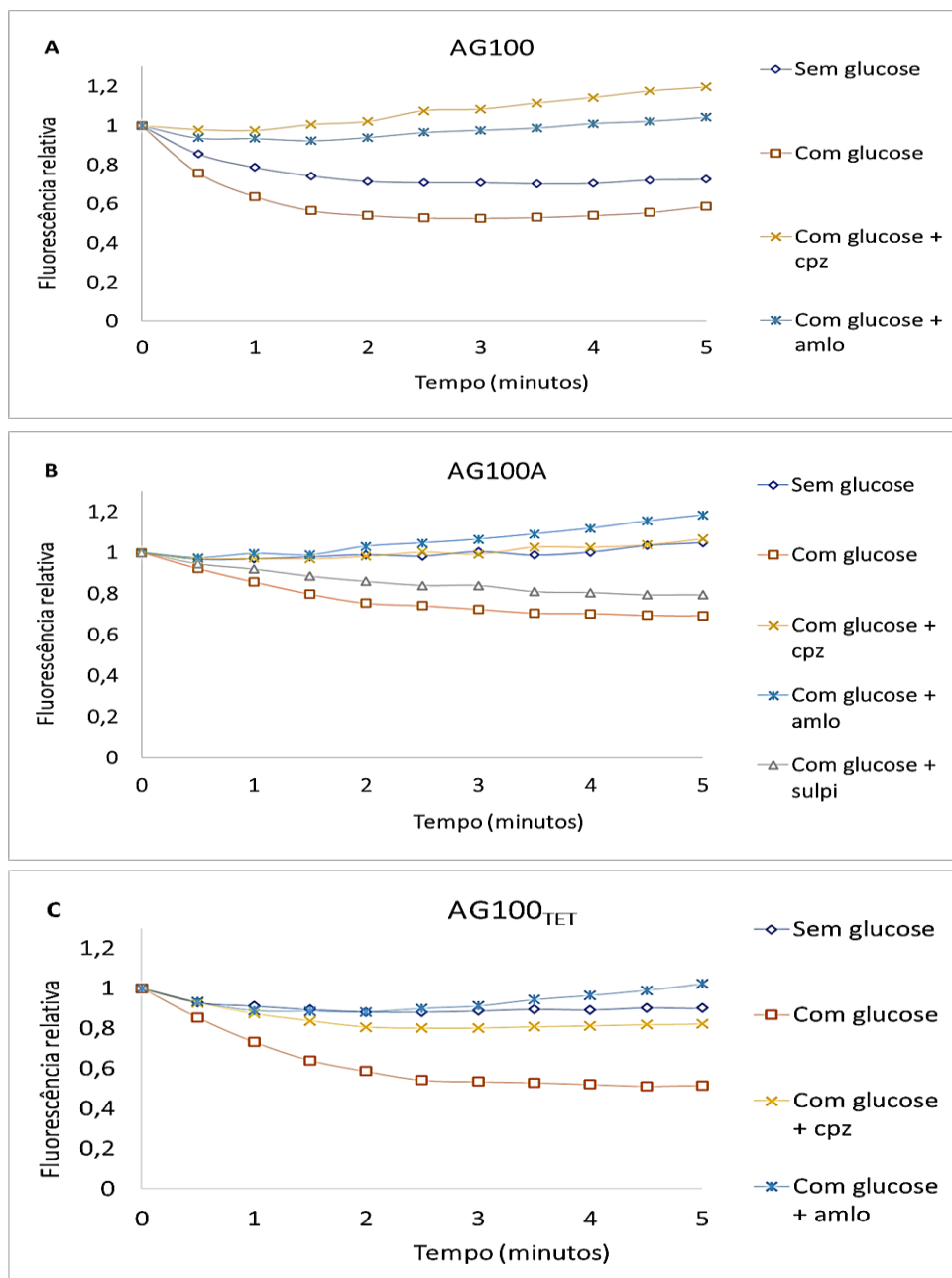


Figura 14 - Ensaio de efluxo de EtBr na presença dos compostos que promoveram acumulação de EtBr a 1/4 da sua CMI, na estirpe AG100 (Gráfico A), AG100A (Gráfico B) e AG100_{TET} (Gráfico C). Encontram-se representados os resultados para os primeiros 5 minutos de ensaio, correspondentes ao período de maior atividade de efluxo.

Analisando os resultados obtidos, confirma-se o que já havia sido descrito para a clorpromazina em que a mesma é um inibidor de efluxo em *E. coli* (124). Para além deste resultado foi possível identificar outro composto inibidor de sistemas de efluxo em *E. coli*, a amlodipina. Apesar do sistema AcrAB-TolC se encontrar inativo na estirpe AG100A, houve inibição de efluxo de EtBr pela amlodipina e clorpromazina. Este resultado indica que outros sistemas de efluxo poderão estar a ser inibidos por estes compostos nesta estirpe.

Na estirpe AG100_{TET}, seria de esperar uma atividade de efluxo de EtBr na presença de glucose mais acentuada do que a observada para a AG100, tal como descrito na literatura (124) (125). No entanto, neste estudo, o efluxo de EtBr na presença de glucose foi semelhante nas duas estirpes. Este resultado pode ser consequência de uma limitação técnica do método, pois o período de tempo necessário à preparação do ensaio pode dificultar a deteção em tempo real do efluxo de EtBr em estirpes com sobre-expressão de bombas de efluxo.

Por outro lado, foi possível confirmar a potencial atividade inibitória de efluxo da amlodipina para a estirpe AG100_{TET} que sobre expressa o sistema de efluxo AcrAB-TolC.

3.5. Efeito da amlodipina nas CMI's de antibióticos em isolados clínicos de *E. coli*

Com base nos resultados dos ensaios anteriores, selecionou-se a amlodipina como o composto mais promissor como inibidor de efluxo. Assim, determinou-se a CMI da amlodipina em 6 isolados clínicos de *E. coli* (Tabela 11) e avaliou-se o efeito deste composto na CMI dos antibióticos tetraciclina, ciprofloxacina, gentamicina e do EtBr (Tabela 12). Estes antibióticos foram selecionados com base no perfil de suscetibilidade destes isolados (Tabela 2) e por ter sido descrito que a tetraciclina e a ciprofloxacina são substratos de sistema AcrAB (124) e a gentamicina da bomba AcrD (130).

Tabela 11 - CMI da amlodipina para cada um dos isolados clínicos de *E. coli* estudados

Isolado	CMI (mg/L)	¼ CMI (mg/L)
27	125	31,25
30	500	125
31	500	125
159	500	125
181	500	125
182	125	31,25

Apenas os isolados 27 e 182 apresentaram um valor de CMI de amlodipina mais baixo (125 mg/L) relativamente ao valor observado para os restantes isolados (500 mg/L). Estes resultados são semelhantes aos observados para as estirpes de *E. coli* AG100, AG100A e AG100_{TET}, em que o valor da CMI da amlodipina foi mais baixa nas estirpes AG100 e AG100A (125 mg/L), relativamente à AG100_{TET} que apresentou um valor de CMI mais elevado (250 mg/L). Posteriormente, avaliou-se o efeito da amlodipina na CMI de antibióticos e do EtBr nos isolados clínicos. Os resultados encontram-se apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Efeito da amlodipina na CMIs de antibióticos e EtBr nos isolados clínicos de *E. coli*

Isolados clínicos / CMI (mg/L)						
Antibiótico	27	30	31	159	181	182
Tetraciclina	0,78	200	200	200	200	50
+ Amlodipina	0,78	25 ↓8x	100 ↓2x	25 ↓8x	25 ↓8x	25 ↓2x
Ciprofloxacina	0,01	0,01	50	0,01	0,01	0,01
+ Amlodipina	0,005 ↓2x	0,005 ↓2x	25 ↓2x	0,005 ↓2x	0,005 ↓2x	0,01
Gentamicina	0,39	0,39	1,56	0,78	0,78	0,78
+ Amlodipina	0,19 ↓2x	0,19 ↓2x	0,78 ↓2x	0,19 ↓4x	0,19 ↓4x	0,39 ↓2x
EtBr	150	150	75	150	150	75
+ Amlodipina	75 ↓2x	18,75 ↓8x	37,5 ↓2x	18,75 ↓8x	18,75 ↓8x	37,5 ↓2x

Amlodipina utilizada a 1/4 da CMI. CMI, concentração mínima inibitória. É considerada redução significativa da CMI, quando o composto em estudo promove uma redução de pelo menos 4x no valor da CMI do antibiótico ou do EtBr (128).

Relativamente às CMI dos antibióticos testados, no geral, os resultados foram concordantes com perfil de suscetibilidade determinado previamente no Laboratório de ISTs do IHMT-NOVA e interpretados de acordo com as recomendações do CLSI e da EUCAST (114, 123). De facto, observou-se que 6 isolados clínicos estudados apresentam um perfil distinto de suscetibilidade às diferentes classes dos antibióticos.

Assim, apenas o isolado 27 demonstrou suscetibilidade à tetraciclina, enquanto os restantes isolados (30, 31, 159, 181 e 182) apresentaram resistência a este antibiótico, de acordo com as recomendações da EUCAST (123). No entanto, a CMI do isolado clínico 182 não vai ao encontro ao apresentado na Tabela 2, visto que o esperado seria ser suscetível, de acordo com os dados anteriores. Confirmou-se também que o isolado 31 apresenta resistência à ciprofloxacina, enquanto todos os isolados demonstram suscetibilidade à gentamicina. Quanto ao EtBr, os valores de CMI foram semelhantes (75-150 mg/L) para todos os isolados.

Relativamente ao efeito da amlodipina na CMI dos antibióticos e do EtBr, observou-se uma redução da CMI de alguns antibióticos apenas nas estirpes 30, 159 e 181. Na estirpe 30, observou-se redução da CMI da tetraciclina (8x) e do EtBr (8x) na presença de amlodipina. Por outro lado, nas estirpes 159 e 181, para além da redução da CMI da tetraciclina (8x) e do EtBr (8x), a amlodipina promoveu também uma redução de 4x da CMI da gentamicina.

4. DISCUSSÃO

No ambiente hospitalar, podem estar presentes agentes patogénicos virulentos e oportunistas capazes de causar infeção, sendo que entre as mais frequentes encontram-se as do trato urinário causadas por *E. coli* (15). A descoberta dos antibióticos constituiu um marco importante no controlo das doenças infecciosas, porém ao longo da sua utilização surgiu a resistência aos antimicrobianos, com consequências graves para a saúde humana, devido à escassez de opções terapêuticas eficazes (3). Uma vez que o desenvolvimento de um novo antibiótico é um processo longo, em que é necessário no mínimo 10 anos para este chegar ao mercado, com elevado custo económico associado, uma estratégia alternativa é o reposicionamento de fármacos já existentes e aprovados (104).

Nesta Dissertação, utilizou-se uma estratégia de reposicionamento *in vitro*, utilizando fármacos já aprovados para uso clínico e com potencial aplicação contra *E. coli*. Estes compostos apresentam como alvos preditivos proteínas envolvidas no metabolismo energético e, desta forma, espera-se que atuem ao nível de diferentes processos fisiológicos, incluindo bombas de efluxo que conseguem transportar antibióticos de diferentes classes do interior para o exterior da célula bacteriana. A potencial capacidade inibitória de efluxo destes compostos em *E. coli*, permitiria restaurar a atividade de antibióticos efluxáveis em estirpes resistentes.

A estratégia inicial utilizada neste trabalho consistiu em selecionar nove compostos para validação *in vitro*, incluindo também a clorpromazina, um composto com atividade de inibição de efluxo e do metabolismo energético, com atividade conhecida em diferentes espécies de bactérias (87). Dos nove compostos testados, a amlodipina destacou-se como o composto mais promissor.

4.1. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* dos compostos candidatos nas estirpes *E. coli* AG100, AG100A e AG100_{TET}

A atividade *in vitro* dos nove compostos candidatos a reposicionamento foi determinada para as estirpes *E. coli* AG100, AG100A e AG100_{TET}. Inicialmente, determinaram-se as CMIs dos compostos, e verificou-se que os que apresentaram maior efeito antimicrobiano foram a doxorubicina, o atovaquone, e a amlodipina. Os restantes compostos não apresentaram atividade antimicrobiana mas não foram excluídos dos estudos seguintes,

pois poderiam apresentar efeito adjuvante da atividade de antibióticos e capacidade de inibição de efluxo em *E. coli*.

As secções seguintes constituem uma avaliação individual dos resultados obtidos dos ensaios *in vitro* para cada um dos compostos testados.

4.1.1. Doxorubicina

A doxorubicina é um fármaco que induz danos por intercalação no DNA/RNA. Desta forma, causa citotoxicidade em humanos e, possivelmente por mecanismos semelhantes, inibe o crescimento de bactérias como *E. coli*. Por outro lado, já foi descrita resistência a este composto em *E. coli* K-12 (131).

Este fármaco é responsável por potenciar a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), pela sua ação na NADH desidrogenase (alvo preditivo neste trabalho), originando efeitos secundários como stress oxidativo, conduzindo a morte celular (132). Este mecanismo de ação da doxorubicina poderá ter contribuído para os resultados obtidos neste trabalho em *E. coli*,

A doxorubicina apresentou valores de CMI para AG100, AG100A e AG100_{TET} de 125, 0,5 e 15,6 mg/L, respetivamente. A estirpe AG100 apresentou um valor de CMI elevado quando comparado com as restantes estirpes (Tabela 8). No entanto, este valor de CMI é significativamente mais baixo na estirpe AG100A (sistema AcrAB inactivo) relativamente à estirpe AG100, o que sugere que a doxorubicina é substrato do sistema AcrAB, tal como descrito na literatura (127). Assim, seria de esperar que a estirpe AG100_{TET} apresentasse um valor de CMI superior em relação ao observado na AG100, porém tal não se verificou (Tabela 8).

Por outro lado, a doxorubicina reduziu ligeiramente a CMI do antibiótico tetraciclina (2,5x) na estirpe AG100, mas não demonstrou nenhum efeito significativo para nenhum dos outros antibióticos testados nas três estirpes (Tabela 9).

Estes resultados sugerem que a doxorubicina apresenta características promissoras que poderiam ser exploradas em estudos futuros. No entanto, este composto origina efeitos secundários graves, nomeadamente efeitos cardiotoxícos (131) e, portanto, seria interessante explorar derivados com menor toxicidade.

O efeito na acumulação e efluxo do EtBr não foi avaliado para a doxorubicina, uma vez que a presença de cor do composto interfere com a leitura da fluorescência emitida pelo

EtBr. É pertinente recorrer a uma técnica alternativa, pois seria interessante estudar o efeito deste composto na atividade de efluxo.

4.1.2. Acetazolamida

A acetazolamida é frequentemente utilizada em doentes com epilepsia, podendo também ser utilizada em conjunto com outras drogas antiepiléticas (133). É uma sulfonamida aromática (134) conhecida por ser um inibidor forte da anidrase carbónica (AC) (135). As ACs são metaloenzimas (Nocentini, Hewitt, Mastrolorenzo, Flaherty, & Supuran, 2021) que participam em reações essenciais, como a homeostase do CO_2/HCO_3 , das vias metabólicas bacterianas (135), regulando o pH e agindo como fator de virulência (136). Existem quatro famílias de ACs, as α -, β -, γ - e ι -CAs, algumas já descritas em bactérias como *E. coli*, e têm vindo a ser consideradas potenciais alvos para o desenvolvimento de fármacos. De facto, existem estudos que demonstraram o efeito bacteriostático ou bactericida resultante da inibição destas enzimas (136).

Em estudos anteriores, a acetazolamida demonstrou um efeito inibitório em *E. coli*, a concentrações aproximadamente de 4000 mg/L (135). Neste trabalho o valor da CMI da acetazolamida, nas três estirpes de *E. coli* estudadas, foi superior a 1000 mg/L, o que indica que este composto não apresenta efeito antimicrobiano (Tabela 8). Este composto também não promoveu a redução significativa ($\geq 4\times$) da CMI dos antibióticos testados (Tabela 9).

Por fim, o valor de FFR que mede o efeito deste composto na acumulação de EtBr foi <1 , indicando que o mesmo não terá potencial para inibir os sistemas de efluxo (Tabela 10). Pensa-se que a presença de sistemas de efluxo RND impede uma atividade elevada de compostos não antibióticos, em particular, em bastonetes Gram-negativos (137), o que poderá ser uma possível explicação para estes resultados. No entanto, outros fatores poderão estar envolvidos, tais como a sobreexpressão de ACs, que torna necessária a presença de elevadas concentrações de composto para inibir estas enzimas. Por outro lado, poderá não ocorrer atividade significativa destas proteínas e, por isso, o fármaco não atinge e inibe este alvo. Para além disso, a permeabilidade celular também poderá comprometer a entrada da acetazolamida na célula bacteriana, ou poderá ocorrer degradação enzimática do composto.

4.1.3. Tiabendazol

O tiabendazol é um fungicida e parasiticida, também conhecido por ser um agente quelante (138). O seu mecanismo de ação em parasitas não é totalmente conhecido, mas pensa-se que consiste na inibição da enzima fumarato redutase (138). Prevê-se que o tiabendazol atue na subunidade de flavoproteína da enzima fumarato redutase em *E. coli*, comprometendo a atividade da enzima succinato desidrogenase (138). Deste modo, as duas enzimas ligadas à membrana, contendo flavina-adenina dinucleótido (FAD), catalisam a interconversão de fumarato e succinato pelo que a succinato desidrogenase é necessária para o crescimento em condições aeróbias (138).

Neste trabalho, a CMI do tiabendazol foi de 1000 mg/L na estirpe AG100_{TET} e superior a 1000 mg/L para a AG100 e AG100A. Estes resultados demonstraram que este composto não apresenta qualquer efeito antimicrobiano (Tabela 8). Porém, na estirpe AG100A, promoveu a diminuição significativa (4x) da CMI da gentamicina (Tabela 9). Relativamente ao efeito do composto na acumulação de EtBr, demonstrou-se que não é um potencial inibidor de efluxo ($FFR < 1$) (Tabela 10.)

Assim, os resultados observados para a CMI da gentamicina na estirpe AG100A, poderão dever-se à atividade de outras bombas de efluxo RND, por exemplo o sistema AcrEF-TolC (124). No sistema de *E. coli* estudado, este composto poderá não inibir a enzima fumarato redutase, ser alvo de degradação enzimática, não conseguir entrar no meio intracelular devido a permeabilidade reduzida ou ser expelido por bombas de efluxo.

4.1.4. Atovaquone

O atovaquone é um análogo da ubiquinona, ou uma hidroxinaftoquinona, e é frequentemente indicado para a prevenção e tratamento da pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* e da malária por *Plasmodium falciparum*. Nesta última, sugere-se que o alvo do atovaquone seja o complexo citocromo bc1 (Complexo III), constituído por várias enzimas associadas à cadeia de transporte de eletrões mitocondrial via ubiquinona (139). O atovaquone inibe o transporte de eletrões e, consequentemente, causa a inibição indireta das enzimas metabólicas, podendo comprometer de seguida a inibição do ácido nucleico e da síntese de ATP (139). No entanto, estudos sugerem que os parasitas da malária desenvolvem rápida resistência ao atovaquone (140).

Neste trabalho, a CMI do atovaquone foi de 250 a >500 mg/L para as estirpes AG100, AG100A, e AG100_{TET} (Tabela 8). Porém, não foi possível testar uma gama mais alta de concentração de atovaquone, uma vez que a partir da concentração 250 mg/L o composto precipita, impedindo a visualização correta dos resultados, levando a uma interpretação pouco fidedigna.

Este fármaco permitiu também reduzir ligeiramente a CMI da tetraciclina na estirpe AG100 (Tabela 9). No entanto, este efeito não se verificou para as restantes estirpes, nem para outros antibióticos.

Apesar de promover uma ligeira diminuição da CMI da tetraciclina (na estirpe AG100), no ensaio de acumulação de EtBr, o atovaquone não demonstrou atividade de inibição do efluxo ($FFR < 1$) (Tabela 10). Assim, é possível que o efeito deste composto na CMI da tetraciclina seja devido a outro(s) mecanismo(s). Desta forma, não é expectável que uma monoterapia com este composto seja promissora, mas talvez possa ser explorado o seu uso em regimes de terapia combinada.

4.1.5. Benztiazida

A benztiazida é frequentemente utilizada para tratar hipertensão e edema, uma vez que inibe a reabsorção de Na^+/Cl^- dos túbulos contorcidos distais nos rins. No entanto, o mecanismo da benztiazida é pouco conhecido, mas pensa-se que pode ser mediado por ação nas anidrases carbónicas no músculo liso (141).

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a benztiazida não apresenta atividade antimicrobiana, pois obtiveram-se valores de CMI > 1000 mg/L, para as estirpes AG100 e AG100A, e 1000 mg/L para a AG100_{TET} (Tabela 8). Na estirpe AG100A (sistema AcrAB inactivo), observou-se a redução significativa da CMI da gentamicina, na presença da benztiazida. Porém, nas restantes estirpes não se observou qualquer efeito deste composto nas CMIs dos antibióticos testados (Tabela 9).

É possível que, ao inativar o sistema AcrAB-TolC, o efeito do composto na redução da CMI da gentamicina seja mais evidente. Por motivos técnicos (fluorescência do composto) não foi possível complementar o resultado anterior com os ensaios de acumulação de EtBr.

4.1.6. Amlodipina

A amlodipina é um medicamento anti-hipertensivo que pertence ao grupo de medicamentos chamados bloqueadores dos canais de cálcio dihidropiridínicos e, por isso, é frequentemente administrada no tratamento da hipertensão e da angina. Sabe-se que a amlodipina possui uma alta afinidade para as membranas celulares (142). No entanto, o seu mecanismo de ação não está totalmente elucidado (143).

Pensa-se que a presença de cloro (halogénio) seja a principal responsável pela atividade antimicrobiana deste composto (144). Outros autores sugerem que esta ação antibacteriana é resultado da inibição da enzima β -lactamase, ou da inibição de bombas de efluxo (145).

Em estudos anteriores, a amlodipina demonstrou atividade antibacteriana e de adjuvante da ação de alguns antibióticos, em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (146). Na estirpe *E. coli* K-12, um estudo demonstrou o efeito antimicrobiano da amlodipina (143), porém outros autores não observaram atividade antimicrobiana deste composto, mas verificaram a sua interação sinérgica com vários antibióticos, tais como cefuroxima, tigeciclina e claritromicina (147).

Estudos anteriores, também efetuados em *E. coli*, demonstraram que a amlodipina apresentou valores de CMI entre 50 e 800 mg/L (144, 148), enquanto para estirpe de referência e isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* a CIM foi de 15 mg/L (145). Neste trabalho, a CMI da amlodipina foi de 125 mg/L nas estirpes AG100 e AG100A, e de 250 mg/L para a estirpe AG100_{TET} (Tabela 8), resultado que está de acordo com os estudos previamente mencionados (144, 148). Por outro lado, os ensaios de acumulação também evidenciam a potencial inibição da atividade de efluxo deste composto para as estirpes AG100 (*wild-type*) e AG100_{TET} (sobreexpressão do AcrAB-TolC), em que o FFR foi de 3,55 e 3,19, respetivamente (Tabela 10). Estes resultados sugerem este composto poderá ser um potencial inibidor do sistema de efluxo AcrAB-TolC. Também se verificou efeito significativo da amlodipina na redução da CMI da gentamicina (4x) e do EtBr (8x), na estirpe AG100A, e no aumento da acumulação de EtBr (Tabela 9). Desta forma, estes resultados poderão ser explicados pela inibição de outros sistemas de efluxo que não o AcrAB-TolC.

Para confirmar a potencial atividade inibitória de efluxo da amlodipina, realizaram-se os ensaios de efluxo de EtBr em paralelo com o inibidor clorpromazina (controlo positivo).

Os resultados evidenciaram que a amlodipina impediu o efluxo de EtBr nas estirpes AG100, AG100A e AG100_{TET}, podendo afirmar que este é um inibidor de bombas de efluxo (Figura 14).

4.1.7. Topiramato

O topiramato é um anticonvulsivante, frequentemente utilizado no controlo da epilepsia e na profilaxia e tratamento de enxaquecas. No entanto, o seu mecanismo de ação no tratamento da enxaqueca ainda não está completamente caracterizado. Porém, sabe-se que atua nos canais de sódio dependentes de voltagem e inibe as enzimas ACs (149).

Neste trabalho, a CMI do topiramato foi de >1500 mg/L nas estirpes AG100 e AG100A e 1500 mg/L na AG100_{TET} (Tabela 8). Na estirpe AG100A, a CMI da gentamicina sofreu uma diminuição de 4x na presença de topiramato. Este efeito adjuvante da atividade da gentamicina apenas se verificou na estirpe AG100A, que não expressa o sistema de efluxo AcrAB (Tabela 9). No entanto, é pouco provável que esta redução de CMI resulte da inibição de outros sistemas de efluxo, uma vez que o valor de FRR foi inferior a 1 nos ensaios de acumulação de EtBr (Tabela 10).

4.1.8. Sulpirida

A sulpirida é frequentemente indicada para o tratamento da esquizofrenia crónica e aguda, sendo um antagonista do receptor de dopamina D2. É possível que o alvo preditivo deste fármaco seja a AC, em *E. coli* (150). Neste estudo, este fármaco apresentou valores de CMI elevados em todas as estirpes testadas (1500 mg/L) (Tabela 8). No entanto, a sulpirida reduziu em 8x a CMI da gentamicina na estirpe de AG100A (Tabela 9). Tendo em conta que a sulpirida também promoveu a acumulação de EtBr (FRR > 1,29) (Tabela 10), então a diminuição da CMI da gentamicina poderá ser resultado da inibição de outros sistemas de efluxo, que não o AcrAB.

4.1.9. Metformina

A metformina é frequentemente utilizada para tratamento de doentes com diabetes do tipo II. Trata-se de um anti-hiperglicémico biguanida, que reduz a concentração de glucose no sangue, sem causar hipoglicemia. Este composto promove uma diminuição da resistência à insulina, reduz os níveis de insulina no plasma em jejum, e induz perda de peso (151).

Para além de ser frequentemente utilizado como antidiabético, também já foi descrita atividade antibacteriana para este composto (145). De facto, existem estudos que indicam que a metformina possui uma CMI de 400 mg/L em diversas espécies bacterianas, nomeadamente em *E. coli*. Desta forma, sugeriu-se que este composto possui ação antibacteriana, possivelmente devido ao rompimento da membrana interna da bactéria (145). Outros estudos sugerem que a metformina induz diversos mecanismos antimicrobianos em células uroepiteliais, provavelmente quando associada com a resposta imune inata (152).

Porém, este estudo demonstra que a metformina não é um antimicrobiano promissor, uma vez que nas três estirpes de *E. coli* a CMI deste composto foi >1500 mg/L (Tabela 8). Também não se observou efeito adjuvante da atividade dos antibióticos utilizados neste estudo (Tabela 9), nem demonstrou ser um potencial inibidor de efluxo ($FFR < 1$) (Tabela 10).

Desta forma, tendo em conta que a atividade *in vitro* de um fármaco pode depender da permeabilidade celular, atividade de bombas de efluxo, e afinidade para o alvo, um destes fatores poderá ser a causa para a ausência de atividade da metformina neste trabalho.

4.1.10. Clorpromazina

A clorpromazina é um antipsicótico administrado no tratamento de náuseas e vômitos, da ansiedade pré-operatória, em casos de esquizofrenia, e em doentes com transtorno bipolar, entre outras indicações (153). Estudos anteriores demonstraram que a clorpromazina, liga-se a AcrB, interfere na ligação a outros substratos, atua como inibidor de efluxo e aumenta a acumulação intracelular de EtBr pela ligação à bolsa distal de AcrB (87). Desta forma, a clorpromazina foi incluída como controlo positivo nos ensaios de acumulação e de efluxo do EtBr, neste estudo.

Apenas se verificou efeito significativo deste composto na CMI do EtBr na estirpe AG100A (redução de 4x) (Tabela 9). Tendo em conta que a clorpromazina promoveu a acumulação de EtBr ($FRR = 2,26$) (Tabela 10), então a diminuição do valor da CMI poderá ser explicada, pelo menos em parte, pela inibição da atividade de bombas de efluxo (que não o sistema AcrAB). Por outro lado, não se verificou efeito na CMI dos antibióticos nas restantes estirpes estudadas (Tabela 9).

No entanto, os ensaios de acumulação e de efluxo de EtBr revelaram que este composto é um potencial inibidor de efluxo (Figuras 13 e 14), conforme descrito na literatura (87). No entanto, não se observou correlação com efeito da clorpromazina na CMI do EtBr, o que poderá ser explicado pelas diferenças técnicas entre as duas metodologias. Os resultados verificados para a clorpromazina são semelhantes aos obtidos para a amlodipina, sugerindo que ambos os compostos poderão apresentar uma atividade inibitória de efluxo idêntica.

4.2. Avaliação da atividade antimicrobiana do composto mais promissor contra isolados clínicos de *E. coli*.

Os resultados anteriores permitiram selecionar a amlodipina como o composto com atividade inibitória de efluxo mais promissora. Posteriormente, determinou-se a atividade antimicrobiana da amlodipina e o seu potencial efeito adjuvante da ação da tetraciclina, ciprofloxacina, gentamicina e EtBr, em 6 isolados clínicos de *E. coli*.

O isolado **27** foi o que demonstrou maior suscetibilidade à tetraciclina (CMI < 8 mg/L) (Tabela 12), o que vai ao encontro com o perfil de suscetibilidade previamente determinado no laboratório de ISTs do IHMT. Esperava-se que o isolado **182** também apresentasse suscetibilidade a este antibiótico, mas demonstrou resistência pela determinação de CMI por microdiluição (CMI >8 mg/L) (123). As restantes estirpes apresentaram resistência à tetraciclina, de acordo com o esperado. Quanto à ciprofloxacina, todos os isolados clínicos testados, à exceção do isolado **31**, foram suscetíveis a este antibiótico (Tabela 12, CMI ≤ 0,25 mg/L) (123), conforme os dados anteriores do laboratório.

Os resultados obtidos demonstraram que todos os isolados são suscetíveis à gentamicina (Tabela 12) (123), confirmando os resultados já descritos.

Na presença de amlodipina, a CMI da tetraciclina reduziu significativamente (8x), nos isolados **30**, **159** e **181** e sofreu uma ligeira diminuição (2x) nos restantes isolados **31** e **182** (Tabela 12). A CMI da ciprofloxacina na presença de amlodipina diminuiu ligeiramente (2x) em todos os isolados, à exceção da **182**, onde não se verificou nenhum efeito (Tabela 12). A CMI da gentamicina na presença do mesmo composto reduziu significativamente (4x) nos isolados **159** e **181**, mas apenas ligeiramente (2x) nos restantes (Tabela 12). Relativamente à CMI do EtBr, a amlodipina promoveu uma

redução significativa (8x) nos isolados **30, 159 e 181**, mas apenas uma ligeira diminuição (2x) nos restantes isolados **27, 31 e 182**.

Resumindo, os isolados **30, 159 e 181** apresentaram um perfil de suscetibilidade semelhante, e um maior efeito da amlodipina na CMI dos antibióticos. Os isolados **27, 31 e 182** apresentam perfil de suscetibilidade mais distintos entre si. Para além desta observação, também foi evidente que a amlodipina não teve efeito significativo na redução da CMI dos antibióticos testados nestes isolados.

Seria interessante estudar o efeito da amlodipina na acumulação e efluxo do EtBr em todos os isolados clínicos estudados neste trabalho, como complemento aos resultados obtidos. Desta forma, seria possível avaliar se a atividade inibitória de efluxo variava entre os diferentes isolados e de acordo com o resultado observado para as CMIs dos antibióticos e EtBr.

4.3. Desenvolvimento de IEs: desafios e perspetivas futuras

Neste estudo, a amlodipina mostrou ser o composto mais promissor como potencial IE. No futuro, seria interessante explorar o seu mecanismo de ação, confirmar o(s) seu(s) alvo(s) molecular(es), e estudar a interação entre este composto e o sistema AcrAB-TolC, através de modelos computacionais.

No passado, diversos IEs foram descritos com ação nas principais bombas de efluxo de bactérias Gram-negativas resistentes aos antimicrobianos, tais como os sistemas AcrAB-TolC e MexAB-OprM de *E. coli* e *P. aeruginosa*, respetivamente (154). O composto PaβN demonstrou atividade de inibição de bombas de efluxo em *P. aeruginosa* e efeito adjuvante promissor da atividade de antibióticos (93).

Outro exemplo de IE descrito na literatura é a tioridazina, conhecida por ter sido utilizada como terapia de último recurso no tratamento de doentes com tuberculose extensivamente resistente (155, 156). Sugere-se que a tioridazina poderá apresentar alvos distintos em diferentes vias metabólicas em *Mycobacterium tuberculosis*, pelo que poderia ser potencialmente utilizada em terapêutica combinada com antibacilares atuais (157).

No entanto, apesar de vários inibidores de efluxo terem sido descritos na literatura, nenhum foi aprovado e implementado na prática clínica, até ao momento (158). De facto, na maioria dos casos, o desenvolvimento destes compostos não avança para além dos estudos pré-clínicos (159).

Várias empresas farmacêuticas, como por exemplo a Pfizer, desenvolveram programas para a identificação de fármacos IEs, com potencial efeito adjuvante da terapêutica antimicrobiana, mas nenhum dos inibidores identificados foi desenvolvido, por não apresentarem parâmetros aceitáveis de toxicidade (160). Neste sentido, os programas de desenvolvimento de IEs para uso clínico têm encontrado diversas limitações, sendo as mais evidentes: potência e espectro de atividade do composto, farmacocinética e toxicidade (158). No entanto, se for conhecido em detalhe o modo de inibição e o sítio de ligação do composto candidato a IE, poderá ser possível desenvolver análogos, contornando as limitações anteriormente descritas (158).

Apesar do esforço e investimento que ainda serão necessários até ao desenvolvimento de um IE que possa ser utilizado com sucesso na prática clínica, as vantagens que poderão resultar da utilização destes compostos e da abordagem de reposicionamento de fármacos fazem com que seja crucial continuar a desenvolver estudos nesta área de forma a combater a problemática da resistência aos antibióticos.

5. CONCLUSÃO

A bactéria *E. coli* é responsável por causar infecções do trato urinário, meningite, abscessos em diferentes órgãos do corpo, enterite aguda em humanos e animais, e a conhecida “diarreia do viajante” (24). Devido à emergência de estirpes de *E. coli* resistentes aos antimicrobianos, as opções terapêuticas tornaram-se cada vez mais limitadas. As bombas de efluxo são um mecanismo importante na emergência da resistência bacteriana e constituem um alvo atrativo para o desenvolvimento de novos fármacos. De facto, uma estratégia que permitiria combater a resistência aos antimicrobianos consiste no desenvolvimento de IEs capazes de restaurar a atividade de antibióticos em bactérias resistentes (85). O reposicionamento de fármacos permite acelerar o processo de desenvolvimento de medicamentos, reduzindo custos e aumentando a probabilidade de sucesso (104, 106).

Este estudo baseou-se numa estratégia de reposicionamento de fármacos (116, 117, 118) de modo a identificar compostos já aprovados com potencial atividade contra bombas de efluxo, nomeadamente o sistema AcrAB-TolC em *E. coli*. Estudou-se um grupo de nove compostos com atividade preditiva contra proteínas do metabolismo energético bacteriano. Foi possível demonstrar que a doxorrubicina, a amlodipina e o atovaquone apresentaram maior atividade antimicrobiana. No entanto, a doxorrubicina demonstrou ser substrato do sistema de efluxo AcrAB-TolC. Por outro lado, verificou-se um efeito significativo dos compostos tiabendazol, benzotiazida, amlodipina, topiramato e sulpirida na redução da CMI da gentamicina na estirpe AG100A (sistema AcrAB-TolC inativo). A amlodipina parece ser o compostos mais promissor, pois apresentou maior atividade inibitória de efluxo nos ensaios de fluorimetria em tempo real, e promoveu a redução da CMI da gentamicina, da tetraciclina e do EtBr, em isolados clínicos de *E. coli* resistentes à tetraciclina. Assim, seria interessante continuar a explorar o potencial da amlodipina em estudos futuros, nomeadamente clarificar o seu mecanismo de ação, confirmar o alvo molecular em *E. coli*, e efetuar ensaios de toxicidade em linhas celulares animais e humanas.

A estratégia utilizada neste trabalho demonstrou potencial na identificação de novos inibidores de efluxo em bactérias Gram-negativas, em particular em *E. coli*, e poderá contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para combater a emergência de resistência aos antimicrobianos.

6. REFERÊNCIAS

1. World Health Organization (WHO). Antimicrobial resistance [internet]. Geneva, Switzerland. Citado em 23 de Agosto de 2022, disponível em <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance>.
2. von Nussbaum F, Brands M, Hinzen B, Weigand S, Häbich D. Antibacterial natural products in medicinal chemistry-exodus or revival?. *Angew Chem.* 2006; 45(31):5072-129.
3. Reis AC, Kolvenbach BA, Nunes OC, & Corvini PF. Biodegradation of antibiotics: The new resistance determinants – part I. *New Biotechnology.* 2020; 54: 34-51.
4. Guimarães DO, Momesso LD, & Pupo MT. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova.* 2010; 33(3): 667-79.
5. Larsson DG, & Flach CF. Antibiotic resistance in the environment. *Nat Rev Microbiol* 2021; 93.
6. European Centre for Disease Prevention and Control. An agency of the European Union [Internet] 2005. Citado em 23 de Agosto de 2022; Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en>
7. WHO Regional Office for Europe/European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 – 2020 data. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe.
8. Antimicrobial Resistance Collaborators*. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet.* 2022; 399(10325):629-55.
9. Pallasch TJ. Antibiotic resistance. *Dental Clinics* 2003;47(4):623-39.
10. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson, M, Monnet, DL, Cavaleri M. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2018;18(3):318–27.
11. Breijyeh Z, Jubeh B, Karaman R. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules* 2020;25(6):1340.
12. Whitfield C, Clarke BR. Fourth Edition. Thomas Schmidt, 2019. *Encyclopedia of Microbiology, Lipopolysaccharides (Endotoxins)*; p.791-802.

13. Pajerski W, Ochońska D, Brzychczy-Włoch M, Indyka P, Jarosz M, Golda-Cepa M, Kotarba A. Attachment efficiency of gold nanoparticles by Gram-positive and Gram-negative bacterial strains governed by surface charges. *J Nanopart Res* 2019; 21(8).
14. Skariyachan S, Garka S. Exploring the binding potential of carbon nanotubes and fullerene towards major drug targets of multidrug resistant bacterial pathogens and their utility as novel therapeutic agents. In: *Fullerens, Graphenes and Nanotubes*. 2018. p.1-29.
15. Mota FS, Oliveira HA, Souto RC. Profile and prevalence of antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria isolated from intensive care patients. *Rev bras anal Clin* 2018;50(3):270-77.
16. Nagarjuna D, Mittal G, Dhanda R, Verma P, Gaiind R, Yadav M. Faecal *Escherichia coli* isolates show potential to cause endogenous infection in patients admitted to the ICU in a tertiary care hospital. *New Microbes New Infect* 2015;7:57-66.
17. Buckle J. Chapter seven - Infection. In: Buckle J, editor. *Clinical Aromatherapy (Third Edition)* [Internet]. Third Edition. St. Louis: Churchill Livingstone; 2015. p.130-67.
18. Krylov VN. *Advances in Virus Research*. vol. 88 [Internet]. Academic Press: Maramorosch K, Murphy FA, editors; 2014. Chapter Five, Bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*: Long-Term Prospects for Use in Phage Therapy. Academic Press; 2014. p.227–78.
19. Araos R, D'Agata. E. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Ninth Edition. Elsevier Inc; 2020. Chapter 219. *Pseudomonas aeruginosa* and Other *Pseudomonas* Species; p.2686-99.
20. Pinto AR. Resistência mediada por efluxo em *Escherichia coli*: novas estratégias terapêuticas utilizando antibióticos e inibidores de efluxo. [Dissertação de mestrado] Universidade Nova de Lisboa, Lisboa; 2012.
21. Chart H. Medical Microbiology. Eighteenth Edition. Elsevier Inc; 2012. *Klebsiella, enterobacter, proteus* and other enterobacteria: Pneumonia; urinary tract infection; opportunist infection; p.290-97.
22. Nelson GE, & Greene MH. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Ninth Edition. Elsevier Inc; 2020. Chapter 218 *Enterobacteriaceae*; p.2669-85.

23. Kradin RL. Pulmonary Infection. *Understanding Pulmonary Pathology* 2017;157-242.
24. Percival SL, & Williams DW. Second Edition. Amsterdam; Boston: Elsevier/Academic Press, 2014. Chapter Six, *Escherichia coli* in *Microbiology of Waterborne Diseases*; p.89–117.
25. Nataro JP, & Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998;11(1).
26. Poirel L, Madec JY, Lupo A, Schink AK, Kieffer N, Nordmann P, Schwarz S. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 2018;6(4).
27. Gu H, Chen A, Song X, Brasch ME, Henderson JH, Ren D. How *Escherichia coli* lands and forms cell clusters on a surface: a new role of surface topography. *Sci Rep* 2016; 29516.
28. Desmarchelier P, Fegan N. *Escherichia coli*. In: Roginski H, editor. *Encyclopedia of Dairy Sciences* [Internet]. Oxford: Elsevier; 2002; 948–54. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0122272358001589>.
29. Sharma S, Kaur N, Malhotra S, Madan P, Ahmad W, Hans C. Serotyping and Antimicrobial Susceptibility Pattern of *Escherichia coli* Isolates from Urinary Tract Infections in Pediatric Population in a Tertiary Care Hospital. *J Pathog* 2016;2016:2548517
30. Desmarchelier P, Fegan N. Pathogens in Milk: *Escherichia coli*. In: Reference Module in Food Science [Internet]. Elsevier; 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081005965009896>
31. Lim JY, Yoon JW, Hovde CJ. A Brief Overview of *Escherichia coli* O157:H7 and Its Plasmid O157. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2010;20(1):5-14.
32. Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Ilio CD. *Escherichia coli* in Europe: an overview. *Int J Environ Res Public Health* 2013;10(12):6235-54.
33. Fernandes P. Antibacterial discovery and development—the failure of success? *Nat Biotechnol* 2006;24:1497-1503.
34. Singh SB, Young K, Silver LL. What is an “ideal” antibiotic ? Discovery challenges and path forward. *Biochem Pharmacol* 2017;133:63–73.
35. Döhren HV. Antibiotics: Actions, origins, resistance. *Protein Sci* 2003;13(11):3059–60.

36. Silver LL. Challenges of Antibacterial Discovery. Clin Microbiol Rev 2011;24(1):71-109.
37. Martins M, Dastidar SG, Fanning S, Kristiansen JE, Molnar J, Pages JM, Amaral L. Potential role of non-antibiotics (helper compounds) in the treatment of multidrug-resistant Gram-negative infections: mechanisms for their direct and indirect activities. Int J Antimicrob Agents 2008;31(3):198-208.
38. Sánchez S, & Demain AL. The amazing world of antibiotics. Biochem Pharmacol 2017;133:1-3.
39. Pagès JM, Masi M, Barbe J. Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. Trends Mol Med 2005;11(8):382-89.
40. Eyler RF, Shvets K. Clinical Pharmacology of Antibiotics. Clin J Am Soc Nephrol 2019;14(7):1080-90.
41. Kakoullis L, Papachristodoulou E, Chra P, Panos G. Mechanisms of Antibiotic Resistance in Important Gram-Positive and Gram-Negative Pathogens and Novel Antibiotic Solutions. Antibiotics 2021;10(4):415.
42. Nicolle L, Anderson PA, Conly J, Mainprize TC, Meuser J, Nickel JC, Zhanel GG. Uncomplicated urinary tract infection in women. Current practice and the effect of antibiotic resistance on empiric treatment. Can Fam Physician 2006;52(5):612-18.
43. Pitout JD. (2012). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: an update on antimicrobial resistance, laboratory diagnosis and treatment. Expert Rev Anti Infect Ther 2012;10(10):1165–76.
44. Thakuria B, Lahon K. The Beta Lactam Antibiotics as an Empirical Therapy in a Developing Country: An Update on Their Current Status and Recommendations to Counter the Resistance against Them. J Clin Diagn Res 2013;7(6):1207–14.
45. Eckburg PB, Lister T, Walpole S, Keutzer T, Utley L, Tomayko J, Coleman S. Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Drug Interaction Potential of SPR741, an Intravenous Potentiator, after Single and Multiple Ascending Doses and When Combined with β -Lactam Antibiotics in Healthy Subjects. Antimicrob. Agents Chemother 2019;63(9):e00892-19.
46. Bush K, Macielag MJ. New β -lactam antibiotics and β -lactamase inhibitors. Expert Opin Ther Pat 2010;20(10):1277-93.

47. Sykes JE, Papich MG. Canine and Feline Infectious Diseases. Elsevier Inc; 2014. Chapter 8, Antibacterial Drugs; p.66–6.
48. Meletis, G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis* 2015;3(1):15-21.
49. Castle SS. Penicillins. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. 2007;1-3.
50. Lima LM, Silva BN, Barbosa G, Barreiro EJ. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *Eur J Med Chem* 2020;208:112829.
51. Arumugham VB, Gujarathi R, Cascella M. Third Generation Cephalosporins [Internet]. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2022.
52. Arias CA, Murray BE. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Eighth Edition. Philadelphia: W.B. Saunders; 2015. Chapter 202, *Enterococcus Species*, *Streptococcus gallolyticus* Group, and *Leuconostoc Species*; p.2328-39.
53. Brar RK, Jyoti U, Patil RK, Patil HC. Fluoroquinolone antibiotics: An overview. *Adesh Univ J Med Sci Res* 2020;2(1), 26-30.
54. Patrick, Graham L. Sixth edition. Oxford university press; 2005. An introduction to medicinal chemistry. p.912.
55. Fàbrega A, Ballesté-delpierre C, Vila J. Antimicrobial Resistance and Food Safety. San Diego: Academic Press; 2015. Chapter five, Antimicrobial Resistance in *Yersinia enterocolitica*. p.77–104.
56. Groman RP. Small Animal Critical Care Medicine. Second Edition. Silverstein DC, Hopper K, editors. St. Louis: W.B. Saunders; 2015; Chapter 177, Aminoglycosides; p.930–4.
57. Towne TG. Encyclopedia of Toxicology Third Edition. Wexler P, editor. Oxford: Academic Press; 2014; Aminoglycosides; p.191–3.
58. Daum RS. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. Fourth Edition. London: Elsevier, Long SS, editor; 2012; Chapter 115, *Staphylococcus aureus*; p. 675-89.e6.
59. Wu D, Ding Y, Yao K, Gao W, Wang Y. Antimicrobial Resistance Analysis of Clinical *Escherichia coli* Isolates in Neonatal Ward. *Front Pediatr* 2021;9.

60. Blair JM, Piddock LJ. Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Curr Opin Microbiol* 2009;12(5):512-19.
61. Kakurinov V. Food Safety Assurance Systems: Cleaning and Disinfection. *Encyclopedia of Food Safety* 2014;4:211-25.
62. Kostyanev T, Can F. Developments in Emerging and Existing Infectious Diseases. Pulcini C, Ergönül Ö, Can F, Beović B, editors. *Antimicrobial Stewardship*. Academic Press; 2017; Chapter 1 - The Global Crisis of Antimicrobial Resistance; p.3-12.
63. Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol* 2018;4(3):482–501.
64. Alav I, Sutton JM, Rahman K. M. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73(8), 2003-20.
65. Karam G, Chastre J, Wilcox MH, & Vincent JL. Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. *Crit Care* 2016; 20.
66. Rifkind D, Freeman GL. The Nobel Prize Winning Discoveries in Infectious Diseases. Rifkind D, Freeman GL, editors. London: Academic Press; 2005. Chapter five, Penicilin; p.43–6.
67. World Health Organization (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance[internet]. Geneva, Switzerland. Obtido em 25 de Agosto de 2022, de World Health Organization: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/?sequence=1>
68. Karczmarczyk M, Martins M, Quinn T, Leonard N, Fanning S. Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Food-Producing Animals. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77(20):7113-20.
69. Wiedemann B, Heisig A, Heisig P. Uncomplicated Urinary Tract Infections and Antibiotic Resistance-Epidemiological and Mechanistic Aspects. *Antibiotics* 2014;3(3):341-52.
70. Soto SM. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence* 2013;4(3),223-29.
71. Arslan I. Trends in Antimicrobial Resistance in Healthcare-Associated Infections: A Global Concern. *Infect Immun* 2022;4:652-61.

72. Piddock LJ. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2006;19(2):382–402.
73. Du D, Veen HW, Murakami S, Pos KM, Luisi B. Structure, mechanism and cooperation of bacterial multidrug transporters. *Curr Opin Struct Biol* 2015;33:76-91.
74. Seukep AJ, Kuete V, Nahar L, Sarker SD, Guo M. Plant-derived secondary metabolites as the main source of efflux pump inhibitors and methods for identification. *J Pharm Anal* 2020;10(4): 277-90.
75. Dawson RJ, Locher KP. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* 2006;443:180-85.
76. Moussatova A, Kandt C, O'Mara ML, Tieleman DP. ATP-binding cassette transporters in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778(9):1757–71.
77. Ward A, Reyes CL, Yu J, Roth CB, Chang G. Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(48):19005-10.
78. Weston N, Sharma P, Ricci V, Piddock LJ. Regulation of the AcrAB-TolC efflux pump in *Enterobacteriaceae*. *Res Microbiol* 2018;169(7-8):425-31.
79. Li XZ, Nikaido H. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: an Update. *Drugs* 2009;69(12):1555-1623.
80. Youlden GH, Ricci V, Wang-Kan X, Piddock LJV, Jabbari S, King JR. Time dependent asymptotic analysis of the gene regulatory network of the AcrAB-TolC efflux pump system in gram-negative bacteria. *J Math Biol* 2021; 82.
81. Wang SC, Daveja P, Hendargo KJ, Javadi-Razaz I, Chou A, Yee DC, Jr MH. Expansion of the Major Facilitator Superfamily (MFS) to include novel transporters as well as transmembrane-acting enzymes. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2020;1862(9):183277.
82. Putman M, Veen HW, Konings WN. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol Biol Rev* 2000;64(4):672–93.
83. Sarkar S, Bhattacharyya A, Mandal S. YnfA, a SMR family efflux pump is abundant in *Escherichia coli* isolates from urinary infection. *Indian J Med Microbiol* 2015;33(1):139-42.

84. Kusakizako T, Miyauchi H, Ishitani R, Nureki O. Structural biology of the multidrug and toxic compound extrusion superfamily transporters. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2020;1862(12):183154.
85. Blanco P, Sanz-García F, Hernando-Amado S, Martínez JL, Alcalde-Rico M. The development of efflux pump inhibitors to treat Gram-negative infections. *Expert Opin Drug Discov* 2018;919-31.
86. Bohnert JA, Kern WV. Selected Arylpiperazines Are Capable of Reversing Multidrug Resistance in *Escherichia coli* Overexpressing RND Efflux Pumps. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(2):849-52.
87. Grimsey EM, Fais C, Marshall RL, Ricci V, Ciusa ML, Stone JW, Piddock LJ. Chlorpromazine and Amitriptyline Are Substrates and Inhibitors of the AcrB Multidrug Efflux Pump. *mBio* 2020;11(3):e00465-20.
88. Tambat R, Mahey N, Chandal N, Verma DK, Jangra M, Thakur KG, Nandanwar H. A Microbe-Derived Efflux Pump Inhibitor of the Resistance-Nodulation-Cell Division Protein Restores Antibiotic Susceptibility in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Infect Dis* 2022; 8(2):255-70.
89. Viveiros M, Jesus A, Brito M, Leandro C, Martins M, Ordway D, Amaral L. Inducement and Reversal of Tetracycline Resistance in *Escherichia coli* K-12 and Expression of Proton Gradient-Dependent Multidrug Efflux Pump Genes. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(8):3578-82.
90. Kinana AD, Vargiu AV, Nikaido H. (2013). Some Ligands Enhance the Efflux of Other Ligands by the *Escherichia coli* Multidrug Pump AcrB. *Biochem* 2013;52:8342-51.
91. Marchetti ML, Errecalde J, Mestorino N. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine on antimicrobial agent susceptibility in multidrug-resistant isogenic and veterinary *Escherichia coli* field strains. *J Med Microbiol* 2012;61(6):786-92.
92. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP. Increasing of the Aminoglycoside Antibiotic Activity Against a Multidrug-Resistant *E. coli* by *Turnera ulmifolia* L. and Chlorpromazine. *Biol Res Nurs* 2010;11(4):332-35.

93. Opperman TJ, Kwasny SM, Kim HS, Nguyen ST, Houseweart C, D'Souza S, Bowlin TL. Characterization of a Novel Pyranopyridine Inhibitor of the AcrAB Efflux Pump of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58(2):722-33.
94. Vargiu AV, Ruggerone P, Opperman TJ, Nguyen ST, Nikaido H. Molecular Mechanism of MBX2319 Inhibition of *Escherichia coli* AcrB Multidrug Efflux Pump and Comparison with Other Inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58(10):6224-34.
95. Samreen, Qais FA, Ahmad I. *In silico* screening and *in vitro* validation of phytocompounds as multidrug efflux pump inhibitor against *E. coli*. *J Biomol Struct Dyn* 2022;1-13.
96. Nunes PH, Freitas TS, Rocha JE, Pereira RL, Marinho MM, Oliveira MR, Marinho ES. Potentiation of antibiotic activity, and efflux pumps inhibition by (2E)-1-(4-aminophenyl)-3-(4-fluorophenyl)prop-2-en-1-one. *Fundam Clin Pharmacol* 2022; 1- 17.
97. Lu W-J, Hsu P-H, Chang C-J, Su C-K, Huang Y-J, Lin H-J, et al. Identified Seaweed Compound Diphenylmethane Serves as an Efflux Pump Inhibitor in Drug-Resistant *Escherichia coli*. *antibiotics* 2021;10(11):1378.
98. Anes J, McCusker MP, Fanning S, Martins M. The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 2015;6:587.
99. Dougherty MM, Marraffa JM. *Encyclopedia of Toxicology*. Third Edition. Oxford: Academic Press. Wexler P, editor; 2014. Phenothiazines; p.881-883.
100. Pieroni M. *Annual Reports in Medicinal Chemistry* 52, 27-69 (Elsevier, 2019).
101. Amaral L, Martins A, Molnar J, Kristiansen JE, Martins M, Viveiros M, Rodrigues L, Spengler G, Couto I, Ramos J, Dastidar S, Fanning S, McCusker M, Pages JM. Phenothiazines, Bacterial Efflux Pumps and Targeting the Macrophage for Enhanced Killing of Intracellular XDRTB. *In vivo* 2010;24(4):409-24.
102. Palumbo F, Garcia-Lainez G, Limones-Herrero D, Coloma MD, Escobar J, Jiménez MC, Miranda MA, Andreu I. Enhanced photo(geno)toxicity of demethylated chlorpromazine metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol* 2016;313:131-37.
103. Harikumar G, Krishanan K. The growing menace of drug resistant pathogens and recent strategies to overcome drug resistance: A review. *J King Saud Univ Sci* 2022;34(4):101979.

104. Farha MA, Brown ED. Drug repurposing for antimicrobial discovery. *Nat Microbiol* 2019;4:565-77.
105. Novac N. Challenges and opportunities of drug repositioning. *Trends Pharmacol Sci* 2013;34(5):267-72.
106. Zhan P, Yu B, Ouyang L. Drug repurposing: An effective strategy to accelerate contemporary drug discovery. *Drug Discov Today* 2022;27(7):1785-88.
107. Singh SB, Young K, Silver LL. What is an "ideal" antibiotic? Discovery challenges and path forward. *Biochem Pharmacol* 2017;133:63-3.
108. Pillaiyar T, Meenakshisundaram S, Manickam M, Sankaranarayanan M. A medicinal chemistry perspective of drug repositioning: Recent advances and challenges in drug discovery. *Eur J Med Chem* 2020;195:112275.
109. Peyclit L, Baron SA, Rolain J-M. Drug Repurposing to Fight Colistin and Carbapenem-Resistant Bacteria. *Front cell infect* 2019; 9.
110. Kaur H, Kalia M, Chaudhary N, Singh V, Yadav VK, Modgil V, Taneja N. Repurposing of FDA approved drugs against uropathogenic *Escherichia coli*: *In silico*, *in vitro*, and *in vivo* analysis. *Microb Pathog* 2022;169:105665.
111. Barbarossa A, Rosato A, Corbo F, Clodoveo ML, Fracchiolla G, Carrieri A, Carocci A. Non-Antibiotic Drug Repositioning as an Alternative Antimicrobial Approach. *Antibiotics* 2022;11(6):816.
112. Zheng W, Sunand W, Simeonov A. Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases. *Br J Pharmacol* 2018;175:181-91.
113. Cheng Y-S, Williamson PR, Zheng W. Improving therapy of severe infections through drug repurposing of synergistic combinations. *Curr Opin Pharmacol* 2019;48:92-8.
114. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI M100-ED32:2022 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, M100 32nd Edition. Obtido de <http://em100.edaptivedocs.net/dashboard.aspx>
115. Okusu H, Ma D, Nikaido H. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J Bacteriol* 1996;178(1): 306-08.
116. Neves BJ, Braga RC, Bezerra JC, Cravo PV, Andrade CH. *In Silico* Repositioning-Chemogenomics Strategy Identifies New Drugs with Potential Activity against

- Multiple Life Stages of *Schistosoma mansoni*. PLOS Negl Trop Dis 2015;9(2): e0003554.
117. Rodrigues L, Cravo P, Viveiros M. 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 2020;18(8):741-57.
 118. Pina AP. Identificação de novos fármacos para *Neisseria gonorrhoeae* através de uma estratégia de reposicionamento *in silico*. [Dissertação de mestrado]. Universidade Nova de Lisboa - Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Unidade de Microbiologia Médica, Lisboa. 2021.
 119. Consortium TU. UniProt: a hub for protein information. 2015;43(October 2014):204–12.
 120. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezuk Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: a better web interface. Nucleic Acids Research 2008;36:W5-W9.
 121. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fifteenth Informational Supplement M100-S15. CLSI, Wayne, PA, USA; 2005.
 122. Agostinho LDA, Mariotini-moura C, Augusto F. Apostila de aulas práticas biologia geral: Citologia, Genética e Biologia Molecular. Vol. II. [Internet] 2020. Citado a 04 de Setembro de 2022; Disponível em <https://www.researchgate.net/publication/345392861>.
 123. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0, 2022. Disponível em <http://www.eucast.org>.
 124. Paixão L, Rodrigues L, Couto I, Martins M, Fernandes P, Carvalho CC, Viveiros M. Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in *Escherichia coli*. J Biol Eng 2009;3(18).
 125. Viveiros M, Rodrigues L, Martins M, Couto I, Spengler G, Martins A, Amaral L. Evaluation of efflux activity of bacteria by a semi-automated fluorometric system. Methods mol biol 2010;642:159-72.
 126. Labortechnik. (2022). Real Time PCR Cyclo Rotor Gene 3000. Citado a 08 de Setembro de 2022; Disponível em <https://www.labortechnik.com>

127. Takatsuka Y, Chen C, Nikaido H. Mechanism of recognition of compounds of diverse structures by the multidrug efflux pump AcrB of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2010;107(15):6559-65.
128. Costa S, Lopes E, Azzali E, Machado D, Coelho T, Silva PE, Couto I. An Experimental Model for the Rapid Screening of Compounds with Potential Use Against Mycobacteria. *Assay Drug Dev Technol* 2016;14(9):524-34.
129. Machado L, Spengler G, Evaristo M, Handzlik J, Molnár J, Viveiros M, Amaral L. Biological activity of twenty-three hydantoin derivatives on intrinsic efflux pump system of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis NCTC 13349. *In Vivo* 2011;25(5):769-72.
130. Aires JR, Nikaido H. Aminoglycosides Are Captured from both Periplasm and Cytoplasm by the AcrD Multidrug Efflux Transporter of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2005;187(6):1923-29.
131. Westman EL, Canova MJ, Radhi IJ, Koteva K, Kireeva I, Waglechner N, Wright GD. Bacterial Inactivation of the Anticancer Drug Doxorubicin. *Chem Biol* 2012;19(10):1255-64.
132. Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos MS, Moreira PI. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem* 2009;16(25):3267–85.
133. Vardanyan RS, Hrubby VJ. 9 - Antiepileptic Drugs. In: Vardanyan RS, Hrubby VJ, editors. *Synthesis of Essential Drugs* [Internet]. Amsterdam: Elsevier; 2006;125-33.
134. Vardanyan RS, Hrubby VJ. 21 - Diuretics. In: Vardanyan RS, Hrubby VJ, editors. *Synthesis of Essential Drugs* [Internet]. Amsterdam: Elsevier; 2006;277–93.
135. Luca VD, Carginale V, Supuran CT, Capasso C. The gram-negative bacterium *Escherichia coli* as a model for testing the effect of carbonic anhydrase inhibition on bacterial growth. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2022;37(1):2092-98.
136. Nocentini A, Hewitt CS, Mastrolorenzo MD, Flaherty DP, Supuran CT. Anion inhibition studies of the α -carbonic anhydrases from *Neisseria gonorrhoeae*. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2021;36(1):1061-66.
137. Laudy AE. Non-antibiotics, Efflux Pumps and Drug Resistance of Gram-negative Rods. *Pol J Microbiol* 2018;67(2):129-35.

138. DrugBank. Thiabendazole: Uses, Interactions, Mechanism of Action., DrugBank Online. 2022.
139. DrugBank. Atovaquone: Uses, Interactions, Mechanism of Action., DrugBank Online. 2022.
140. Mather MW, Darrouzet E, Valkova-Valchanova M, Cooley JW, McIntosh MT, Daldal F, Vaidya AB. Uncovering the Molecular Mode of Action of the Antimalarial Drug Atovaquone Using a Bacterial System. *J Biol Chem* 2005;280(29):27458-65.
141. DrugBank. Benzthiazide: Uses, Interactions, Mechanism of Action. DrugBank Online. 2022.
142. DrugBank. Amlodipine: Uses, Interactions, Mechanism of Action. DrugBank Online. 2022.
143. Coelho SS, Rosa TF, Rampelotto RF, Serafin MB, Bottega A, Foletto VS, et al., Amlodipine Repositioning: Scientific Studies and Synergistic Effects. *Am J Ther* 2019;28(6):772-76.
144. Kumar KA, Ganguly K, Mazumdar K, Dutta N, Dastidar SG, Chakrabarty A. Amlodipine: a Cardiovascular Drug with Powerful Antimicrobial Property. *Acta Microbiol Pol* 2003;52(3):285-92.
145. Foletto VS, Rosa TF, Serafin MB, Bottega A, Hörner R. Repositioning of non-antibiotic drugs as an alternative to microbial resistance: a systematic review. *Int J Antimicrob Agents* 2021;58(3):106380.
146. Mazumdar K, Kumar KA, Dutta NK. Potential role of the cardiovascular non-antibiotic (helper compound) amlodipine in the treatment of microbial infections: scope and hope for the future. *Int J Antimicrob Agents* 2010;36(4):295-302.
147. Erdoğan E, Günel S. *In vitro* Interactions of Antibiotics with Drugs Used in Chronic Diseases. *Mid Blac Sea J Health Sci* 2021;7(2):178-85.
148. Kruszewska H, Zareba T, Kociszewska A, Tyski S. Activity of selected non-antibiotic medicinal preparations against standard microorganisms including bacterial probiotic strains. *Acta Pol Pharm* 2021;78(2):179-186.
149. DrugBank. Topiramate: Uses, Interactions, Mechanism of Action. DrugBank Online. 2022.
150. DrugBank. Sulpiride: Uses, Interactions, Mechanism of Action. DrugBank Online. 2022.

151. DrugBank. Metformin: Uses, Interactions, Mechanism of Action. DrugBank Online. 2022.
152. Majhi RK, Mohanty S, Kamolvit W, White JK, Scheffschick A, Brauner H, Brauner, A. Metformin strengthens uroepithelial immunity against *E. coli* infection. *Sci Rep* 2021;11:19263.
153. DrugBank. Chlorpromazine: Uses, Interactions, Mechanism of Action. DrugBank Online. 2022.
154. Pagès JM, Amaral L. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: Challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteom* 2009;1794(5):826-33.
155. Abbate E, Vescovo M, Natiello M, Cufre M, García A, Gonzalez Montaner P, Ambroggi M, Ritacco V, van Soolingen D. Successful alternative treatment of extensively drug-resistant tuberculosis in Argentina with a combination of linezolid, moxifloxacin and thioridazine. *J Antimicrob Chemother* 2012;67(2):473–77.
156. Udawadia ZF, Sen T, Pinto LM. Safety and efficacy of thioridazine as salvage therapy in Indian patients with XDR-TB. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2011;6(2):88-91.
157. Dutta NK, Mehra S, Kaushal D. A Mycobacterium tuberculosis Sigma Factor Network Responds to Cell-Envelope Damage by the Promising Anti-Mycobacterial Thioridazine. *PLoS One* 2010;5(4):e10069.
158. Opperman TJ, Nguyen ST. Recent advances toward a molecular mechanism of efflux pump inhibition. *Front Microbiol* 2015;6.
159. Hua Y, Dai X, Yuan Xu, Xing G, Liu H, Lu T, Zhang Y. Drug repositioning: Progress and challenges in drug discovery for various diseases. *Eur J Med Chem* 2022;234:114239.
160. Marshall RL, Lloyd GS, Lawler AJ, Element SJ, Kaur J, Ciusa ML, Ricci V, Tschumi A, Kühne H, Alderwick LJ, Piddock LJV. New Multidrug Efflux Inhibitors for Gram-Negative Bacteria. *mBio* 2020;11(4):e01340-20.