



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**TRANSPORTE DE BROMETO DE ETÍDIO ATRAVÉS DA
PAREDE CELULAR DE *Mycobacterium smegmatis*:
DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIAS DE
QUANTIFICAÇÃO DO TRANSPORTE E CORRELAÇÃO COM A
RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS**

JORGE ALEXANDRE DOS SANTOS RAMOS

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

MAIO DE 2010



**Transporte de brometo de etídio através da parede celular de
Mycobacterium smegmatis: Desenvolvimento e aplicação de
metodologias de quantificação do transporte e correlação com a
resistência aos antibióticos**

Jorge Alexandre dos Santos Ramos

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA

Orientador: Professor Doutor Miguel Viveiros

Laboratório onde o trabalho experimental foi desenvolvido:

**Unidade de Ensino e Investigação em Micobactérias
Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Mai de 2010

Os resultados apresentados foram objecto das seguintes comunicações em co-autoria:

Ramos, J., L. Rodrigues, I. Couto, L. Amaral, and M. Viveiros. 2009. Methods for assessment of ethidium bromide transport across *Mycobacterium smegmatis* cell wall. PP-113, p. 185. *In* Final Programme of the 30th Annual Congress of European Society of Mycobacteriology (ESM). Porto, Portugal.

Ramos, J., L. Rodrigues, I. Couto, L. Amaral, and M. Viveiros. 2009. The effect of efflux pumps inhibitors on the transport of ethidium bromide and antimicrobials across *Mycobacterium smegmatis* cell wall. Abstr. S3-297. *In* Livro de Actas do Congresso Microbiotec 2009. Vilamoura, Portugal.

Trabalhos publicados ou em preparação para publicação relacionados directamente com o desenvolvimento desta tese:

Martins, A., G. Spengler, L. Rodrigues, M. Viveiros, J. Ramos, M. Martins, I. Couto, S. Fanning, J.M. Pagès, J.M. Bolla, J. Molnar and L. Amaral. 2009. pH Modulation of efflux pump activity of multi-drug resistant *Escherichia coli*: protection during its passage and eventual colonization of the colon. PLoS One. **8**:e6656.

Rodrigues, L., J. Ramos, I. Couto, L. Amaral, and M. Viveiros. Demonstration of ethidium bromide transport in *M. smegmatis* by a semi-automated fluorometric method. Em preparação para publicação numa revista científica internacional.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Miguel Viveiros, pela orientação ministrada durante a realização deste trabalho, pela partilha da sua experiência e conhecimentos, e pelo seu incentivo permanente no decorrer deste trabalho.

Ao Professor Doutor Leonard Amaral, Director da Unidade de Ensino e Investigação em Micobactérias durante o desenvolvimento/execução desta tese, pelo conjunto de conhecimentos e saberes que me transmitiu.

À Professora Doutora Isabel Couto, da Unidade de Ensino e Investigação em Micobactérias, por todos os importantes conhecimentos proporcionados.

À Liliana pela ajuda e disponibilidade constante demonstrada durante a elaboração deste trabalho.

À Diana, Marta, Sofia, Ana, Susana, Gabriella, Pedro e Samuel, membros da Unidade de Ensino e Investigação em Micobactérias, pelo constante apoio e excelente espírito de equipa.

À D. Fernanda e D. Cidália pelo apoio prestado.

Aos meus colegas de mestrado, e em especial, ao Ferdinando, Sandra, Margarida e Filipa, por me terem proporcionado excelentes momentos na sua companhia.

Aos meus amigos Ricardo, Sebastião e João Pedro pelo companheirismo e apoio ao longo deste percurso.

Aos meus pais e à minha irmã pelo carinho, paciência e apoio incondicional que sempre manifestaram ao longo da minha vida.

Resumo

O efluxo activo e a permeabilidade celular reduzida são consideradas as principais causas da resistência intrínseca micobacteriana a diversos antimicrobianos. Neste estudo comparámos a capacidade de extrusão do brometo de etídio (EtBr), um substrato universal de bombas de efluxo, pela estirpe selvagem *M. smegmatis* mc²155 com estirpes mutantes deletadas para LfrA e MspA, respectivamente a principal bomba de efluxo e porina de *M. smegmatis*, na presença e ausência dos inibidores de bombas de efluxo (IBEs) verapamil, tioridazina, clorpromazina e carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP) e correlacionámos estes resultados com a capacidade destes IBEs em reduzir a susceptibilidade de *M. smegmatis* a diversos antibióticos.

Os resultados obtidos mostram que, na ausência da principal porina de *M. smegmatis*, MspA, a acumulação de EtBr diminui e as células tornam-se igualmente mais resistentes a diversos antibióticos. Quando a principal bomba de efluxo de *M. smegmatis*, LfrA, é deletada a estirpe mutante apresenta um incremento na acumulação de EtBr e um aumento na susceptibilidade ao EtBr, isoniazida, rifampicina, etambutol e ciprofloxacina. Na presença dos IBEs testados, com excepção do CCCP, observa-se uma redução da concentração mínima inibitória para a estreptomicina, rifampicina, amicacina, ciprofloxacina, claritromicina e eritromicina.

Estes resultados colocam em evidência que a porina MspA é um canal importante para a entrada de EtBr e antibióticos nas células e que o efluxo activo através da bomba de efluxo LfrA está envolvido na resistência de baixo nível a diversos antibióticos e EtBr em *M. smegmatis*.

As metodologias desenvolvidas neste trabalho e os resultados obtidos proporcionaram um contributo para o melhor conhecimento dos dois principais mecanismos responsáveis pela resistência intrínseca micobacteriana a diversos antimicrobianos, considerada como um importante factor facilitador da aquisição e estabilização de um património genético que conduz ao desenvolvimento de resistência de alto nível em micobactérias.

Abstract

Active efflux systems and reduced cell wall permeability are considered to be the main causes of mycobacterial intrinsic resistance to many antimicrobials. In this study we have compared *M. smegmatis* wild-type strain mc²155 with mutants for LfrA and MspA, the main efflux pump and porin of *M. smegmatis*, respectively, for their ability to extrude ethidium bromide (EtBr), a known efflux pump substrate, in the presence or absence of the efflux pump inhibitors (EPIs) verapamil, thioridazine, chlorpromazine and carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP), and correlated these results with the ability of the EPI to reduce the susceptibility of *M. smegmatis* to several antimicrobials.

The results obtained show that, in the absence of the major porin of *M. smegmatis*, MspA, the accumulation of EtBr decreased and the cells became equally more resistant to several antibiotics. When the major *M. smegmatis* efflux pump, LfrA, is deleted the mutant strain show increased accumulation of EtBr and increased susceptibility to EtBr, isoniazid, rifampicin, ethambutol and ciprofloxacin. Reduction of the minimum inhibitory concentration for streptomycin, rifampicin, amikacin, ciprofloxacin, clarithromycin and erythromycin is observed in the presence of the EPI tested, with the exception of CCCP.

These results put in evidence that MspA porin is an important channel for entrance of EtBr and antibiotics into the cells and that active efflux *via* the LfrA efflux pump is involved in low-level resistance to several antibiotics and EtBr in *M. smegmatis*.

The methodologies developed in this work and the results obtained provided a contribution to the knowledge of the two major mechanisms responsible for mycobacteria intrinsic resistance to several antibiotics, considered an important facilitator factor to the acquisition and stabilization of a genetic background for the development of high-level resistance in mycobacteria.

Índice Geral

Comunicações e publicações	i
Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas	xii
I - INTRODUÇÃO	1
1. Micobacterioses	1
1.1. Epidemiologia	1
1.2. Transmissão e patogénese	2
2. Género <i>Mycobacterium</i>	4
2.1. Características gerais	4
2.2. <i>Mycobacterium smegmatis</i>	8
3. Resistência aos agentes antimicrobianos	9
3.1. Agentes antimicrobianos	9
3.2. Mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos	11
3.3. Agentes antimicrobianos com actividade antimicobacteriana: Mecanismos de acção e de resistência	13
3.4. Mecanismos de resistência por aumento da impermeabilidade	17
3.5. Mecanismos de resistência por aumento da expressão de bombas de efluxo	18
3.5.1. Bombas de efluxo	18
3.5.1.1. Superfamília “ATP-Binding Cassete” (ABC)	20
3.5.1.2. Superfamília “Major Facilitator” (MFS)	21
3.5.1.3. Família “Small Multidrug Resistance” (SMR)	22
3.5.1.4. Superfamília “Resistance-nodulation-cell division” (RND)	22
3.5.1.5. Família “multidrug and toxic compound extrusion” (MATE)	23
3.5.2. Bombas de efluxo em micobactérias	24
3.5.2.1. Bombas de efluxo em <i>M. smegmatis</i>	26

3.5.3. Inibidores de bombas de efluxo (IBEs)	27
4. Métodos para a detecção do transporte de compostos através da parede celular bacteriana	29
5. Objectivos do trabalho	30
II - MATERIAL E MÉTODOS	32
1. Material	32
1.1. Material biológico	32
1.2. Meios de cultura e suplementos	32
1.3. Reagentes e soluções	33
2. Métodos	35
2.1. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)	35
2.2. Avaliação da actividade das bombas de efluxo	36
2.2.1. Método do brometo de etídio em microplaca de 96 poços	36
2.2.2. Método fluorimétrico semi-automático	38
2.2.2.1. Ensaios de acumulação	38
2.2.2.2. Ensaios de efluxo	39
2.2.3. Ensaios de acumulação da [¹⁴ C]-eritromicina	40
III - RESULTADOS	42
1. Caracterização das estirpes de <i>M. smegmatis</i>	42
1.1. Determinação da CMI dos antibióticos e EtBr para as estirpes de <i>M. smegmatis</i> ...	42
1.2. Determinação da CMI dos IBEs para as estirpes de <i>M. smegmatis</i>	43
2. Avaliação do transporte de EtBr em <i>M. smegmatis</i>	44
2.1. Estudo do transporte de EtBr em <i>M. smegmatis</i> pelo método do brometo de etídio em microplaca de 96 poços	44
2.2. Estudo do transporte de EtBr em <i>M. smegmatis</i> pelo método fluorimétrico semi-automático	46
2.2.1. Estudo do influxo de EtBr em <i>M. smegmatis</i> pelo método fluorimétrico semi-automático	46
2.2.2. Estudo do efluxo de EtBr em <i>M. smegmatis</i> pelo método fluorimétrico semi-automático	51

3. Determinação da susceptibilidade das estirpes de <i>M. smegmatis</i> aos antibióticos na presença de IBEs	57
4. Estudo da acumulação/retenção de [¹⁴ C]-eritromicina em <i>M. smegmatis</i>	63
IV - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	65
V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

Índice de Figuras

I - INTRODUÇÃO

Figura I.1.	Representação esquemática do invólucro celular micobacteriano.	5
Figura I.2.	Alvos celulares bacterianos de antibióticos.	10
Figura I.3.	Principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos.	13
Figura I.4.	Representação esquemática da bomba de efluxo LmrA da superfamília ABC (A) e modelo estrutural para os transportadores ABC e respectivos motivos conservados (B).	20
Figura I.5.	Representação esquemática da bomba de efluxo NorA da superfamília MFS (A) e modelo estrutural para os transportadores MFS e respectivos motivos conservados, possuindo 12 (B) e 14 (C) segmentos transmembranares.	21
Figura I.6.	Representação esquemática da bomba de efluxo ErmE da família SMR (A) e modelo estrutural para os transportadores SMR e respectivos motivos conservados (B).	22
Figura I.7.	Representação esquemática da bomba de efluxo AcrAB-TolC da superfamília RND (A) e modelo estrutural para os transportadores RND e respectivos motivos conservados (B).	23
Figura I.8.	Representação esquemática da bomba de efluxo NorM da família MATE.	24
Figura I.9.	Estrutura química de compostos com actividade inibitória de bombas de efluxo.	29

III - RESULTADOS

Figura III.1.	Fluorescência exibida pelas estirpes de <i>M. smegmatis</i> , no método do brometo de etídio em microplaca de 96 poços.	45
Figura III.2.	Ensaio de acumulação em <i>M. smegmatis</i> SMR5 com concentrações crescentes de EtBr (0.5 - 8.0 mg/L).	47
Figura III.3.	Ensaio de acumulação em <i>M. smegmatis</i> MN01 ($\Delta mspA$) com concentrações crescentes de EtBr (0.5 - 8.0 mg/L).	47

Figura III.4.	Ensaio de acumulação em <i>M. smegmatis</i> ML10 ($\Delta mspA \Delta mspC$) com concentrações crescentes de EtBr (0.5 - 8.0 mg/L).	48
Figura III.5.	Efeito dos IBEs a ½ da CMI na acumulação de 1 mg/L de EtBr em <i>M. smegmatis</i> SMR5.	49
Figura III.6.	Efeito dos IBEs a ½ da CMI na acumulação de 1 mg/L de EtBr em <i>M. smegmatis</i> MN01 ($\Delta mspA$).	50
Figura III.7.	Efeito dos IBEs a ½ da CMI na acumulação de 1 mg/L de EtBr <i>M. smegmatis</i> ML10 ($\Delta mspA \Delta mspC$).	50
Figura III.8.	Ensaio de acumulação em <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 com concentrações crescentes de EtBr (0.5 - 8.0 mg/L).	51
Figura III.9.	Ensaio de acumulação em <i>M. smegmatis</i> XZL1675 ($\Delta lfrA$) com concentrações crescentes de EtBr (0.25 - 8.0 mg/L).	52
Figura III.10.	Ensaio de acumulação em <i>M. smegmatis</i> XZL1720 ($\Delta lfrR$) com concentrações crescentes de EtBr (0.25 - 8.0 mg/L).	52
Figura III.11.	Efeito dos IBEs a ½ da CMI na acumulação de 1 mg/L de EtBr em <i>M. smegmatis</i> mc ² 155.	54
Figura III.12.	Efeito dos IBEs a ½ da CMI na acumulação de 0.5 mg/L de EtBr <i>M. smegmatis</i> XZL1675 ($\Delta lfrA$).	54
Figura III.13.	Efeito dos IBEs a ½ da CMI na acumulação de 1 mg/L de EtBr em <i>M. smegmatis</i> XZL1720 ($\Delta lfrR$).	55
Figura III.14.	Efeito dos IBEs no efluxo de EtBr (1/2 da CMI) em <i>M. smegmatis</i> mc ² 155.	56
Figura III.15.	Efeito dos IBEs no efluxo de EtBr (1/2 da CMI) em <i>M. smegmatis</i> XZL1675 ($\Delta lfrA$).	56
Figura III.16.	Efeito dos IBEs no efluxo de EtBr (1/2 da CMI) em <i>M. smegmatis</i> XZL1720 ($\Delta lfrR$).	57
Figura III.17.	Acumulação/retenção de [¹⁴ C]-eritromicina [¹⁴ C]-ERY) por <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 na presença e ausência de verapamil (VP), tioridazina (TZ) e clorpromazina (CPZ) a ½ da CMI.	64

Índice de Tabelas

I - INTRODUÇÃO

Tabela I.1.	Sistema de classificação de Runyon.	7
Tabela I.2.	Classificação das micobactérias de acordo com o risco de infecção.	8
Tabela I.3.	Caracterização das famílias ou superfamílias de transportadores activos celulares.	19
Tabela I.4.	Caracterização de bombas de efluxo micobacterianas associadas a susceptibilidade reduzida a compostos antimicrobianos.	25
Tabela I.5.	Classificação e identidade de resíduos de aminoácidos de algumas bombas de efluxo putativas de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv e <i>M. smegmatis</i> mc ² 155.	26

II - MATERIAL E MÉTODOS

Tabela II.1.	Descrição sumária das estirpes de <i>M. smegmatis</i> utilizadas neste estudo.	32
Tabela II.2.	Composição dos meios de cultura utilizados.	33
Tabela II.3.	Concentração “stock” e condições de armazenamento dos antibióticos e compostos utilizados.	34

III - RESULTADOS

Tabela III.1.	Valores de CMI dos antibióticos e EtBr para as estirpes de <i>M. smegmatis</i>	43
Tabela III.2.	Valores de CMI dos IBEs para as estirpes de <i>M. smegmatis</i>	44
Tabela III.3.	Efeito dos IBEs na CMI da STR para as estirpes de <i>M. smegmatis</i> estudadas.	58
Tabela III.4.	Efeito dos IBEs na CMI da INH para as estirpes de <i>M. smegmatis</i> estudadas.	59
Tabela III.5.	Efeito dos IBEs na CMI da RIF para as estirpes de <i>M. smegmatis</i> estudadas.	59
Tabela III.6.	Efeito dos IBEs na CMI do EMB para as estirpes de <i>M. smegmatis</i> estudadas.	60

Tabela III.7. Efeito dos IBEs na CMI da AMK para as estirpes de <i>M. smegmatis</i> estudadas.	60
Tabela III.8. Efeito dos IBEs na CMI da CIP para as estirpes de <i>M. smegmatis</i> estudadas.	61
Tabela III.9. Efeito dos IBEs na CMI da CLT para as estirpes de <i>M. smegmatis</i> estudadas.	61
Tabela III.10. Efeito dos IBEs na CMI da ERY para as estirpes de <i>M. smegmatis</i> estudadas.	62
Tabela III.11. Aumento da retenção intracelular de [¹⁴ C]-ERY em <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 na presença dos IBEs VP, TZ e CPZ a ½ da CMI.	64

Lista de Abreviaturas

- [¹⁴C]-ERY** - [¹⁴C]-eritromicina
- 7H9** - Middlebrook 7H9 Broth
- 7H9/OADC** - Middlebrook 7H9 Broth com 10% de suplemento ácido oleico/albumina/dextrose/catalase
- 7H11** - Middlebrook 7H11 Agar
- ABC** - “ATP-Binding Cassete”
- ADN** - ácido desoxirribonucleico
- AMK** - Amicacina
- APO** - ácido pirazinoico
- ARN** - Ácido ribonucleico
- ARNm** - Ácido ribonucleico mensageiro
- ARNr** - Ácido ribonucleico ribossomal
- ARNr 16S** - Subunidade 16S do ARN ribossomal
- ARNt** - Ácido ribonucleico de transferência
- ATP** - Trifosfato de adenosina, do inglês “adenosine triphosphate”
- BCG** - Bacilo de Calmette-Guerin
- CCCP** – Carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona
- CIP** - Ciprofloxacina
- CLT** - Claritromicina
- CLSI** - “Clinical and Laboratory Standards Institute”
- CMI** - Concentração mínima inibitória
- CPM** - Contagens por minuto
- CPZ** - Clorpromazina
- DO** - Densidade óptica
- DO₆₀₀** – Densidade óptica a um comprimento de onda de 600 nm
- EMB** - Etambutol
- EPI** - “Efflux pumps inhibitor”
- ERY** - Eritromicina
- EtBr** - Brometo de etídio
- FMP** - Força motriz protónica

IBE - Inibidor de bombas de efluxo
INH - Isoniazida
MATE - “Multidrug and toxic compound extrusion”
MFS - “Major Facilitator superfamily”
MNT - micobactérias não tuberculosas
OADC - suplemento ácido oleico/albumina/dextrose/catalase
PAS - ácido para-aminosalicílico
PBS - tampão fosfato salino, do inglês “phosphate buffer saline”
PZA - Pirazinamida
RIF - Rifampicina
RND - “Resistance-nodulation-cell division”
SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SMR - “Small Multidrug Resistance”
STR - Estreptomicina
TOD - Tratamento Observado Directamente
TZ - Tioridazina
VIH - Vírus da Imunodeficiência Humana
VP – Verapamil

I - INTRODUÇÃO

1. Micobacterioses

1.1. Epidemiologia

As Micobacterioses constituem um capítulo importante na patologia infecciosa humana, na qual se incluem doenças tão antigas como a tuberculose e a lepra (32, 66). A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa crónica, que acompanha os seres humanos desde a pré-história, tendo-se tornado epidémica na Europa no séc. XIX, com a Revolução Industrial (66). O agente etiológico responsável por esta infecção no Homem é o *Mycobacterium tuberculosis*, identificado e descrito em 1882 por Robert Koch (87).

A partir da década de 40 do século XX, devido aos avanços terapêuticos originados pela descoberta de diversos fármacos com actividade contra o *M. tuberculosis*, como a estreptomicina (STR), o ácido para-aminosalicílico (PAS), a isoniazida (INH) e a rifampicina (RIF), bem como ao desenvolvimento socioeconómico nos países industrializados, assistiu-se a uma diminuição dos casos de tuberculose pulmonar (66). Este declínio das taxas de incidência anuais de tuberculose conduziu ao desinteresse no combate e posterior abandono dos programas de controlo da tuberculose nos países industrializados (39).

Entre 1985 e 1993, assistiu-se nos Estados Unidos da América, a um aumento da morbidade por tuberculose de 14% (20). Desde então, o número de casos tem vindo a aumentar na maioria das regiões do globo, levando a Organização Mundial de Saúde a considerar a tuberculose uma emergência global (62).

Diversos factores estiveram na origem da reemergência da tuberculose, incluindo a pandemia do Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH)/Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), terapêuticas imunossupressoras, degradação das condições socioeconómicas, transmissão em instituições de saúde, de apoio social e prisões, toxicodependência, taxas elevadas de afluência de imigrantes (oriundos de países com índices elevados de tuberculose) e o aparecimento de estirpes multirresistentes, estirpes simultaneamente resistentes pelo menos à INH e RIF (21, 66, 148).

Actualmente, a tuberculose mata 1,7 milhões de pessoas por ano, incluindo 0,45 milhões de pessoas infectadas com o VIH. Aproximadamente 9 milhões de casos desenvolvem-se todos os anos e cerca de um terço da população mundial encontra-se infectada com *Mycobacterium tuberculosis* (156). A tuberculose continua assim a ser um grave problema de saúde pública mesmo na Europa Ocidental e na América do Norte e não apenas nos países tradicionalmente designados como estando em vias de desenvolvimento. Portugal continua a ser o país da Europa Ocidental com maior incidência de novos casos de tuberculose e para esta situação contribuíram todos os factores anteriormente citados (40).

Para além da enorme importância da tuberculose no contexto das micobacterioses humanas, existe um numeroso grupo de micobactérias, também elas causadoras de infecção no homem, mas que não causam os mesmos índices de mortalidade da tuberculose (56, 117). Ao longo do século XX foram sendo identificadas inúmeras espécies de micobactérias que foram sendo comumente designadas como micobactérias atípicas ou micobactérias não tuberculosas, no léxico anglo-saxónico (44, 117). Se inicialmente lhes foi atribuída pouca relevância clínica, atribui-se hoje uma relevância particular a este grupo no contexto da imunossupressão, pois estas micobactérias são importantes agentes de infecção em doentes com baixos valores do número de linfócitos CD4 (95).

Dentro do grupo das micobactérias não tuberculosas existe ainda um subgrupo, o das micobactérias de crescimento rápido, cuja importância clínica é ainda questionada mas continuam a aparecer registos científicos de infecções graves por estas micobactérias que obrigam à necessidade de uma vigilância epidemiológica e um estudo mais aprofundado destas micobactérias (17).

1.2. Transmissão e patogénese

Apesar das micobactérias poderem infectar todos os tecidos e órgãos, a forma mais frequente é a pulmonar. A transmissão ocorre por via respiratória, e a sua origem provém dos bacilos eliminados pelas secreções broncopulmonares, sobretudo durante os esforços da tosse, por doentes com tuberculose pulmonar cavitária, dando origem a um aerossol de partículas que se dispersam pelo ar circundante (3). Os factores que

determinam a probabilidade da transmissão de *M. tuberculosis* são o número de microrganismos expelidos para o ar, a concentração de bacilos no ar determinada pelo volume do espaço e a sua ventilação, o tempo de exposição ao ar contaminado e a condição imunitária do indivíduo exposto (3, 75). São as partículas de menores dimensões, com 3 a 5 μm , que apresentam uma maior perigosidade, visto conseguirem suplantar os diversos obstáculos da árvore respiratória, podendo atingir os alvéolos pulmonares das zonas mais ventiladas dos pulmões, na região sub-pleural dos lobos inferiores (3, 75).

Se uma das partículas contiver bacilos, ocorre um processo inflamatório inicial mediado por macrófagos alveolares (13). O estabelecimento de uma infecção pulmonar pelo bacilo inalado está dependente da sua virulência e da capacidade do macrófago alveolar em digeri-lo (3). Se o hospedeiro apresentar uma resposta imunitária celular ineficiente na destruição dos bacilos, estes vão-se multiplicar intracelularmente no lisossoma dos macrófagos, provocando a sua lise (3). Após a consequente libertação dos bacilos, ocorre uma activação dos mecanismos da imunidade inata que conduz a um intenso recrutamento das células para o foco inflamatório, originando a formação do granuloma, o qual constitui a lesão inicial da infecção micobacteriana e tem a finalidade de circunscrever e delimitar a infecção, através da contenção dos bacilos no centro caseoso do granuloma, que é composto por material necrótico rico em lípidos degradados da parede celular micobacteriana e macrófagos mortos (13, 103). Nessas condições, os bacilos podem sobreviver durante anos em estado de latência ou de dormência e o indivíduo infectado pode não manifestar a doença (3). Aproximadamente 95% das lesões pulmonares iniciais evoluem para fibrose e/ou calcificação (75). No entanto, em 5% dos casos, não ocorre a contenção da primoinfecção, quer pela deficiência no desenvolvimento da imunidade celular, quer pela carga infectante ou pela virulência da estirpe, ocorrendo a liquefacção do caseum e a libertação de bacilos, promovendo o desenvolvimento de doença activa (13, 75). Se o hospedeiro apresentar competência imunitária os bacilos libertados irão iniciar uma nova infecção, localizada e contida noutra região pulmonar. Caso contrário, numa situação de imunodepressão, ocorre uma disseminação bacilar via linfohematogénica promovendo o aparecimento de tuberculose miliar (3,13). Este processo fisio-patológico é idêntico para a maioria das infecções respiratórias causadas por micobactérias não-tuberculosas (50, 117).

Apesar de uma pequena percentagem de indivíduos imunocompetentes infectados evoluir para doença activa, esta situação altera-se drasticamente em doentes com VIH, uma vez que o comprometimento do sistema imune potencia em larga escala a probabilidade da reactivação da infecção (75). Este facto tem contribuído para o aumento da prevalência quer de estirpes multirresistentes à terapia antibacilar, quer de infecções por micobactérias não tuberculosas (68).

2. Género *Mycobacterium*

2.1. Características gerais

O género *Mycobacterium* é o único constituinte da família *Mycobacteriaceae*, incluída na ordem dos *Actinomycetales* da classe dos *Schizomycetos* (121). Os microrganismos deste género são bacilos aeróbios, imóveis e não formadores de esporos (com excepção de *M. marinum*), apresentam 0.2 a 0.6 µm de largura e 1.0 a 10 µm de comprimento, e tendem a agrupar-se em pequenas cordas ou aglomerados (47, 55, 129).

Uma das características particulares das micobactérias é a composição e estrutura do invólucro celular (Figura I.1). Esta estrutura está directamente relacionada com a capacidade de sobrevivência destes microrganismos em ambientes hostis e a sua resistência a diversos compostos antimicrobianos (44, 50, 107).

De acordo com os estudos de ultra-estrutura e química das micobactérias, o invólucro celular micobacteriano possui três componentes estruturais: uma membrana plasmática, uma parede celular e uma cápsula (33, 34).

A membrana plasmática é uma membrana bacteriana típica, com 4 a 4.5 nm de espessura, que embora vital para as micobactérias, provavelmente possui um pequeno papel em processos patológicos (34, 112). Associados a esta membrana, podem-se ainda encontrar outros componentes, como as menaquinonas, que estão envolvidas no transporte de electrões, e os carotenóides, que se pensa estarem relacionados com a protecção contra danos fotolíticos e são responsáveis pela pigmentação amarelo-alaranjada de micobactérias como *M. goodii* e *M. kansasii* (14).

A parede celular micobacteriana é composta por peptidoglicano ligado covalentemente a polissacáridos de arabinogalactano esterificados na zona distal com

ácidos micólicos, formando o complexo ácidos micólicos-arabinogalactano-peptidoglicano (14, 72). O peptidoglicano, do tipo A1 γ , é um dos mais comuns encontrados nas bactérias, no entanto nas micobactérias os resíduos de ácido murâmico são N-glicosilados em oposição à N-acetilação encontrada em outros géneros bacterianos. Estes grupos glicosil favorecem um reforço da estrutura do peptidoglicano ao proporcionarem ligações adicionais por pontes de hidrogénio (14).

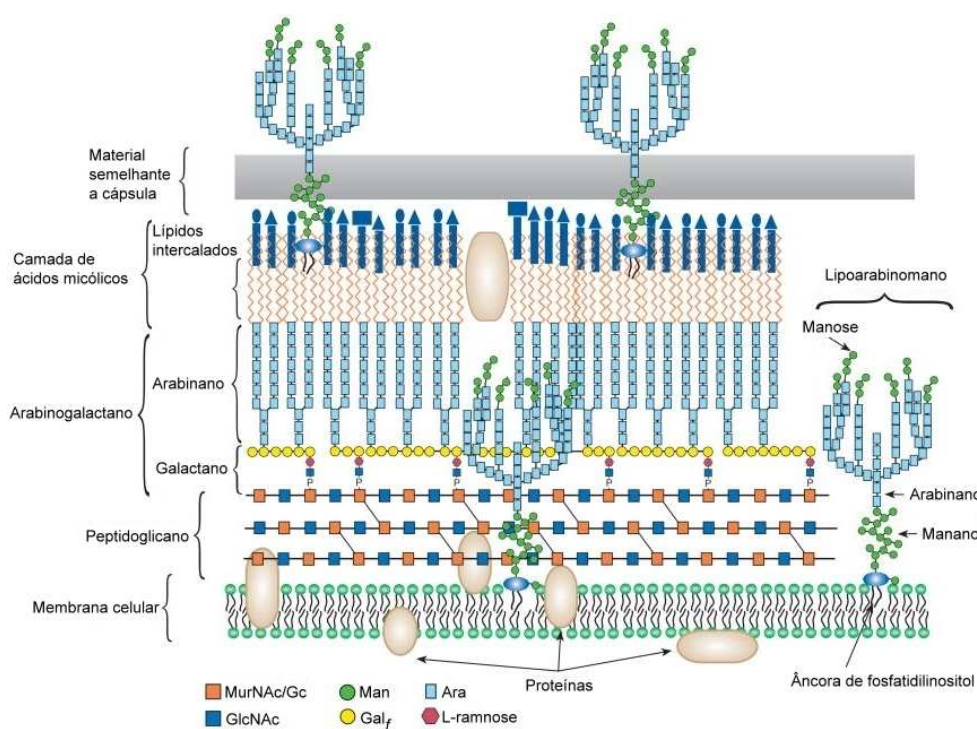


Figura I.1. Representação esquemática do invólucro celular micobacteriano.
Adaptado de (15, 42).

Os ácidos micólicos são ácidos gordos de cadeia longa α -metil- β -ramificados, encontrados maioritariamente nos géneros *Mycobacterium*, *Norcardia*, *Rhodococcus*, e *Corynebacterium* (72, 89). As micobactérias possuem ácidos micólicos distintos dos outros géneros, compostos geralmente por 70 a 90 átomos de carbono em oposição aos 40 a 60 átomos das restantes bactérias (14, 72). Estes ácidos gordos são responsáveis pela manutenção da estrutura celular rígida e contribuem para a baixa permeabilidade e conseqüente resistência intrínseca a compostos hidrofílicos (14, 72). O elevado teor em

ácidos micólicos confere ainda às micobactérias a característica Álcool-Ácido Resistência, isto é, a capacidade de reter corantes na presença de uma mistura de ácido e álcool (48).

À parede celular micobacteriana encontram-se ainda associados diversos componentes, a maioria desempenhando a função de antigénio ou toxina, como: (i) lípidos extraíveis, que são lípidos ligados não covalentemente ao complexo ácido micólicos-arabinogalactano-peptidoglicano, como glicolípidos fenólicos, glicopeptidolípidos, trealoses aciladas, sulfolípidos e glicerofosfolípidosproteínas e lipoarabinomano, passíveis de serem removidos através da acção de solventes; (ii) proteínas, algumas das quais responsáveis pela construção da parede celular durante a vida do bacilo e outras que formam canais hidrofílicos que permitem a passagem de soluções aquosas, denominadas de porinas; e (iii) lipoarabinomano, um polissacárido altamente imunogénico, descrito como um possível factor de virulência envolvido na persistência das micobactérias no interior dos fagócitos mononucleados (9, 14, 22, 72).

Apesar destas características comuns, as espécies do género *Mycobacterium* apresentam em muitos aspectos uma grande diversidade. Actualmente, encontram-se descritas na literatura mais de 125 espécies de micobactérias, a maioria subsistindo livremente nos ecossistemas naturais, raramente causando doença em humanos e animais (9, 49, 50). Apenas algumas micobactérias são patogénicas para os vertebrados superiores, habitando, preferencialmente o meio intracelular de fagócitos mononucleares. Os membros do complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. caprae* e *M. pinnipedi*) e *M. leprae* são exemplos de micobactérias dependentes do hospedeiro, incapazes de se replicar no meio ambiente (9). Dentro do grupo das micobactérias ambientais raramente ou potencialmente patogénicas para os seres humanos, denominadas de micobactérias não tuberculosas (MNT), destacam-se *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chelonae*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. fortuitum* e *M. ulcerans* (16, 44).

Devido à diversidade das MNT, anteriormente designadas de micobactérias atípicas, Runyon, em 1959, introduziu um sistema de classificação baseado no tempo de crescimento, morfologia das colónias e na produção de pigmento em meio de cultura, dividindo estas bactérias em quatro grupos (Tabela I.1) (55, 112). Recentemente, esta classificação tem-se tornado menos útil devido à descoberta de que a produção de

pigmentação pode estar relacionada com a temperatura, e que nem todas as estirpes da mesma espécie apresentam a mesma capacidade para produzir pigmento (41). Um esquema de classificação alternativo foi então desenvolvido, baseado na patogenicidade das espécies micobacterianas, agrupando-as de acordo com o risco de infecção (Tabela I.2) (36, 41, 149, 150).

Tabela I.1. Sistema de classificação de Runyon. Divisão das MNT em quatro grupos, de acordo com o tempo de crescimento, morfologia das colónias e produção de pigmento. Adaptado de (112).

Classificação de Runyon	
Grupo Runyon I	Micobactérias fotocromogéneas de crescimento lento – produzem pigmento amarelo-alaranjado quando expostas à luz. Exemplo: <i>M. kansasii</i> ; <i>M. marinum</i> .
Grupo Runyon II	Micobactérias escotocromogéneas de crescimento lento – produzem pigmento amarelo-alaranjado quando expostas à luz ou no escuro. Exemplo: <i>M. gordonae</i> ; <i>M. scrofulaceum</i> ; <i>M. xenopi</i> .
Grupo Runyon III	Micobactérias não-cromogéneas de crescimento lento – não produzem pigmento. Exemplo: <i>M. avium</i> complex; <i>M. ulcerans</i> .
Grupo Runyon IV	Micobactérias de crescimento rápido – não produzem pigmento. Exemplo: <i>M. chelonae</i> ; <i>M. abscessus</i> ; <i>M. fortuitum</i> .

Tabela I.2. Classificação das micobactérias de acordo com o risco de infecção.
Adaptado de (36).

Raramente patogénicas		Potencialmente patogénicas	Estritamente patogénicas
<i>M. smegmatis</i>	<i>M. aurum</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. tuberculosis</i>
<i>M. phlei</i>	<i>M. chitae</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. bovis</i>
<i>M. fallax</i>	<i>M. duvalii</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. ulcerans</i>
<i>M. thermoresistibile</i>	<i>M. gadium</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. microti</i>
<i>M. para fortuitum</i>	<i>M. gilvum</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. leprae</i>
<i>M. gastri</i>	<i>M. komossense</i>	<i>M. malmoense</i>	
<i>M. triviale</i>	<i>M. lepraemurium</i>	<i>M. marinum</i>	
<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. neoaurum</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	
<i>M. gordonae</i>	<i>M. terrae</i>	<i>M. simiae</i>	
<i>M. flavescens</i>	<i>M. vaccae</i>	<i>M. szulgai</i>	
<i>M. farcinogenes</i>	<i>M. agri</i>	<i>M. xenopi</i>	
<i>M. senegalense</i>	<i>M. aichiense</i>	<i>M. asiaticum</i>	
<i>M. paratuberculosis</i>	<i>M. porcinum</i>	<i>M. haemophilum</i>	
<i>M. austroafricanum</i>	<i>M. chubuense</i>	<i>M. shimoidei</i>	
<i>M. diernhoferi</i>	<i>M. obuense</i>		
<i>M. pulveris</i>	<i>M. rhodesiae</i>		
<i>M. tokaiense</i>	<i>M. moriokaense</i>		
<i>M. poriferae</i>			

2.2. *Mycobacterium smegmatis*

O *M. smegmatis* é uma micobactéria ambiental, de crescimento rápido, geralmente considerado não patogénico, podendo porém, em alguns casos muito raros, causar doença (90, 146). Esta micobactéria foi descrita pela primeira vez em 1884 por Lustgarten, após a descoberta de bacilos com características tintoriais semelhantes à do bacilo da tuberculose, em lesões de cancro sífilítico. Posteriormente, Alvarez e Tavel observaram microrganismos semelhantes aos descritos por Lustgarten, tanto nas lesões

referidas anteriormente, como em secreções genitais (esmegma, em inglês “smegma”) (110). Actualmente, encontra-se associado a lesões dos tecidos moles após trauma ou cirurgia, tendo sido também descrito como possível factor na carcinogénese peniana (29).

Devido ao facto de ser um organismo de crescimento rápido, facilmente cultivável na maioria dos meios de cultura do laboratório, à sua não patogenicidade, requerendo apenas um laboratório de segurança de nível 1, por oposição às espécies patogénicas que necessitam de infra-estruturas adequadas à sua manipulação, e partilhar a mesma estrutura da parede celular de *M. tuberculosis* e das restantes micobactérias, *M. smegmatis* tem sido vastamente utilizado em trabalhos de investigação como microrganismo modelo para a manipulação laboratorial de espécies micobacterianas (35, 43, 53, 70, 124).

3. Resistência aos agentes antimicrobianos

3.1. Agentes antimicrobianos

O termo antibiótico foi definido inicialmente por Waksman em 1942, como uma substância de origem natural, isto é, produzida por microrganismos, antagonista do crescimento de outros microrganismos (145). Actualmente, este termo define substâncias de origem natural, sintética ou derivados de compostos naturais por alterações químicas, capazes de provocar a morte celular (acção bactericida) ou inibir o crescimento bacteriano (acção bacteriostática), produzindo o mínimo de danos possíveis ao hospedeiro (toxicidade selectiva) (23, 101).

Os agentes antimicrobianos podem exercer a sua acção sobre a célula bacteriana, de diferentes modos (23, 101). Estes mecanismos, que envolvem a inibição de processos fundamentais ao desenvolvimento bacteriano, são actualmente agrupados em cinco categorias (Figura I.2): (i) inibição da síntese da parede celular, (ii) inibição da síntese proteica, (iii) inibição da síntese de ácidos nucleicos, (iv) inibição competitiva de metabolitos essenciais, e (v) acção sobre a integridade da membrana citoplasmática. (23, 101).

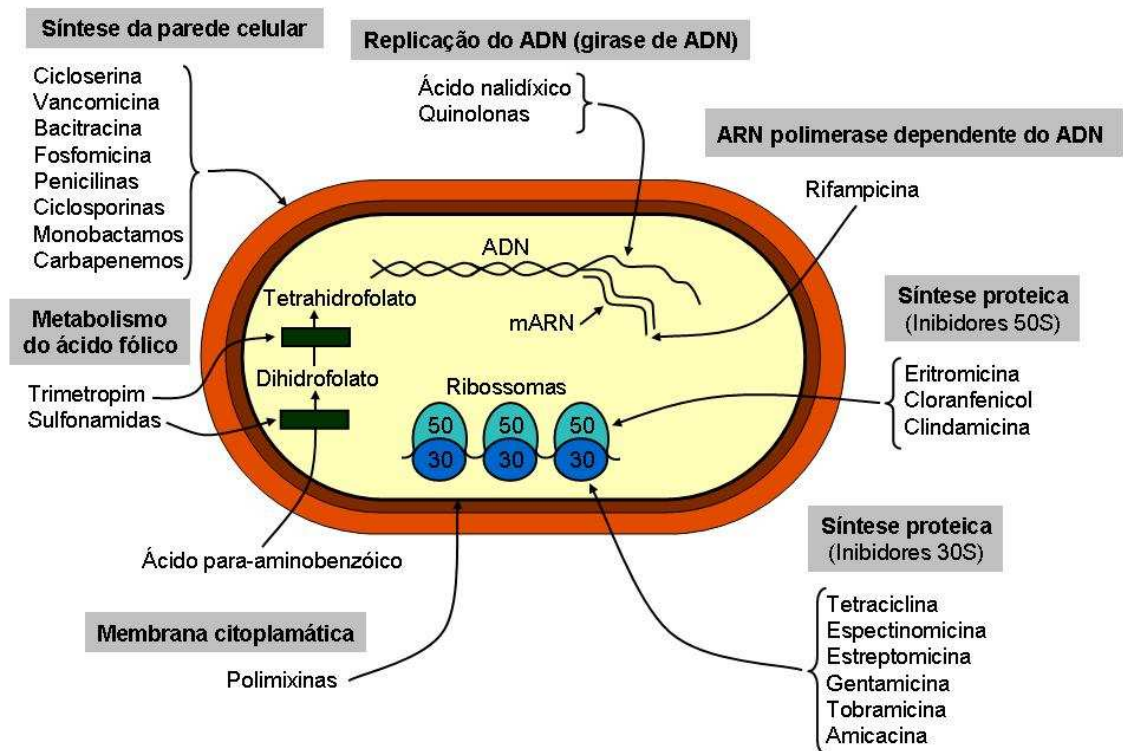


Figura I.2. Alvos celulares bacterianos de antibióticos. Adaptado de (77).

Os inibidores da síntese da parede celular bacteriana como os antibióticos β -lactâmicos e glicopéptidos bloqueiam a capacidade dos microrganismos em sintetizar peptidoglicano, um componente essencial à manutenção da estrutura da parede celular bacteriana, através da inibição de enzimas que integram a sua via biossintética, como transglicosilases e transpeptidases (23, 24).

Os inibidores da síntese proteica, de entre os quais se contam classes de antibióticos como aminoglicosídeos, tetraciclina, macrólidos, lincosamidas, cloranfenicol, estreptograminas e ácido fusídico, actuam sobre diferentes regiões da unidade ribossomal 70S afectando fases distintas deste mecanismo como a ligação aminoácido-ribonucleico de transferência (ARNt), formação de ligações peptídicas, leitura do ácido ribonucleico mensageiro (ARNm), provocando leituras incorrectas do código genético que podem conduzir à síntese de proteínas não funcionais (24, 101).

Devido à semelhança dos mecanismos de síntese de ácidos nucleicos entre procariontes e eucariontes, a maioria dos agentes antimicrobianos que interferem na

formação destas macromoléculas, possuem uma selectividade tóxica reduzida, limitando deste modo, a sua empregabilidade na prática clínica (101). Contudo, antibióticos como a RIF, pertencente à classe das rifamicinas, que actua sobre a síntese do ácido ribonucleico (ARN) ao ligar-se à subunidade β da polimerase de ARN bacteriana, inibindo a transcrição, e as quinolonas que inibem selectivamente a girase do ácido desoxirribonucleico (ADN) e a topoisomerase IV bacterianas através da formação de complexos quinolona-ADN-topoisomerase, inibindo o processo de replicação do ADN, são largamente utilizados devido à sua elevada toxicidade selectiva (24, 101).

Diversos agentes antimicrobianos actuam como antimetabolitos, bloqueando a utilização de metabolitos essenciais ou factores de crescimento pelas vias metabólicas funcionais através de inibição competitiva, devido à sua similaridade estrutural. As sulfanamidas, que apresentam uma acção competitiva sobre o metabolismo dos folatos, são um exemplo de antibióticos com acção antimetabólica (101).

As polimixinas e péptidos catiónicos são antibióticos que apresentam uma acção sobre a integridade da membrana citoplasmática, através de alterações na permeabilidade pela disrupção da estrutura membranar (24, 101). A integridade da membrana citoplasmática é fundamental para as bactérias, uma vez que a disrupção conduz à perda de metabolitos essenciais ao desenvolvimento e sobrevivência bacterianos (101).

3.2. Mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos

Os agentes antimicrobianos, desde a sua descoberta no século XX, têm desempenhado um papel fundamental na redução das doenças infecciosas (31). A sua utilização, combinada com melhorias no saneamento, habitação, alimentação e disseminação dos programas de imunização, conduziu a uma queda drástica do número de mortes decorrentes de doenças que anteriormente eram generalizadas, intratáveis, e frequentemente fatais (19). Esta participação importante no controlo de doenças infecciosas graves tem também contribuído para o aumento da esperança média de vida observado no último quarto do século passado (152).

Estes benefícios são agora ameaçados por um outro desenvolvimento recente: a emergência e proliferação de microrganismos resistentes aos agentes antimicrobianos

(154). Nos últimos anos, tem-se observado um aumento da frequência de infecções provocadas por microrganismos resistentes aos antimicrobianos, tanto em hospitais como na comunidade (28). Esta frequência crescente da resistência aos antimicrobianos tem sido atribuída à combinação de características microbianas, pressão selectiva, e mudanças sociais e tecnológicas que potenciam a transmissão de microrganismos resistentes (28). Como consequência, a resistência antimicrobiana, tem conduzido a um aumento da morbidade, mortalidade e dos custos de saúde (28).

As infecções bacterianas que mais contribuem para as doenças em humanos e animais são também aquelas em que a emergência de microrganismos resistentes é mais evidente: doenças diarreicas, infecções do trato respiratório, meningite, infecções sexualmente transmissíveis e infecções hospitalares (119, 120). Alguns exemplos importantes incluem o *Streptococcus pneumoniae* resistente à penicilina, *Staphylococcus aureus* resistente à metacilina, enterococos resistentes à vancomicina, *Salmonella* multirresistente e *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente (152).

A resistência de um microrganismo a um determinado antimicrobiano pode ser classificada inicialmente como intrínseca ou adquirida (159).

A resistência intrínseca ou resistência natural é uma consequência de processos adaptativos, em que cada membro de uma espécie bacteriana é resistente sem que seja necessário a aquisição de informação genética adicional (93, 159). Dois dos mecanismos considerados como as principais causas de resistência intrínseca bacteriana a diversos fármacos são a permeabilidade celular reduzida e os sistemas de efluxo activos (93).

A resistência adquirida é um mecanismo major da resistência antimicrobiana, que resulta de uma pressão evolucionária específica desenvolvida como mecanismo de defesa contra uma ou diversas classes de antimicrobianos (158, 159). Este tipo de resistência, resultante de alterações no genoma bacteriano, pode ser obtida através de uma mutação e transmitida verticalmente às células descendentes, mas frequentemente, esta resistência é adquirida por transferência horizontal de genes de resistência entre estirpes e espécies microbianas, por mecanismos de transformação, transdução ou conjugação (159).

A resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos é mediada por diversos mecanismos, agrupados em três categorias principais (Figura I.3): (i) inactivação directa

ou modificação do antibiótico, como por exemplo, através da destruição enzimática do anel β -lactâmico dos antibióticos β -lactâmicos por acção de hidrolítica de β -lactamases, ou a acetilação e fosforilação de aminoglicosídeos por acetiltransferases e fosfotransferases, respectivamente, (ii) alteração/modificação do alvo celular do antibiótico, tomando como exemplo, a redução da afinidade dos ribossomas para os macrólidos através da metilação da subunidade 23S do ácido ribonucleico ribossomal (ARNr), componente da subunidade ribossomal 50S, e a diminuição da afinidade da RIF para a subunidade β da ARN polimerase através de mutações no gene *rpoB*, (iii) redução da concentração intracelular dos agentes antimicrobianos, através diminuição da permeabilidade celular por perda ou alteração de porinas, proteínas integrantes da membrana externa que formam canais hidrofílicos ou pela extrusão do antibiótico para o meio extracelular, mediada por bombas de efluxo (64, 67, 92, 93, 158, 159).

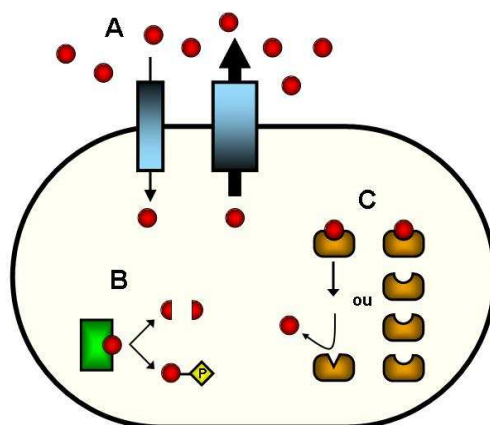


Figura I.3. Principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos. A - Prevenção da acumulação de antimicrobianos através da redução da permeabilidade celular ou do aumento do efluxo; B - Inativação dos antimicrobianos por hidrólise ou modificação, e.g. fosforilação; C - Alteração qualitativa dos alvos para a redução da afinidade para os antimicrobianos ou quantitativa através da sobreprodução dos alvos. Adaptado de (159).

3.3. Agentes antimicrobianos com actividade antimicobacteriana: Mecanismos de acção e de resistência.

O agente antimicrobiano com maior actividade antimicobacteriana é a INH ou hidrazida do ácido isonicotínico. É um pró-fármaco bactericida sintético que tem de ser

metabolizado pela catalase-peroxidase micobacteriana para se tornar activo. A sua actividade inibitória incide sobre a síntese dos ácidos micólicos (os principais componentes da parede celular das micobactérias) (123, 132). O mecanismo pelo qual ocorre resistência de *M. tuberculosis* à INH é complexo e mal descrito, tendo sido atribuído a mutações individuais em genes que codificam a catalase-peroxidase (*katG*), a enzima da via dos ácidos micólicos (*inhA*) e uma proteína sintetase cetoacil transportadora (*kasA*) (7, 84, 123, 160, 161). A resistência à INH na maioria dos isolados clínicos resulta do bloqueio da activação do pró-fármaco, pois o gene mutante codifica uma proteína que apresenta uma capacidade diminuída na sua activação (4, 111, 147). No entanto, muitas estirpes resistentes não têm mutações em nenhum dos genes associados, até à data, com resistência à INH (104, 162), o que leva a suspeitar que podem estar envolvidos outros factores, como a resistência mediada por bombas de efluxo dependentes de energia (25, 123, 141, 142).

A STR é um aminociclitol glicosídico, que se liga à subunidade 16S do ARN ribossomal (ARNr 16S) inibindo a iniciação da tradução (89, 123). Foram descritas mutações associadas à resistência a este antibiótico no gene correspondente ao ARNr 16S (*rrs*) e no gene *rpsL* que codifica a proteína ribossomal S12 (123). O complexo *M. tuberculosis* tem apenas uma cópia do gene ARNr. Deste modo, alterações nucleotídicas pontuais neste gene originam facilmente resistência de alto nível. Pequenas perturbações na sua estrutura são suficientes para originar resistência ou afinidade reduzida para com a STR (85, 123). A maioria das mutações pontuais que conferem resistência à STR ocorre no gene *rpsL*. Aproximadamente 75% das estirpes resistentes à STR possuem alterações no gene *rpsL* ou *rrs* associadas à resistência. Nos 25% restantes não foram encontradas mutações associadas a resistência em qualquer um dos genes, o que indica a existência de outros possíveis mecanismos de resistência à STR (1, 86, 122, 123).

A pirazinamida (PZA) é um análogo estrutural da nicotinamida que é bactericida em bacilos semi-dormentes, tendo como alvo uma enzima envolvida na síntese dos ácidos gordos (123, 126). É um pró-fármaco que é convertido na sua forma activa, o ácido pirazinoico (APO), pela enzima pirazinamidase codificada pelo gene *pncA* (123, 126). A PZA difunde-se passivamente para o interior do *M. tuberculosis*, é convertida em APO pela pirazinamidase e acumula-se em grandes quantidades no citoplasma a pH

ácido, devido a um sistema de efluxo ineficiente (126). A existência de estirpes resistentes que não apresentam mutação neste gene é indicativo do envolvimento de outros mecanismos como os envolvidos no “uptake” da PZA, regulação de *pncA* ou efluxo de APO (106, 126). Alguns membros do complexo *M. tuberculosis* como *M. bovis*, e *M. bovis* Bacilo de Calmette-Guerin (BCG) são naturalmente resistentes à PZA devido a uma mutação pontual no gene *pncA* (60, 123, 126).

O etambutol (EMB) é um outro antibacilar utilizado no tratamento da tuberculose devido à sua eficiência na inibição da transferência de arabinogalactano para a parede celular micobacteriana, um processo que conduz à acumulação dos ácidos micólicos (123, 133). O alvo deste antibacilar é uma arabinosil transferase envolvida na biossíntese do arabinano, um componente do arabinogalactano que se encontra na parede celular (10, 123). A inibição da síntese do arabinano conduz à acumulação dos ácidos micólicos e à inviabilidade celular. Foram identificados em *M. tuberculosis* três genes contíguos que codificam arabinosiltransferases designados *embC*, *embA* e *embB* (30). Mutações na região contendo os genes *embCAB* em estirpes de *M. tuberculosis* resistentes ao BEM, isoladas a partir de amostras clínicas, originam substituições de aminoácidos que conduzem à resistência (127). No entanto, cerca de um quarto das estirpes resistentes não possui qualquer mutação conhecida que esteja associada à resistência ao EMB, o que significa que existem múltiplas vias moleculares que estão na base da sua resistência (105).

Em conjunto com a INH, a RIF, cujo mecanismo de acção da consiste na inibição da transcrição através da ligação à subunidade beta da ARN polimerase ADN-dependente, são os dois agentes antimicobacterianos mais eficazes (12, 123, 126, 135). Foram identificadas mutações no gene *rpoB* de estirpes de *M. tuberculosis* resistentes à RIF que conferiam resistência ao diminuir a afinidade desta para a subunidade beta da ARN polimerase (135, 136). A resistência à RIF foi o primeiro mecanismo de resistência a antibióticos descrito em *M. tuberculosis* por Telenti et al. (135). Nas estirpes de *M. tuberculosis* resistentes à RIF, a resistência resulta de mutações pontuais ou de pequenas deleções ou inserções numa região limitada de 81 pares de bases (27 codões) do gene *rpoB* em 95% das estirpes (135, 136). Os mecanismos de resistência nos restantes 5% de isolamentos resistentes permanecem indeterminados.

A INH, RIF, EMB, PZA e STR são considerados os agentes antimicobacterianos de 1ª linha por serem os que fazem parte dos esquemas terapêuticos múltiplos, comumente utilizados para o tratamento de uma tuberculose activa (157). Quando emergem resistências estes agentes têm de ser substituídos por outros menos eficazes, considerados de segunda linha (153, 157). São exemplos os aminoglicosídeos (amicacina e canamicina), as fluoroquinolonas (levofloxacina e ofloxacina) ou os macrólidos (claritromicina e azitromicina) (157).

Embora do ponto de vista biológico a resistência em *M. tuberculosis* se desenvolva principalmente por mutações espontâneas em um ou mais genes, sabe-se que clinicamente ela resulta da pressão selectiva exercida por um tratamento inadequado normalmente devido à fraca adesão dos doentes ao tratamento. Outras causas incluem monoterapia, doseamento não apropriado dos antibióticos e fraca absorção dos antibióticos, mas em todos os casos a espontaneidade das mutações é acompanhada por um determinismo inexorável que conduz à multiresistência, quando os fenómenos acima descritos ocorrem em simultâneo (155). Por este motivo, a Organização Mundial de Saúde, criou o Programa “Direct Observed Treatment”, mais conhecido pelo acrónimo DOT, ou Tratamento Observado Directamente (TOD), em que um observador profissional de saúde se certifica que o doente toma a medicação prescrita e que não abandona o esquema terapêutico (151).

Nos doentes com tuberculose resistente a múltiplos fármacos e em doentes com infecções a MNT, naturalmente resistentes aos antimicobacterianos anteriores, o tratamento apresenta elevada resistência aos fármacos antimicrobianos, apresenta fraca correlação entre susceptibilidades “in vitro” e “in vivo”, os antimicobacterianos disponíveis possuem um elevado potencial de toxicidade e há necessidade de tratamentos muito prolongados (51).

Procuram-se hoje novas alternativas antimicobacterianas, ditas de 3ª linha, como as oxazolidinonas (linezolid), derivados de tetraciclina (glicilciclina) ou metoxifluoroquinolonas (gatifloxacina) mas cujos estudos ainda são incipientes e cujas associações com outros fármacos antimicobacterianos são desconhecidos o que obvia a sua integração nos esquemas múltiplos (45, 78, 157).

Por outro lado, em micobactérias, começou a ser valorizado como mecanismo de resistência acessório e de baixo nível a aquisição de resistência fenotípica por aumento

da impermeabilidade e/ou por aumento do efluxo activo de antibacilares como a INH, os macrólidos ou as fluoroquinolonas (108, 109, 141). Crê-se que diminuição da concentração intracelular destes compostos permite o aumento da sobrevivência das estirpes em presença do antibiótico, facilitando, por exemplo, a aquisição e estabilização de outros mecanismos de resistência como as mutações anteriormente descritas e consideradas o mecanismo principal de resistência de alto nível (71, 98, 118).

3.4. Mecanismos de resistência por aumento da impermeabilidade

Como referido anteriormente, uma das características da resistência intrínseca que influencia directamente a transposição de agentes antimicrobianos para o meio intracelular é a permeabilidade celular reduzida (93).

Por exemplo, bactérias Gram-negativas, como a *Pseudomonas aeruginosa*, estão descritas como sendo altamente resistentes à acção de antimicrobianos hidrofóbicos devido à baixa permeabilidade da sua membrana externa para estes compostos (93). Em micobactérias, o influxo de compostos hidrofóbicos é condicionado pela reduzida fluidez da camada de ácidos micólicos da parede celular, que actua como uma barreira contra moléculas lipofílicas (72, 128).

Um dos mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos é o aumento da impermeabilidade celular através da redução da expressão de porinas, responsáveis pela difusão de solutos hidrofílicos para o meio intracelular (92, 93).

Como exemplo, um estudo publicado em 1981 por Harder et al. descreveu que a ausência da proteína da membrana externa OmpF em *E. coli*, tornou esta bactéria mais resistente a diversos compostos β -lactâmicos (54), e em 2004 e 2008, trabalhos realizados por Stephan et al. e Danilchanka et al., respectivamente, indicaram que a porina MspA desempenha um papel importante na aquisição de nutrientes e antibióticos em *M. smegmatis*, e que a sua ausência confere um aumento da resistência a esses antimicrobianos (35, 131).

A proteína MspA, codificada pelo gene *mspA*, é a porina principal de *M. smegmatis*, constituindo mais de 70% de todos os poros deste microrganismo (128). Outros genes que codificam para porinas semelhantes à anterior foram também identificados em *M.*

smegmatis, nomeadamente *mspB*, *mspC* e *mspD* (128). Apenas os genes *mspA* e *mspC* são expressos na estirpe selvagem, enquanto a transcrição de *mspB* e *mspD* só é activada, por mecanismos desconhecidos, após a deleção de *mspA* (131).

3.5. Mecanismos de resistência por aumento da expressão de bombas de efluxo

3.5.1. Bombas de efluxo

As bombas de efluxo, originalmente descritas em bactérias, são actualmente reconhecidas como determinantes major na modulação da acumulação de compostos antimicrobianos em praticamente todos os tipos de células, desde procariontes aos eucariontes superiores (138).

Os sistemas de efluxo bacterianos dependentes de energia bombeiam uma gama diversificada de compostos químicos e estruturalmente independentes, sem proceder à sua alteração ou degradação (61). A análise de diversas sequências do genoma bacteriano, disponíveis em bases de dados públicas, tem permitido constatar que as bombas de efluxo de compostos antimicrobianos, conhecidas ou putativas, constituem 6 a 18% de todos os transportadores encontrados em todas as células bacterianas (96).

O facto das bactérias patogénicas e não patogénicas possuírem um número comparável de bombas de efluxo codificadas no cromossoma sugere que estes sistemas de efluxo não surgiram recentemente como resultado de uma exposição extensiva aos fármacos utilizados na prática clínica, mas que desempenham um papel fisiológico importante na extrusão de substâncias tóxicas de origem natural (113).

Em 1976, foi reportado o primeiro exemplo de bomba de efluxo, a P-glicoproteína, que se encontrava implicada na resistência de células cancerígenas de mamíferos a agentes citostáticos, e no final desta mesma década, o efluxo de antibióticos foi descrito como um mecanismo de resistência bacteriano, após diversos estudos com estirpes de *Escherichia coli* resistentes à tetraciclina (5, 6, 58, 69, 83).

Desde essa altura, diversos sistemas de efluxo codificados no cromossoma ou em plasmídeos têm sido relatados para uma ampla variedade de agentes antibacterianos, incluindo antibióticos, biocidas e solventes, em numerosas bactérias (99, 100).

Embora algumas bombas de efluxo sejam específicas, uma grande parte destes sistemas de extrusão é capaz de acomodar diversos compostos antimicrobianos, contribuindo, significativamente para a multiresistência intrínseca e adquirida em bactérias (61).

Estes sistemas de transporte podem ser classificados segundo as suas características bioenergéticas em duas classes, os transportadores activos primários e os transportadores activos secundários (79, 137). Como fonte de energia, os transportadores activos primários hidrolisam o trifosfato de adenosina (ATP), sendo desta forma denominados de transportadores “ATP-binding cassette”, enquanto os transportadores activos secundários recorrem ao gradiente electroquímico transmembranar protónico ou de iões de sódio (79).

De acordo com as suas características estruturais, relações filogenéticas e especificidade do substrato, as bombas de efluxo podem ainda ser subdivididos 5 em famílias ou superfamílias: a superfamília “ATP-Binding Cassete” (ABC), a superfamília “Major Facilitator” (MFS), a família “Small Multidrug Resistance” (SMR), a superfamília “Resistance-nodulation-cell division” (RND) e a família “multidrug and toxic compound extrusion” (MATE) (Tabela I.3) (61, 79, 137).

Tabela I.3. Caracterização das famílias ou superfamílias de transportadores activos celulares. Adaptado de (61, 64, 138).

Família ou superfamília	Fonte de energia
ABC	Hidrólise de ATP
MFS	Gradiente transmembranar protónico
SMR	Gradiente transmembranar protónico
RND	Gradiente transmembranar protónico
MATE	Gradiente transmembranar protónico ou de iões de sódio

Legenda: RND, Superfamília “Resistance-nodulation-cell division”; MFS, Superfamília “Major Facilitator”; ABC, Superfamília “ATP-Binding Cassete”; MATE, Família “multidrug and toxic compound extrusion”; SMR, Família “Small Multidrug Resistance”.

3.5.1.1. Superfamília “ATP-Binding Cassete” (ABC)

As proteínas transportadoras pertencentes à superfamília ABC estão envolvidas na tolerância a uma grande diversidade de agentes citotóxicos em células procariontes e eucariontes, utilizando a energia livre proveniente da hidrólise do ATP como fonte de energia para o transporte dos diferentes substratos (Figura I.4A) (38, 102, 140).

A superfamília ABC é constituída por diversas famílias, sendo a atribuição da família geralmente efectuada de acordo com a especificidade do substrato. As bombas de efluxo LmrA de *Lactococcus lactis*, Msr(A) de *Staphylococcus* spp. e EfrAB de *Enterococcus faecalis* são exemplos de proteínas desta superfamília (114, 137).

Estruturalmente, os transportadores ABC parecem consistir em pelo menos quatro domínios: dois domínios transmembranares, altamente hidrofóbicos, compreendendo geralmente seis hélices α que formam a via através da qual o substrato atravessa a membrana, e dois domínios hidrofílicos de ligação a sequências nucleotídicas, localizados na periferia da face citoplasmática da membrana e responsáveis pela ligação e hidrólise do ATP para a translocação do substrato (Figura I.4B) (38, 102).

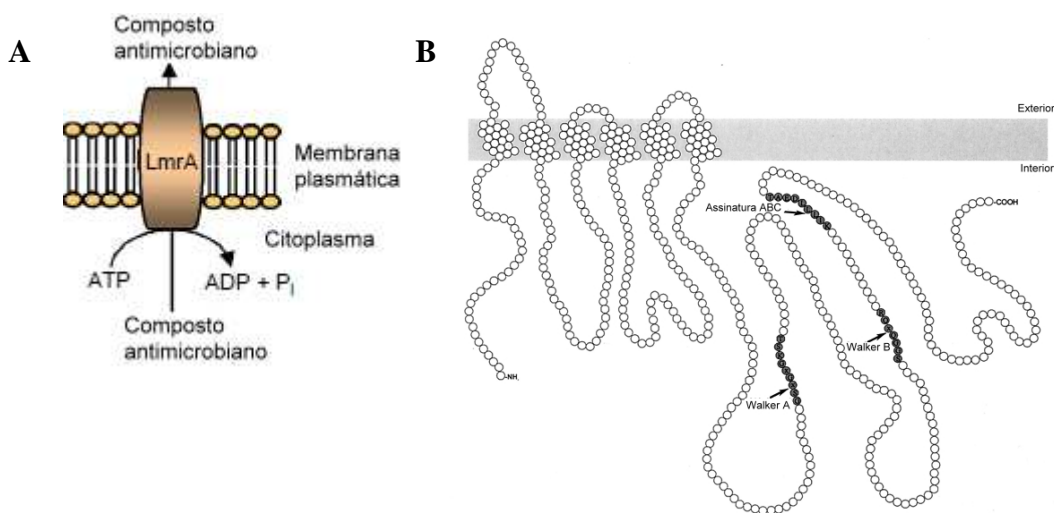


Figura I.4. Representação esquemática da bomba de efluxo LmrA da superfamília ABC (A) e modelo estrutural para os transportadores ABC e respectivos motivos conservados (B). Adaptado de (61, 102).

3.5.1.2. Superfamília “Major Facilitator” (MFS)

Os transportadores MFS constituem uma superfamília antiga, grande e diversa, que incluem mais de um milhar de membros sequenciados, agrupados em pelo menos 59 famílias (61).

Os membros desta superfamília, presente em células eucarióticas e procarióticas, podem catalizar o uniporte, o simporte soluto/catião (H^+ ou Na^+), o antiporte soluto/ H^+ ou o antiporte soluto/soluto (Figura I.5A) (61, 114).

Estas proteínas apresentam 12 ou 14 segmentos transmembranares (Figura I.5B e I.5C) e estão envolvidas no transporte de diferentes compostos, como açúcares simples, oligossacáridos, fármacos, aminoácidos, metabolitos do ciclo de Krebs e uma grande variedade de catiões e aniões inorgânicos (38, 114).

Os transportadores QacA/B e NorA de *Staphylococcus aureus*, ErmB de *E. coli* e LfrA de *M. smegmatis* são exemplos de sistemas de extrusão de compostos antimicrobianos pertencentes à superfamília MFS (102, 137).

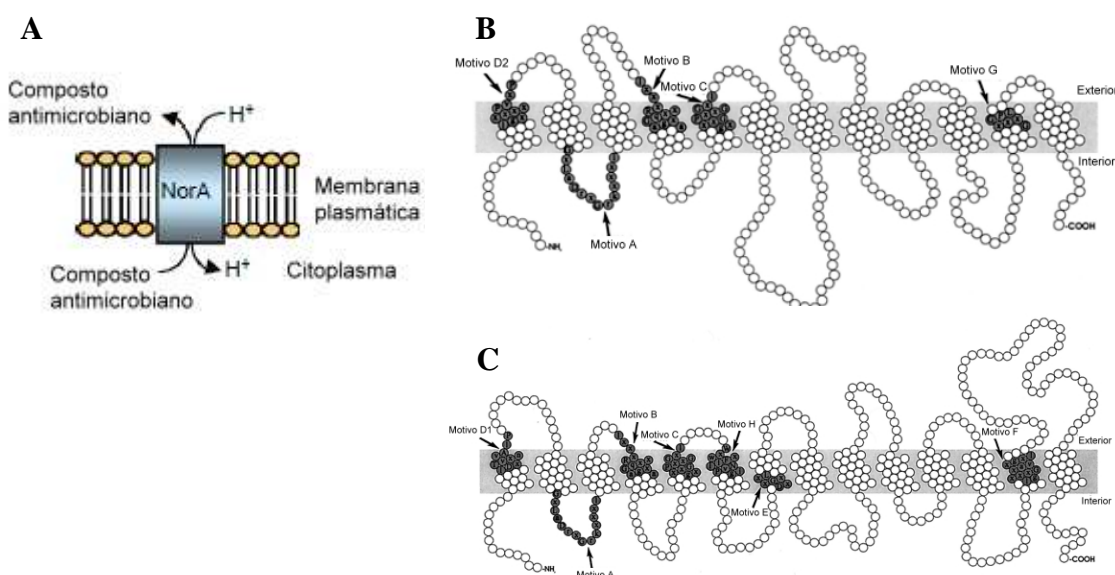


Figura I.5. Representação esquemática da bomba de efluxo NorA da superfamília MFS (A) e modelo estrutural para os transportadores MFS e respectivos motivos conservados, possuindo 12 (B) e 14 (C) segmentos transmembranares. Adaptado de (61, 102).

3.5.1.3. Família “Small Multidrug Resistance” (SMR)

Os membros da família SMR são sistemas de transporte homo-oligoméricos ou hetero-oligoméricos procarióticos, de reduzidas dimensões (38, 61, 102). As subunidades destes sistemas são compostas por 100 a 120 resíduos de aminoácidos, e apresentam quatro segmentos transmembranares (Figura I.6B) (61, 38). Estas proteínas transportadoras utilizam a força motriz protónica (FMP) para induzir a extrusão de diversos compostos, geralmente catiónicos (Figura I.6A) (38, 61, 102).

De entre as bombas de efluxo pertencentes a esta família, bem caracterizadas na literatura, incluem-se a Smr de *S. aureus*, ErmE de *E. coli* e Mmr de *M. tuberculosis*. (38, 102).

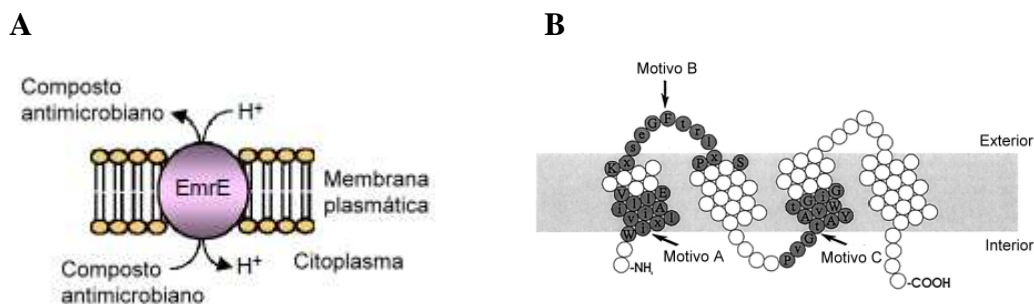


Figura I.6. Representação esquemática da bomba de efluxo ErmE da família SMR (A) e modelo estrutural para os transportadores SMR e respectivos motivos conservados (B). Adaptado de (61, 102).

3.5.1.4. Superfamília “Resistance-nodulation-cell division” (RND)

Os sistemas transportadores da superfamília RND consistem, de um modo geral, em grandes cadeias polipeptídicas, compostas por 700 a 1300 resíduos de aminoácidos, com 12 segmentos transmembranares (Figura I.7B) (102, 114).

Os membros desta superfamília estão presentes em bactérias Gram-negativas e possuem um papel importante na resistência a diversos compostos incluindo antibióticos, corantes e detergentes, através da extrusão destes substratos, por via de um mecanismo de antiporte substrato/ H^+ (11, 61). Estas bombas de efluxo são constituídas

por uma associação entre três proteínas, nomeadamente, uma proteína transportadora, uma proteína membrana externa e uma proteína de fusão periplásmica membrana, formado um canal que atravessa o espaço periplásmico, permitindo o transporte de compostos através da membrana interna e externa das bactérias Gram-negativas (Figura I.7A) (11, 102).

As estruturas proteicas tripartidas AcrAB-TolC de *E. coli* e MexAB-OprM de *P. aeruginosa* são exemplos de sistemas de efluxo da superfamília RND (163).

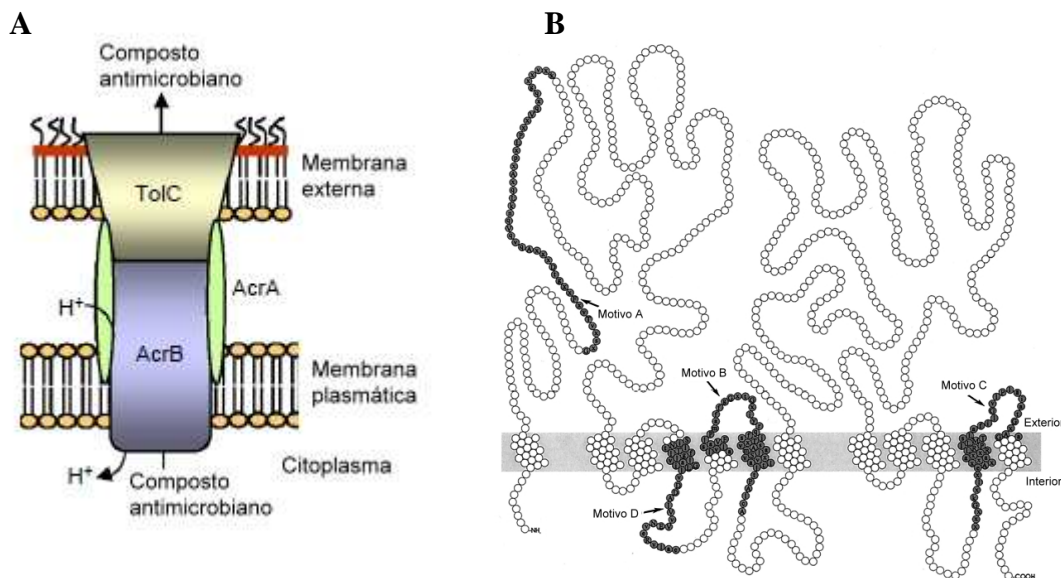


Figura I.7. Representação esquemática da bomba de efluxo AcrAB-TolC da superfamília RND (A) e modelo estrutural para os transportadores RND e respectivos motivos conservados (B). Adaptado de (61, 102).

3.5.1.5. Família “multidrug and toxic compound extrusion” (MATE)

Os transportadores da família MATE, classificados anteriormente como membros da superfamília MFS devido à semelhança na topologia membrana, são actualmente reconhecidos como uma família distinta de transportadores, uma vez que não apresentam homologia de sequências para as proteínas MFS (61). Os membros da família MATE são compostos, aproximadamente, por 450 resíduos de aminoácidos, com 12 segmentos transmembranares (61, 102).

Estes sistemas de efluxo utilizam a FMP ou o gradiente transmembranar de iões sódio como fonte de energia para a extrusão de diversos substratos, como corantes catiónicos, fluoroquinolonas hidrofílicas e aminoglicosídeos (Figura I.8) (61, 102).

Como exemplo de bombas de efluxo, descritas na literatura, pertencentes à família MATE, citam-se a PmpM de *P. aeruginosa*, MepA de *S. aureus* e NorM de *Neisseria meningitidis* (61, 95).

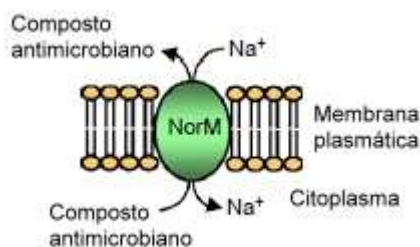


Figura I.8. Representação esquemática da bomba de efluxo NorM da família MATE. Adaptado de (61).

3.5.2. Bombas de efluxo em micobactérias

A primeira evidência indirecta da presença de um sistema proteico de extrusão de compostos antimicrobianos em micobactérias surgiu com a emergência de estirpes resistentes às fluoroquinolonas, após a introdução desta classe de antibióticos na terapia de tuberculose pulmonar multirresistente (8, 134, 142). Takiff et al., em 1996, através da utilização de *M. smegmatis* como modelo genético para *M. tuberculosis*, seleccionaram um gene que confere resistência de baixo nível às fluoroquinolonas e aumenta a frequência de mutações associadas a resistência de alto nível quando presente num plasmídeo multicópia (134). Este gene denominado *lfrA*, de “low-level fluoroquinolone resistance”, codifica para uma bomba de efluxo pertencente à superfamília MFS, a LfrA (134).

Actualmente, encontram-se identificadas e caracterizadas geneticamente diversas bombas de efluxo micobacterianas, a maioria pertencendo às superfamílias transportadoras MFS e ABC (1, 26, 38 122, 134, 142). Alguns destes sistemas transportadores presentes em micobactérias, descritos até à data na literatura, encontram-se sumariados na Tabela I.4.

Tabela I.4. Caracterização de bombas de efluxo micobacterianas associadas a susceptibilidade reduzida a compostos antimicrobianos. Adaptado de (38, 71, 142).

Bomba de efluxo	Família transportadora	Micobactéria	Resistência
EfpA	MFS	<i>M. tuberculosis</i>	Fluoroquinolonas, acriflavina, brometo de etídio
Tet(V)	MFS	<i>M. smegmatis</i> <i>M. fortuitum</i>	Tetraciclina
Tap	MFS	<i>M. fortuitum</i> <i>M. tuberculosis</i>	Tetraciclina, aminoglicosídeos
P55	MFS	<i>M. bovis</i> <i>M. tuberculosis</i>	Tetraciclina, aminoglicosídeos
Rv1634	MFS	<i>M. tuberculosis</i>	Fluoroquinolonas
Rv1258c	MFS	<i>M. tuberculosis</i> (estirpe clínica)	Rifampicina, ofloxacina
LfrA	MFS	<i>M. smegmatis</i>	Fluoroquinolonas, acriflavina, brometo de etídio, compostos de amônio quaternários
MmR	SMR	<i>M. tuberculosis</i>	Eritromicina, brometo de etídio, acriflavina, safranina O, pironina Y
MmpL7	RND	<i>M. tuberculosis</i>	Isoniazida
Sistema Pst	ABC	<i>M. smegmatis</i>	Fluoroquinolonas
DrrAB	ABC	<i>M. tuberculosis</i>	Tetraciclina, eritromicina, etambutol, norfloxacin, estreptomicina, cloranfenicol
Operão Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c	ABC	<i>M. tuberculosis</i>	Fluoroquinolonas

Legenda: MFS, Superfamília “Major Facilitator”; SMR, Família “Small Multidrug Resistance”; RND, Superfamília “Resistance-nodulation-cell division”; ABC, Superfamília “ATP-Binding Cassete”.

3.5.2.1. Bombas de efluxo em *M. smegmatis*

O genoma de *M. smegmatis* compreende diversos genes que codificam para bombas de efluxo putativas, pertencentes às cinco classes de transportadores referidas anteriormente, com especial predomínio da superfamília MFS (70). Estudos de comparação entre estas proteínas e as bombas de efluxo putativas descritas em *M. tuberculosis* revelaram homologias até 81% de identidade nas sequências aminoacídicas (Tabela I.5) (70). Apesar da presença de um grande número de genes codificantes para bombas de efluxo putativas em *M. smegmatis*, com a exceção de *lfrA*, a contribuição destas unidades funcionais genéticas para a resistência intrínseca e adquirida deste microrganismo aos antimicrobianos não é totalmente compreendida (70, 134).

Tabela I.5. Classificação e identidade de resíduos de aminoácidos de algumas bombas de efluxo putativas de *M. tuberculosis* H37Rv e *M. smegmatis* mc²155. Adaptado de (70).

Gene(s) de <i>M. tuberculosis</i>	Gene(s) de <i>M. smegmatis</i>	Família	Identidade de resíduos de aminoácidos (%) (<i>M. tuberculosis</i> vs <i>M. smegmatis</i>)
Rv1145-Rv1146	4208498–6201	RND	62
Rv1250	4074929–3495	MFS	63
Rv1258c (<i>tap</i>)	4057327–7998	MFS	67
Rv1410c (P55)	2073408–1882	MFS	69
Rv1634	2814796–3420	MFS	64
Rv1819c	3395875–7779	ABC	63
Rv1877	2555505–2748	MFS	58
Rv2136c	3203468–2646	ABC	73
Rv2836c	1641611–2909	MATE	74
Rv2846c (<i>efpA</i>)	1629942–31402	MFS	81
Rv2994	1393778–2456	MFS	54
Rv3065 (<i>mmr</i> , <i>emrE</i>)	2666199–373	SMR	40
Inexistente	<i>lfrA</i>	MFS	Não aplicável

Legenda: RND, Superfamília “Resistance-nodulation-cell division”; MFS, Superfamília “Major Facilitator”; ABC, Superfamília “ATP-Binding Cassete”; MATE, Família “multidrug and toxic compound extrusion”; SMR, Família “Small Multidrug Resistance”.

Como referido anteriormente, a proteína LfrA, identificada em *M. smegmatis*, foi a primeira bomba de efluxo funcional a ser descrita em micobactérias (134). Este transportador, pertencente à superfamília MFS, compreende 14 segmentos transmembranares e apresenta homologia de sequências com bomba de efluxo QacA de *S. aureus*, partilhando 35% de identidade e 60% de similaridade (134). A bomba de efluxo LfrA tem sido associada a resistência de baixo nível a fluoroquinolonas, brometo de etídio (EtBr), acriflavina, doxorubicina e rodamina 123, quando presente num plasmídeo multicópia (70, 73, 116, 134).

A expressão de LfrA é regulada por um repressor transcricional putativo da família TetR, denominado LfrR, codificado pelo gene *lfrR* que se encontra na região a montante de *lfrA* (18, 37, 70). Os genes *lfrA* e *lfrR* são cotranscritos por um gene promotor comum, e a repressão da transcrição do operão *lfrRA* ocorre através da ligação de LfrR à região promotora de *lfrR-lfrA* (18).

Na ausência de substratos específicos da bomba de efluxo LfrA, o nível basal da expressão de *lfrA* é mínimo, provavelmente devido ao facto da expressão constitutiva deste gene ser apenas necessária na presença destes compostos (18). Esta característica assemelha-se ao controlo de TetA por TetR, onde se verifica que a expressão de *tetA* é muito baixa na ausência de tetraciclina (18, 52). A indução da expressão de LfrA resulta da interacção directa dos substratos com as moléculas repressoras, através da interferência na ligação de LfrR ao gene operador, resultando em níveis elevados de expressão de *lfrA* (18).

Deste modo, o repressor LfrR actua como moderador na manutenção de um equilíbrio na produção LfrA, de forma a prover as necessidades fisiológicas e facilitar a adaptação de *M. smegmatis* às alterações ambientais, incluindo a terapêutica antimicrobiana (18).

3.5.3. Inibidores de bombas de efluxo

Com a identificação e caracterização de sistemas de efluxo que conferem resistência clínica aos antimicrobianos, tem surgido um interesse no desenvolvimento de uma nova classe de agentes potenciadores da acção antibiótica que actuam como inibidores de bombas de efluxo (IBEs) (59, 65, 76). Estes agentes seriam co-formulados ou co-

administrados com os antibióticos apropriados, numa abordagem terapêutica adjuvante semelhante à actual combinação de β -lactâmicos com inibidores de β -lactamases (76).

Existem, actualmente, diversas estratégias de obviar o efluxo de compostos antimicrobianos, nomeadamente utilizando moléculas com uma estrutura análoga a estes tornando-os menos susceptíveis de serem bombeados, através de anticorpos dirigidos contra as proteínas constituintes das bombas, ou por inactivação dos próprios genes através do bloqueio da sua transcrição ou tradução (46, 57, 76, 79, 139). Os estudos mais promissores vão no sentido de inibir a extrusão através de substâncias inibidoras da actividade exportadora das bombas de efluxo ao interferirem com a energia para o transporte activo (63, 139).

Durante a última década diversos IBEs foram identificados (61). O MC-207,100 fenilalanil-arginil- β -naftilamida (Figura I.9A), o primeiro IBE descrito, inibe de forma efectiva as quatro bombas de efluxo com relevância clínica em *P. aeruginosa*, bem como transportadores RND semelhantes de outras bactérias Gram-negativas (63).

Diversos grupos de IBEs com origem noutras áreas terapêuticas têm sido avaliados como potencial ponto de partida para o desenvolvimento de compostos potenciadores da acção antibiótica (76). Como exemplo destes compostos encontram-se: (i) a reserpina (Figura I.9B), um alcalóide isolado das raízes da planta *Rauwolfia serpentina*, com acção anti-hipertensiva e neuroléptica, originalmente identificada como inibidor das bombas de efluxo Bmr de *Bacillus subtilis* e NorA de *S. aureus*; (ii) o verapamil (VP) (Figura I.9C), um bloqueador dos canais de cálcio com actividade inibitória da P-glicoproteína e de diversas bombas de efluxo bacterianas pertencentes à superfamília ABC, incluindo a LmrA de *L. lactis*; (iii) as fenotiazinas, como a tioridazina (TZ) e clorpromazina (CPZ) (Figuras I.9D e I.9E), antagonistas dos receptores de dopamina e inibidores da calmodulina, utilizados clinicamente como agentes neurolépticos e antieméticos, que inibem a actividade das ATPases dependentes de cálcio, inibindo processos de transporte; (iv) e o carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP) (Figura I.9F), um desacoplador de protões que interfere com a FMP (38, 63, 76, 82).

No entanto, é de assinalar que a actividade potenciadora da acção antibiótica demonstrada pela maioria destes compostos IBEs apenas ocorre com concentrações significativamente superiores às clinicamente utilizadas nos outros âmbitos terapêuticos (76).

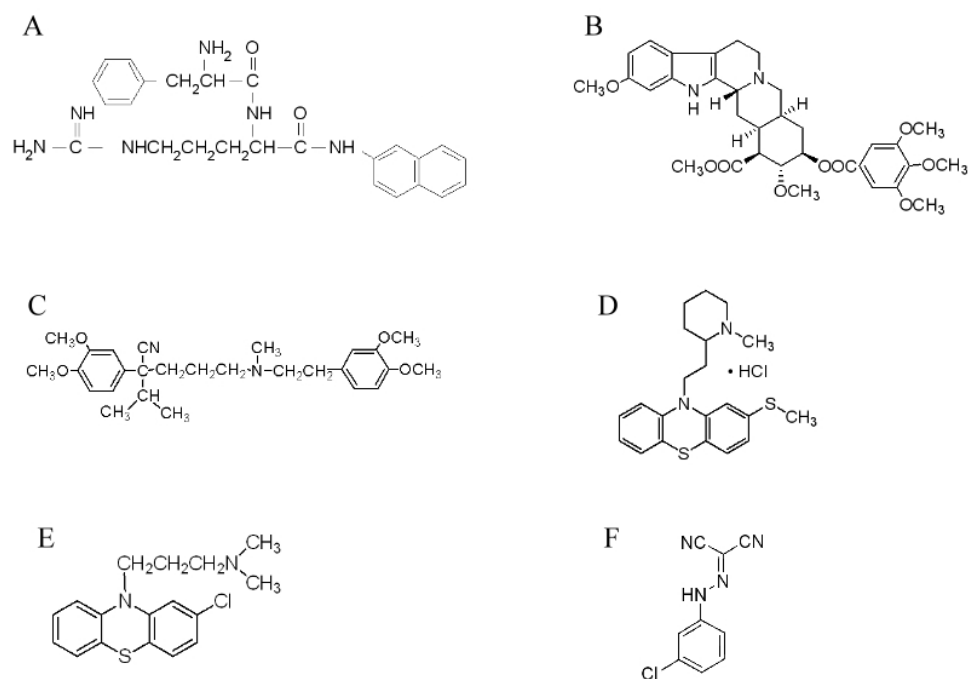


Figura I.9. Estrutura química de compostos com actividade inibitória de bombas de efluxo. A - fenilalanil-arginil- β -naftilamida, B – reserpina, C – verapamil, D – tioridazina, E – clorpromazina, F - carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona. Adaptado de (2, 79).

4. Métodos para a detecção do transporte de compostos através da parede celular bacteriana

Os métodos comumente utilizados para a detecção e transporte de compostos através da parede celular bacteriana, são métodos exigentes em termos de processo e equipamento e cujos resultados são pouco precisos (81). São exemplo destes métodos a utilização de antibióticos marcados radioativamente ou com metais pesados. Nestes, as bactérias são incubadas com antibióticos marcados, na presença e ausência de inibidores, são filtradas, e o sinal desses filtros é depois medido em contadores de cintilações ou as células observadas ao microscópio e o sinal quantificado contra os controlos (11, 81). Outros ensaios, mais simples, directos e precisos utilizam compostos fluorescentes como o EtBr para detectar o influxo/acumulação deste composto e a sua extrusão pelas bombas de efluxo, na presença e na ausência de inibidores usando detectores de fluorescência (143, 144).

Um dos métodos utiliza EtBr em placas de agar e assenta na capacidade das bombas de efluxo expelirem ou não o substrato EtBr (81). Neste método, a avaliação da acção dos IBEs é realizada através da adição destes compostos à composição do agar utilizado nas placas (81). Um desenvolvimento desse método tem por base a utilização do termociclador em tempo real Rotor-GeneTM 3000 (Corbett Research, Sydney, Austrália) e baseia-se na observação do transporte em tempo real do EtBr (143, 144). Tal é possível devido às características e precisão do equipamento e à metodologia desenvolvida, uma vez que o Rotor-GeneTM 3000, desenvolvido para a reacção em cadeia da polimerase em tempo real, permite a monitorização da excitação por fluorescência resultante da ligação de compostos fluorescentes ao material celular e permite, em tempo real, obter-se uma estimativa precisa do balanço entre a entrada de EtBr nas células e a sua saída por efluxo.

5. Objectivos do trabalho

Neste trabalho propomo-nos a estudar e avaliar a contribuição da redução da permeabilidade e da actividade dos sistemas de efluxo activos para a multirresistência aos antimicrobianos em micobactérias, através da utilização de *M. smegmatis* como modelo genético.

Para o efeito iremos comparar a capacidade de acumulação e extrusão de EtBr, um substrato universal de bombas de efluxo utilizado como marcador de transporte, pela estirpe selvagem *M. smegmatis* mc²155 com mutantes para LfrA e MspA, a principal bomba de efluxo e porina de *M. smegmatis*, respectivamente, na presença e ausência de IBEs, e correlacionar os resultados obtidos com os respectivos perfis da susceptibilidade aos antibióticos na presença e ausência dos mesmos compostos com acção inibitória do efluxo.

A obtenção do perfil antibiótico será realizada recorrendo à determinação da concentração mínima inibitória em microplaca de 96 poços, e a avaliação do transporte de EtBr, através de dois métodos fluorimétricos, um em microplaca de 96 poços, desenvolvido no decorrer deste trabalho (80), e outro semi-automático em tempo real (143).

Dos resultados obtidos através das diversas metodologias seleccionaremos um dos antibióticos onde a actividade dos IBEs foi mais significativa, e procederemos à avaliação da acumulação/retenção deste antibiótico marcado com um isótopo radioactivo de carbono.

Com este estudo procuraremos contribuir para um conhecimento mais aprofundado de dois dos principais mecanismos responsáveis pela resistência intrínseca micobacteriana a diversos antimicrobianos, considerada como um importante factor facilitador na aquisição e estabilização de um património genético que conduz ao desenvolvimento de resistência de alto nível em micobactérias.

II – MATERIAL E MÉTODOS

1. Material

1.1. Material biológico

As estirpes de *M. smegmatis* utilizadas neste estudo encontram-se descritas sumariamente na Tabela II.1. As estirpes *M. smegmatis* SMR5, *M. smegmatis* MN01 e *M. smegmatis* ML10 foram gentilmente cedidas por Michael Niederweis (Departamento de Microbiologia, Universidade de Alabama, Birmingham, Alabama, Estados Unidos da América); as estirpes *M. smegmatis* XZL1675 e *M. smegmatis* XZL1720 foram gentilmente cedidas por Hiroshi Nikaido (Departamento de Biologia Molecular e Celular, Universidade da Califórnia, Berkeley, California, Estados Unidos da América).

Tabela II.1. Descrição sumária das estirpes de *M. smegmatis* utilizadas neste estudo.

Estirpes	Descrição
mc ² 155	Estirpe selvagem, derivada de <i>M. smegmatis</i> mc ² 6 (125)
SMR5	Estirpe derivada de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155, resistente à estreptomicina devido a uma mutação no gene <i>rpsL</i> , presente na proteína ribossômica S12 (115)
MN01	Estirpe derivada de <i>M. smegmatis</i> SMR5, deletada no gene <i>mspA</i> (128)
ML10	Estirpe derivada de <i>M. smegmatis</i> SMR5, deletada nos genes <i>mspA</i> e <i>mspC</i> (131)
XZL1675	Estirpe derivada de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155, deletada no gene <i>lfrA</i> (70)
XZL1720	Estirpe derivada de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155, deletada no gene <i>lfrR</i> (70)

1.2. Meios de cultura e suplementos

Os meios de cultura Middlebrook 7H9 Broth (7H9) e Middlebrook 7H11 Agar (7H11) foram adquiridos à Difco (Detroit, Estados Unidos da América); o suplemento

ácido oleico/albumina/dextrose/catalase (OADC) foi fornecido pela Becton e Dickinson (Sparks, Estados Unidos da América); o glicerol, também utilizado como suplemento, foi comprado à Merck (Darmstadt, Alemanha).

Os meios 7H9 e 7H11, reconstituídos no laboratório, foram esterilizados por autoclavagem, a 121°C durante 20 minutos a 1 bar.

Na Tabela II.2 encontra-se descrita a composição dos meios de cultura empregues neste estudo.

Tabela II.2. Composição dos meios de cultura utilizados.

Meio de cultura	Composição/Litro
7H9	0.5 g sulfato de amónia; 0.5 g ácido L-glutâmico; 0.001 g piridoxina; 0.0005 g biotina; 0.04 g citrato de ferro amoniacal; 0.04 g citrato de sódio; 1.5 g fosfato monopotássico; 0.025 g sulfato de magnésio; 0.0005 g cloreto de cálcio; 0.001 g sulfato de zinco; 0.001 g sulfato de cobre; 0.00025 g verde de malaquite; 15 g de gelose.
7H11	0.5 g sulfato de amónia; 0.5 g ácido L-glutâmico; 1 g hidrolisado pancreático de caseína; 0.001 g piridoxina; 0.0005 g biotina; 0.04 g citrato de sódio; 1.5 g fosfato dissódico; 0.05 g sulfato de magnésio; 0.001 g verde de malaquite; 15 g de gelose.

Legenda: 7H9, Middlebrook 7H9 Broth; 7H11, Middlebrook 7H11 Agar.

1.3. Reagentes e soluções

Os antibióticos STR, INH, RIF, ETB, amicacina (AMK), ciprofloxacina (CIP) e eritromicina (ERY), o substrato de bombas de efluxo EtBr, os IBEs, TZ, CPZ, VP e CCCP, e a glucose foram adquiridos à Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid, Espanha); o antibiótico claritromicina (CLT) foi comprado aos Laboratórios Abbott (Abbott Park, Estados Unidos da América); a [¹⁴C]-eritromicina e o líquido de cintilação cocktail ULTIMA GOLD F foram adquiridos à PerkinElmer (San Jose, Estados Unidos da América).

A concentração “stock” e as condições de armazenamento dos antibióticos e compostos encontram-se descritas na Tabela II.3.

Tabela II.3. Concentração “stock” e condições de armazenamento dos antibióticos e compostos utilizados.

Reagente	Concentração “stock”	Armazenamento
STR	3.4 mg/mL em água bidestilada estéril	-20°C
INH	3.4 mg/mL em água bidestilada estéril	-20°C
RIF	3.4 mg/mL em metanol	-20°C
EMB	3.4 mg/mL em água bidestilada estéril	-20°C
AMK	3.4 mg/mL em água bidestilada estéril	-20°C
CIP	3.4 mg/mL em água bidestilada estéril	-20°C
CLT	3.4 mg/mL em metanol	-20°C
ERY	3.4 mg/mL em metanol	-20°C
EtBr	10 mg/mL em água bidestilada estéril	4°C
TZ	10 mg/mL em água bidestilada estéril	-20°C
CPZ	10 mg/mL em água bidestilada estéril	-20°C
VP	15 mg/mL em água bidestilada estéril	-20°C
CCCP	10 mg/mL em água bidestilada estéril e metanol (1:1)	Temperatura ambiente
Glucose	20% (p/v) em água bidestilada estéril	-20°C

Legenda: STR, estreptomicina; INH, isoniazida; RIF, rifampicina; EMB, etambutol; AMK, amicacina; CIP, ciprofloxacina; CLT, claritromicina; ERY, eritromicina; EtBr, brometo de etídio; TZ, tioridazina; CPZ, clorpromazina; VP, verapamil, CCCP, carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona.

Os antibióticos e compostos, em que foi utilizada água bidestilada estéril para a preparação da solução “stock”, foram esterilizados por filtração através de um filtro para seringa com poros de 0.22 µm, adquiridos à Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Alemanha).

O tampão fosfato salino (PBS) sob a forma de tabletes foi comprado à Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid, Espanha), e a sua esterilização foi realizada por autoclavagem a 121°C, durante 20 minutos a 1 bar.

2. Métodos

2.1. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

A determinação da CMI dos antibióticos ou compostos para as estirpes de *M. smegmatis* em estudo foi realizada pelo método da microdiluição em meio líquido, segundo as recomendações do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) para a determinação de CMIs de micobactérias de crescimento rápido (27).

As estirpes foram inoculadas em meio 7H9 suplementado com 10% de OADC (7H9/OADC), e incubadas a 37°C com agitação a 220 rotações por minuto (rpm), até as culturas atingirem uma densidade óptica (DO) de 0.8 a um comprimento de onda de 600 nm (DO₆₀₀), medida num espectrofotómetro PU 8620 (Philips Scientific, New Jersey, Estados Unidos da América). Seguidamente, foi preparado um inóculo inicial através da diluição da cultura em tampão PBS, até a suspensão bacteriana apresentar uma turvação equivalente ao nº 0.5 da escala de McFarland. O inóculo final foi obtido mediante a realização de uma diluição a 1:100 desta suspensão em meio 7H9/OADC.

Numa microplaca de 96 poços, para um volume de 0.1 mL, foram executadas diluições seriadas de ½ dos antibióticos e compostos em meio 7H9/OADC, sendo posteriormente adicionadas alíquotas de 0.1 mL do inóculo final. O cálculo da concentração final dos antibióticos ou compostos foi realizado para um volume final de 0.2 mL.

Como controlo foram utilizados um poço com 0.2 mL de meio 7H9/OADC, um poço com 0.2 mL de meio 7H9/OADC e inóculo, e um poço com 0.2 mL de meio 7H9/OADC e reagente/composto testado, correspondendo, respectivamente, ao controlo do meio de cultura, controlo de crescimento e controlo do reagente/composto testado.

Os controlos e diluições para a determinação das CMI foram realizados em duplicados em todos os ensaios.

Para a avaliação do efeito dos IBEs na CMI dos antibióticos utilizados, foi adicionado cada um dos IBEs a testar, a ½ da sua CMI, às diluições com antibiótico, antes do acréscimo do inóculo final.

Após selagem das microplacas, estas foram colocadas a incubar a 37°C até o poço controlo de crescimento apresentar desenvolvimento visível (aproximadamente 2 dias para as micobactérias de crescimento rápido). O valor da CMI correspondeu à concentração mais baixa de antibiótico ou composto em que se verificou a ausência de desenvolvimento micobacteriano (27).

2.2. Avaliação da actividade das bombas de efluxo

2.2.1. Método do brometo de etídio em microplaca de 96 poços

A avaliação inicial do transporte do EtBr através da parede celular das diversas estirpes de *M. smegmatis* em estudo, foi realizada através da utilização de uma microplaca de 96 poços contendo meio 7H9/OADC com concentrações crescentes de EtBr.

O método do brometo de etídio em microplaca de 96 poços, adaptado do método do brometo de etídio em placa (81), devido ao seu baixo custo e simplicidade, foi recentemente desenvolvido na unidade de Ensino e Investigação em Micobactérias no âmbito desta Tese de Mestrado e utilizado inicialmente como rastreio na demonstração da actividade das bombas de efluxo em *E. coli* (80), tendo apresentado resultados fiáveis e reprodutíveis. Para a utilização deste método em *M. smegmatis* foi necessária a alteração do protocolo, devido à morosidade do seu crescimento em relação à estirpe anteriormente mencionada.

Após o crescimento inicial das estirpes de *M. smegmatis* em meio 7H9/OADC a 37°C com agitação a 220 rpm, até atingirem uma DO₆₀₀ de 0.8, diluição da cultura em tampão PBS até a suspensão bacteriana apresentar uma turvação equivalente ao nº 0.5 da escala de McFarland, e preparação do inóculo final através da diluição da suspensão anterior a 1:100 em meio 7H9/OADC, foi preparada uma microplaca de 96 poços, na qual, para um volume de 0.1 mL, foram realizadas diluições seriadas a ½ de EtBr em meio 7H9/OADC, sendo posteriormente adicionada uma alíquota de 0.1 mL do inóculo

final. A concentração final do EtBr foi calculada para um volume final de 0.2 mL e variou entre 0.016 e 8.0 µg/mL.

Como controlo foram utilizados um poço com 0.2 mL de meio 7H9/OADC e um poço com 0.2 mL de meio 7H9/OADC e inóculo, correspondendo, respectivamente, ao controlo do meio de cultura e ao controlo de crescimento. Foi ainda utilizado um controlo de fluorescência residual, constituído por uma linha de poços da microplaca, contendo meio 7H9/OADC e diluições seriadas de EtBr, à qual não foi adicionada inóculo.

As microplacas foram incubadas a 37°C até o poço controlo de crescimento apresentar desenvolvimento visível (aproximadamente 2 dias para micobactérias de crescimento rápido). A análise da emissão de fluorescência e o registo fotográfico foi realizado sob luz UV, no transiluminador Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Estados Unidos da América).

A fluorescência emitida resulta da ligação transiente do EtBr, retido no espaço periplásmico ou junto à face interna da parede celular, a diversos componentes celulares como ácidos nucleicos e proteínas. Acima de uma concentração de saturação, que permite que a concentração de EtBr seja tal que este atinja zonas mais interiores da célula e se intercale no ADN bacteriano, a ligação do EtBr torna-se irreversível e causa a inviabilidade celular. Em todas experiências realizadas no decurso desta tese utilizaram-se concentrações de EtBr abaixo de ½ da CMI deste substrato de bombas de efluxo para cada estirpe utilizada.

A ausência de fluorescência nos poços da microplaca que apresentem desenvolvimento micobacteriano indiciam a presença de mecanismos de efluxo, pois, as células ao bombearem o EtBr impedem a sua internalização, minimizando a emissão de fluorescência. Este método comparativo mede assim a quantidade total de fluorescência emitida pela estirpe em estudo comparada com a estirpe controlo para a mesma concentração de EtBr após 2 dias de incubação. Quanto maior a fluorescência, maior a acumulação/retenção de EtBr, menor a capacidade de efluxo/extrusão ou maior a permeabilidade ao EtBr.

2.2.2. Método fluorimétrico semi-automático

A avaliação da acumulação e da extrusão de EtBr nas estirpes de *M. smegmatis* estudadas foi realizada através de um método fluorimétrico semi-automático em tempo real desenvolvido na Unidade de Ensino e Investigação em Micobactérias do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (108, 143).

A monitorização em tempo real do transporte de EtBr através da parede celular implica uma diferenciação entre o sinal de fluorescência emitida por este fluorocromo em solução, e após entrada na célula e ligação transiente com os componentes celulares junto à face interna da parede celular. Em solução, o EtBr apresenta um sinal mínimo de fluorescência, mas após a sua transposição para o meio intracelular este sinal aumenta drasticamente.

A detecção fluorimétrica em tempo real deste sinal foi realizada através da utilização do termociclador de tempo real Rotor-GeneTM 3000. O EtBr concentrado intracelularmente, quando excitado a um comprimento de onda de 530 nm emite uma fluorescência que pode ser detectada através de um filtro “high-pass” (permite a detecção de todos os sinais superiores a este comprimentos de onda) de 585 nm (108, 143).

2.2.2.1. Ensaios de acumulação

As células micobacterianas foram crescidas em meio 7H11/OADC a 37°C com agitação a 220 rpm, até atingirem uma DO₆₀₀ de 0.8. Alíquotas de 1 mL das culturas foram centrifugadas a 13000 rpm durante três minutos à temperatura ambiente, numa microcentrífuga Heraeus Biofuge Pico (DJB Labcare Ltd, Newport Pagnell, Reino Unido), o sobrenadante foi descartado, e o “pellet” lavado com 1 mL PBS (pH 7.4) e ressuspenso em 1 mL desta solução tampão. Após o ajuste da DO₆₀₀ a 0.4 foi adicionada glucose, de modo a se obter uma concentração final de 0.4%. Seguidamente, foram adicionadas alíquotas de 0.095 mL da suspensão micobacteriana e 0.005 mL da solução de EtBr com a concentração final desejada, em microtubos de 0.2 mL (108).

O efeito dos IBEs na acumulação de EtBr foi determinado através da adição de 0.005 mL de cada composto a microtubos de PCR de 0.2 mL contendo alíquotas de 0.095 mL da suspensão bacteriana e EtBr.

Os microtubos foram colocados no Rotor-Gene™ 3000, e a fluorescência foi medida a cada 60 segundos durante 60 minutos, a 37°C, através da utilização de um filtro de excitação para comprimentos de onda de 530 nm “band-pass” e um filtro de detecção para comprimentos de onda 585 nm “high-pass” (108, 143).

2.2.2.2. Ensaio de efluxo

As estirpes de *M. smegmatis* foram cultivadas em meio 7H9/OADC a 37°C com agitação a 220 rpm, até apresentarem uma DO₆₀₀ de 0.8. Alíquotas de 1 mL das culturas foram centrifugadas a 13000 rpm durante três minutos à temperatura ambiente, numa microcentrífuga Heraeus Biofuge Pico, o sobrenadante foi descartado, e o “pellet” lavado e ressuspenso com 1 mL PBS (pH 7.4). Como para monitorização do efluxo de EtBr em tempo real são necessárias células com uma elevada concentração intracelular deste fluorocromo, após o ajuste da DO₆₀₀ a 0.4, as micobactérias foram expostas a condições que promoveram a acumulação máxima de EtBr, sem provocar a sua morte celular: IBE que produziu maior acumulação/retenção de EtBr a ½ da CMI, EtBr a ½ da CMI, e incubação à temperatura ambiente durante 60 minutos, na ausência de glucose (143), para o passo que comumente se designa de carregamento. As células micobacterianas carregadas com EtBr foram depois centrifugadas a 13000 rpm durante três minutos à temperatura ambiente, numa microcentrífuga Heraeus Biofuge Pico, o sobrenadante foi descartado, e o “pellet” ressuspenso em PBS sem EtBr, para lavagem. Seguidamente foi adicionada glucose, de modo a se obter uma concentração final de 0.4%, e foram transferidas alíquotas de 0.095 mL da suspensão micobacteriana e 0.005 mL dos respectivos IBEs em microtubos de 0.2 mL (108).

Após a colocação dos microtubos no Rotor-Gene™ 3000, a fluorescência foi medida a cada 30 segundos durante 30 minutos, a 37°C, através da utilização de um filtro de excitação para comprimentos de onda de 530 nm “band-pass” e um filtro de detecção para comprimentos de onda 585 nm “high-pass” (108, 143).

A análise comparativa dos resultados de efluxo foi realizada através da normalização dos dados obtidos pelo Rotor-GeneTM 3000. A fluorescência produzida pelas células micobacterianas carregadas com EtBr e impedidas de efluxar, através da ação do IBE e ausência de glucose, foi definida como o valor da fluorescência máxima (fluorescência relativa equivalente a 1) que pode ser obtido durante um ensaio. A fluorescência relativa dos restantes tubos foi obtida através do ratio entre os dados de fluorescência do efluxo para cada estirpe testada e o valor de fluorescência máxima, por unidade de tempo (108). Cada ensaio foi realizado em triplicado e não existiu variação qualitativa nos resultados obtidos.

2.2.3. Ensaio de acumulação da [¹⁴C]-eritromicina

A avaliação da retenção intracelular da eritromicina, na presença e ausência de IBEs, foi realizada mediante ensaios de acumulação utilizando este antibiótico marcado com um isótopo radioactivo de carbono.

A cultura das estirpes foi realizada em meio 7H9/OADC e incubadas a 37°C com agitação a 220 rpm, até estas atingirem uma DO₆₀₀ de 0.8. As células foram colhidas por centrifugação a 13000 rpm durante três minutos à temperatura ambiente, numa microcentrífuga Heraeus Biofuge Pico. O sobrenadante foi removido, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS, e a DO₆₀₀ foi ajustada a 0.4 com PBS. Após a adição de glucose para uma concentração final de 0.4% e 3.0 µM de [¹⁴C]-eritromicina (actividade específica de 50 mCi/mmol), o volume total da amostra foi dividida por dois conjuntos de três tubos. Num conjunto foi adicionado 0.05 mL do IBE a ½ da CMI e no outro foi transferido 0.05 mL de PBS. Posteriormente à incubação dos tubos a 37°C durante 1 hora, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS, de forma a remover a eritromicina marcada em suspensão. Seguidamente, foram retiradas alíquotas de 1 ml, e filtradas através de filtros Whatman GF/C. Os filtros foram colocados a secar durante a noite a 37°C e transferidos para frascos de cintilação contendo o líquido de cintilação cocktail ULTIMA GOLD F.

As contagens por minuto (CPM) da [¹⁴C]-eritromicina presente no interior das células foi realizado com o auxílio de um contador de cintilações Beckman LS6500

(Beckman Coulter, Fullerton, Estados Unidos da América). Os dados obtidos corresponderam à média das CPM de cada conjunto de três ensaios.

III - RESULTADOS

1. Caracterização das estirpes de *M. smegmatis*

Sendo o objectivo proposto a avaliação da contribuição dos sistemas de efluxo activos e da redução da permeabilidade celular para a multirresistência aos antimicrobianos em micobactérias, através da utilização de *M. smegmatis* como modelo genético, o trabalho foi iniciado pela caracterização do perfil de susceptibilidade das estirpes micobacterianas aos antibióticos, substratos de bombas de efluxo, e IBEs e seus derivados seleccionados para este estudo.

1.1. Determinação da CMI dos antibióticos e EtBr para as estirpes de *M. smegmatis*

O resultado do perfil de susceptibilidade dos antibióticos STR, INH, RIF, ETB, AMK, CIP, CLT e ERY para as estirpes de *M. smegmatis* em estudo, encontra-se resumido nas Tabela III.1.

Nesta tabela foram também incluídas as CMIs para o substrato universal de bombas de efluxo (144), EtBr, pois muitas das porinas bacterianas e bombas de efluxo utilizam os mesmos canais para promover o influxo e o efluxo de antibióticos e substratos de bombas de efluxo e é objectivo deste trabalho correlacionar o transporte deste fluorocromo com a resistência aos antibióticos nestas estirpes.

Tabela III.1. Valores de CMI dos antibióticos e EtBr para as estirpes de *M. smegmatis*.

Estirpe	CMI mg/L								
	STR	INH	RIF	EMB	AMK	CIP	CLT	ERY	EtBr
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	0.5	8	4	1	0.5	0.25	2	32	4.0
<i>M. smegmatis</i> XZL1720	0.5	8	0.5	1	0.5	0.25	2	32	4.0
<i>M. smegmatis</i> XZL1675	0.5	4	0.5	0.5	0.5	0.125	2	32	0.5
<i>M. smegmatis</i> SMR5	>256	128	4	1	0.5	0.25	2	32	4.0
<i>M. smegmatis</i> MN01	>256	128	8	1	0.5	0.25	8	64	8.0
<i>M. smegmatis</i> ML10	>256	128	8	1	0.5	0.25	8	64	8.0

Legenda: CMI, concentração mínima inibitória; STR, estreptomicina; INH, isoniazida; RIF, rifampicina; EMB, etambutol; AMK, amicacina; CIP, ciprofloxacina; CLT, claritromicina; ERY, eritromicina; EtBr, brometo de etídio.

Da determinação das CMIs dos diversos antibióticos e EtBr, e comparando o perfil de susceptibilidade das estirpes mutantes com a estirpe selvagem, verificou-se que a ausência do gene *lfrA* (*M. smegmatis* XZL1675) promoveu um aumento da susceptibilidade de *M. smegmatis* à INH, RIF, EMB, CIP, e EtBr, o que sugere que a LfrA poderá contribuir para a resistência intrínseca de *M. smegmatis* a estes fármacos (70).

Através destes ensaios, foi também possível observar que a deleção do gene *mspA* (*M. smegmatis* MN01) conferiu a *M. smegmatis* um aumento da resistência à RIF, CLT, ERY e EtBr.

As estirpes *M. smegmatis* SMR5, *M. smegmatis* MN01 e *M. smegmatis* ML10 apresentaram uma CMI superior a 256 mg/L para a estreptomicina, devido à presença de uma mutação no gene *rpsL*, que confere resistência a este antibiótico (115).

1.2. Determinação da CMI dos IBEs para as estirpes de *M. smegmatis*

Os valores de CMI dos IBEs TZ, CPZ VP e CCCP obtidos para as estirpes de *M. smegmatis* em estudo, encontram-se descritos sumariamente na Tabela III.2.

Tabela III.2. Valores de CMI dos IBEs para as estirpes de *M. smegmatis*.

Estirpe	CMI mg/L			
	TZ	CPZ	VP	CCCP
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	12.5	25	200	12.5
<i>M. smegmatis</i> XZL1675	6.25	25	200	12.5
<i>M. smegmatis</i> XZL1720	12.5	25	200	12.5
<i>M. smegmatis</i> SMR5	12.5	25	400	25
<i>M. smegmatis</i> MN01	12.5	25	400	25
<i>M. smegmatis</i> ML10	12.5	25	400	25

Legenda: CMI, concentração mínima inibitória; TZ, tioridazina; CPZ, clorpromazina; VP, verapamil, CCCP, carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona.

2. Avaliação do transporte de EtBr em *M. smegmatis*

2.1. Estudo do transporte de EtBr em *M. smegmatis* pelo método do brometo de etídio em microplaca de 96 poços

O transporte de EtBr nas estirpes de *M. smegmatis* foi inicialmente avaliado através do método do brometo de etídio em microplaca de 96 poços (80). Este método, adaptado no decorrer da elaboração deste trabalho a partir do método do brometo de etídio em placa (81), permite o rastreio da actividade de bombas de efluxo bacterianas, e baseia-se na premissa de que a concentração mínima de EtBr presente no meio de cultura líquido, para a qual as bactérias depositadas no poço apresentam fluorescência, corresponde ao limite máximo de extrusão deste fluorocromo (80, 144).

Da exposição inicial das estirpes de *M. smegmatis* a concentrações crescentes de EtBr (Figura III.1), foi possível observar que a estirpe XZL1675 ($\Delta lfrA$) fluoresceu a uma concentração 0.125 mg/L de EtBr, inferior à registada para a estirpe selvagem mc²155, de 0.25 mg/L. Esta redução no valor da concentração para a qual se detecta fluorescência, indica uma diminuição da actividade de extrusão originada pela inactivação da bomba de efluxo. Em relação à estirpe XZL1720 ($\Delta lfrR$), esta fluoresceu a uma concentração 0.5 mg/L de EtBr, superior à determinada para mc²155. A

expressão constitutiva da LfrA nesta estirpe como resultado da deleção do repressor LfrR poderá ser responsável pelo resultado obtido. A emissão de fluorescência nas estirpes MN01 ($\Delta mspA$) e ML10 ($\Delta mspA \Delta mspC$), teve o seu início a uma concentração de 0.5 mg/L de EtBr, superior à observada na estirpe parental SMR5, de 0.25 mg/L. Este resultado poderá ser consequência de um decréscimo da taxa de influxo de EtBr devido à deleção das porinas, e em particular da MspA, uma vez que não se registou nenhuma diferença na fluorescência emitida por este mutante (MN01) e o mutante com a dupla deleção de MspA e MspC (ML10).

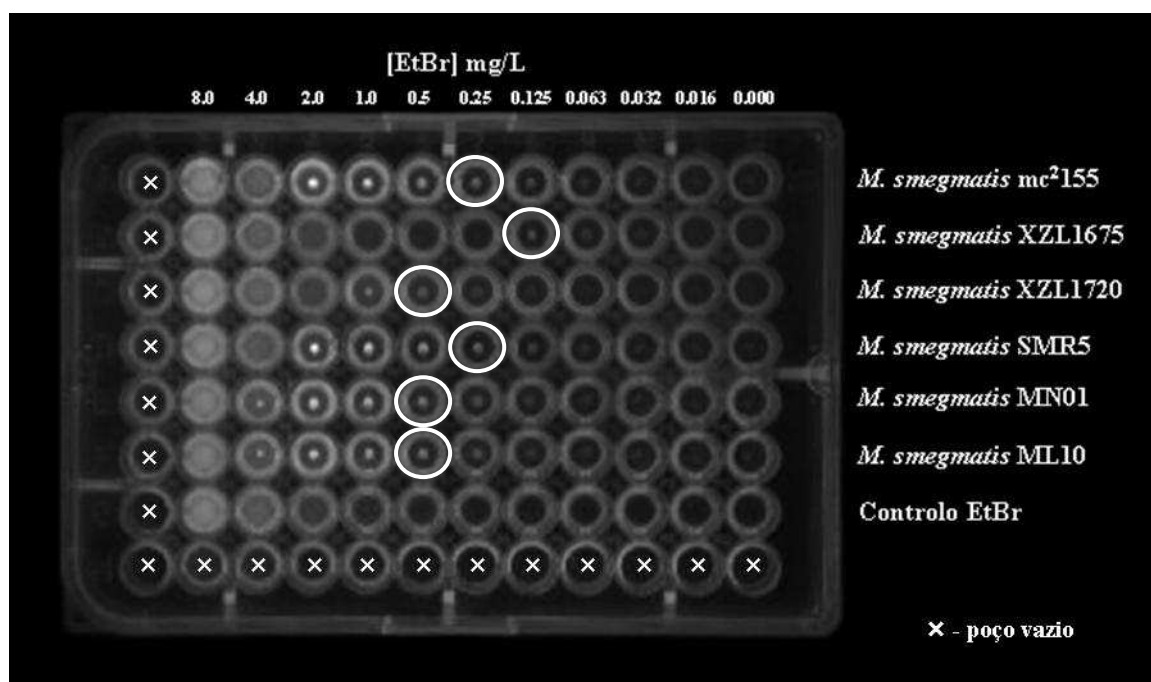


Figura III.1. Fluorescência exibida pelas estirpes de *M. smegmatis*, no método do brometo de etídio em microplaca de 96 poços. Fluorescência observada no transiluminador Molecular Imager Gel Doc XR System. Os círculos brancos à volta dos poços indicam o início da fluorescência. As estirpes mc²155 e SMR5 fluorescem a uma concentração de 0.25 mg/L de EtBr; as estirpes XZL1720, MN01 e ML10 fluorescem a uma concentração de 0.5 mg/L de EtBr; a estirpe XZL1675 fluoresce a uma concentração de 0.125 mg/L de EtBr.

Estes resultados são concordantes com os obtidos para a determinação das CMI's de EtBr para estirpes de *M. smegmatis* (Tabela III.1), onde se registou um aumento da susceptibilidade a este fluorocromo pela deleção da bomba de efluxo LfrA, e uma

redução da mesma, na ausência da porina MspA, reforçando, deste modo, os resultados anteriores, e colocando a hipótese de o EtBr entrar nas células de *M. smegmatis* pela porina MspA e ser extrusado preferencialmente pela bomba de efluxo LfrA.

2.2. Estudo do transporte de EtBr em *M. smegmatis* pelo método fluorimétrico semi-automático

Os métodos anteriores permitem avaliar a susceptibilidade de cada estirpe ao EtBr, quer do ponto de vista de acumulação interna, quer de inibição da replicação, e são uma medida indirecta da capacidade de transporte deste fluoróforo.

Tendo sido detectadas alterações, pelos métodos anteriores, no influxo e efluxo de EtBr como consequência provável da deleção das porinas MspA e MspC, e da bomba de efluxo LfrA e do seu repressor LfrR, respectivamente, foram então realizados estudos mais aprofundados e sobretudo numa abordagem directa, sobre o transporte deste fluorocromo através da parede celular de *M. smegmatis*. Para tal, foi utilizado o método fluorimétrico semi-automático em tempo real, recorrendo à utilização do termociclador em tempo real Rotor-Gene™ 3000 (80, 108, 143).

2.2.1. Estudo do influxo de EtBr em *M. smegmatis* pelo método fluorimétrico semi-automático

A análise inicial do influxo de EtBr em *M. smegmatis*, pelo método fluorimétrico semi-automático em tempo real, foi efectuada através de ensaios de acumulação, onde as estirpes MN01 e ML10, deletadas para porinas, e a sua estirpe parental SMR5 foram expostas a concentrações crescentes deste fluorocromo, com o objectivo de avaliar a taxa de entrada de EtBr nas células micobacterianas, durante um período de 60 minutos. O objectivo destes ensaios é a determinação da concentração de EtBr a partir da qual se começa a detectar acumulação nas células. A concentração imediatamente abaixo será a concentração para a qual as células são capazes de manter um equilíbrio entre a sua entrada por difusão passiva e a sua extrusão pelos sistemas de efluxo intrínsecos.

Os resultados da detecção fluorimétrica da acumulação das diversas concentrações de EtBr nas estirpes SMR5, MN01 e ML10, podem ser observados, respectivamente, nas Figuras III.2, III.3 e III.4.

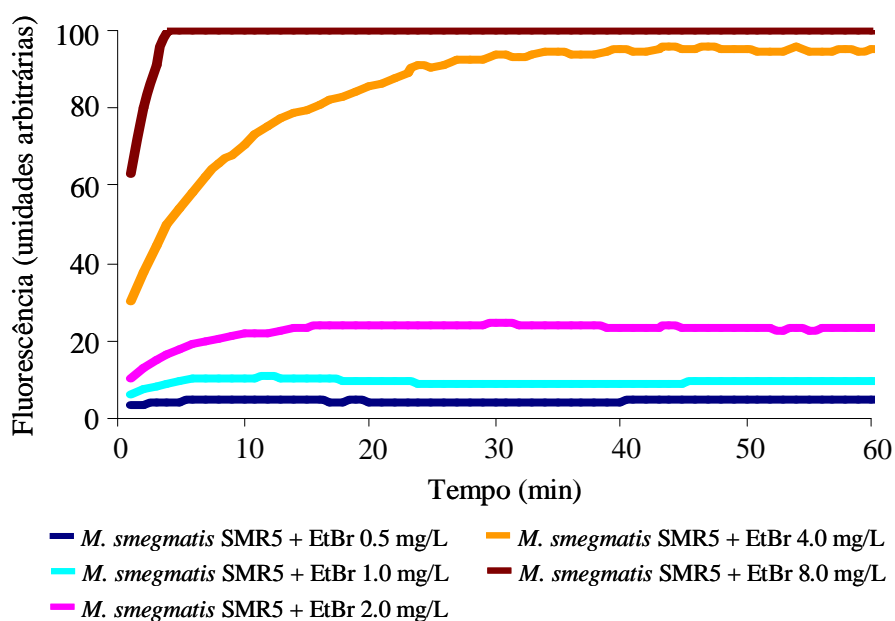


Figura III.2. Ensaio de acumulação em *M. smegmatis* SMR5 com concentrações crescentes de EtBr (0.5 - 8.0 mg/L). Os resultados apresentados correspondem à média aritmética dos valores obtidos em três ensaios distintos.

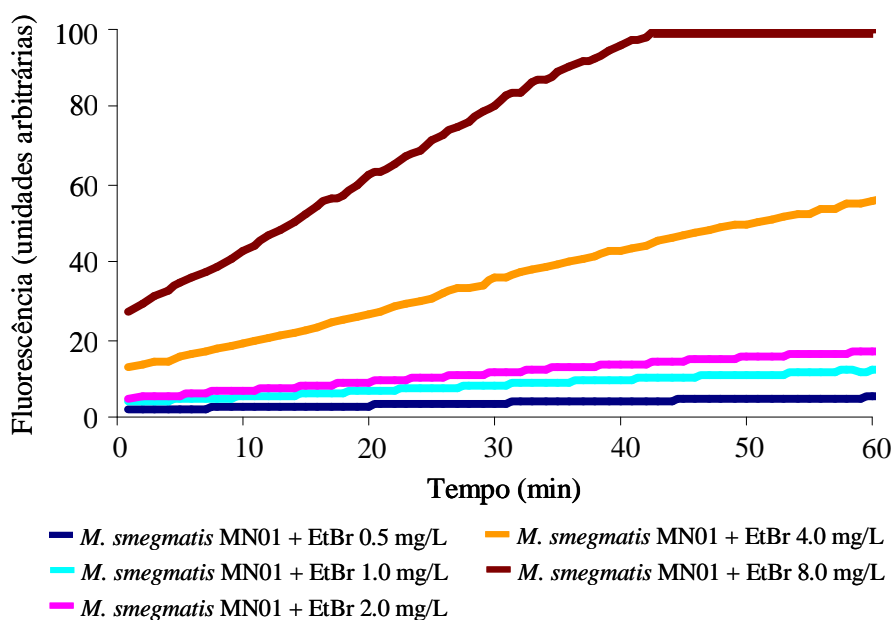


Figura III.3. Ensaio de acumulação em *M. smegmatis* MN01 ($\Delta mspA$) com concentrações crescentes de EtBr (0.5 - 8.0 mg/L). Os resultados apresentados correspondem à média aritmética dos valores obtidos em três ensaios distintos.

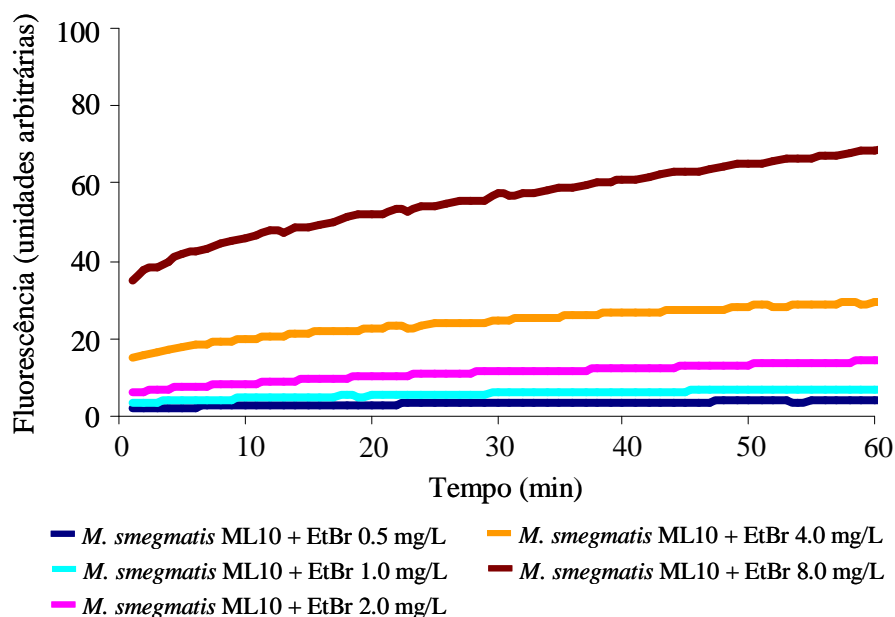


Figura III.4. Ensaio de acumulação em *M. smegmatis* ML10 ($\Delta mspA \Delta mspC$) com concentrações crescentes de EtBr (0.5 – 8.0 mg/L). Os resultados apresentados correspondem à média aritmética dos valores obtidos em três ensaios distintos.

Na presença de glucose e incubação a 37°C, de modo a maximizar o efluxo, a acumulação de EtBr na estirpe SMR5 (Figura III.2) teve o seu início a uma concentração de 1 mg/L. Esta concentração de EtBr corresponde à capacidade de extrusão dos sistemas intrínsecos de efluxo. Nas estirpes mutantes MN01 ($\Delta mspA$) e *M. ML10* ($\Delta mspA \Delta mspC$) observou-se um aumento desta concentração para 2 e 4 mg/L, respectivamente, como se pode observar nas Figuras III.3 e III.4. De notar igualmente que, para as concentrações de EtBr mais elevadas, 4.0 mg/L e 8.0 mg/L, o equilíbrio entre o influxo e o efluxo é atingido gradualmente mais tarde para as três estirpes em estudo (não sendo sequer atingido aos 60 minutos para a estirpe ML10) (Figura III.2, III.3 e III.4). Esta diminuição da taxa de acumulação de EtBr poderá ser consequência da deleção das porinas, uma vez que estes sistemas proteicos, nomeadamente a MspA, estão descritos como sendo a principal via de entrada para moléculas hidrofílicas em *M. smegmatis* (91, 128). Da análise destes resultados é possível concluir que a concentração de 1 mg/L de EtBr é aquela que pode ser usada como limite inferior de acumulação para as três estirpes.

Com o objectivo de verificar se o decréscimo da acumulação de EtBr nas estirpes mutantes MN01 e ML10, era resultante de um sistema de efluxo activo ou consequência da redução da permeabilidade da parede celular devido à deleção das porinas, foram realizados ensaios de acumulação de EtBr a 1 mg/L na presença dos IBEs TZ, CPZ, VP e CCCP a 1/2 da CMI, de forma a assegurar que o resultado observado não resulta de uma alteração na viabilidade celular, mas sim, que este se deve exclusivamente ao efeito do IBE sobre as bombas de efluxo.

Os resultados da acumulação de EtBr na presença dos IBEs nas estirpes SMR5, MN01 e ML10, podem observados, respectivamente, nas Figuras III.5, III.6 e III.7.

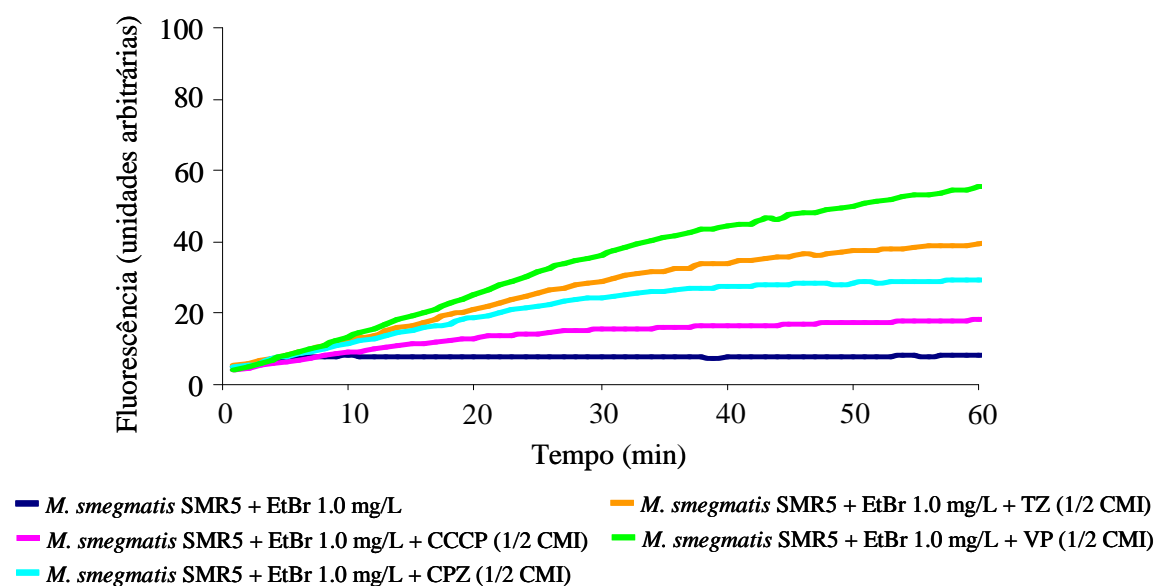


Figura III.5. Efeito dos IBEs a 1/2 da CMI na acumulação de 1 mg/L de EtBr em *M. smegmatis* SMR5. Os resultados apresentados correspondem à média aritmética dos valores obtidos em três ensaios distintos.

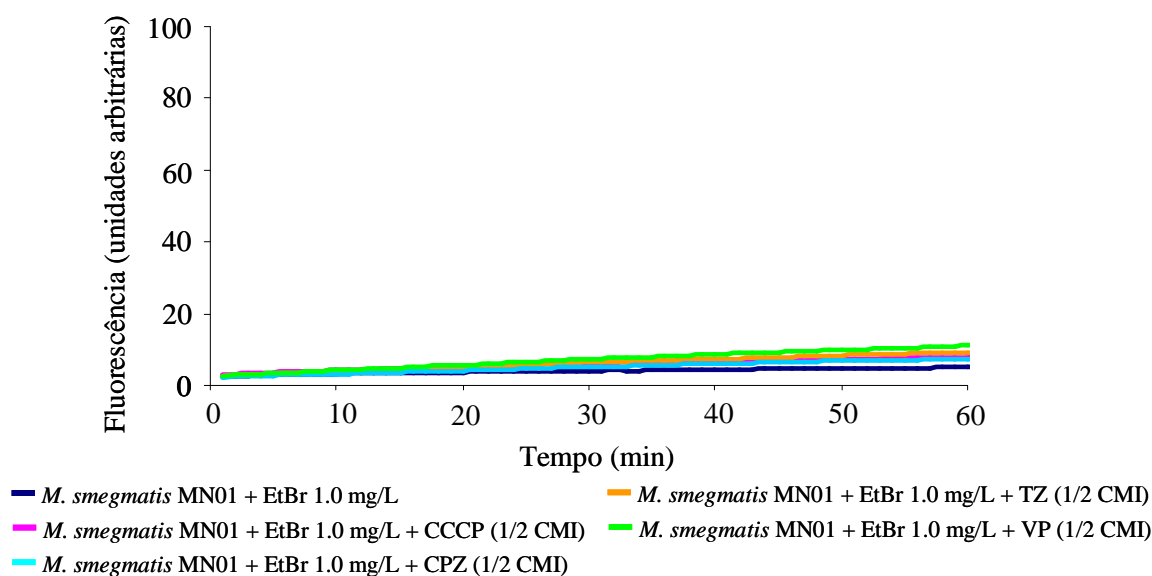


Figura III.6. Efeito dos IBEs a $\frac{1}{2}$ da CMI na acumulação de 1 mg/L de EtBr em *M. smegmatis* MN01 ($\Delta mspA$). Os resultados apresentados correspondem à média aritmética dos valores obtidos em três ensaios distintos.

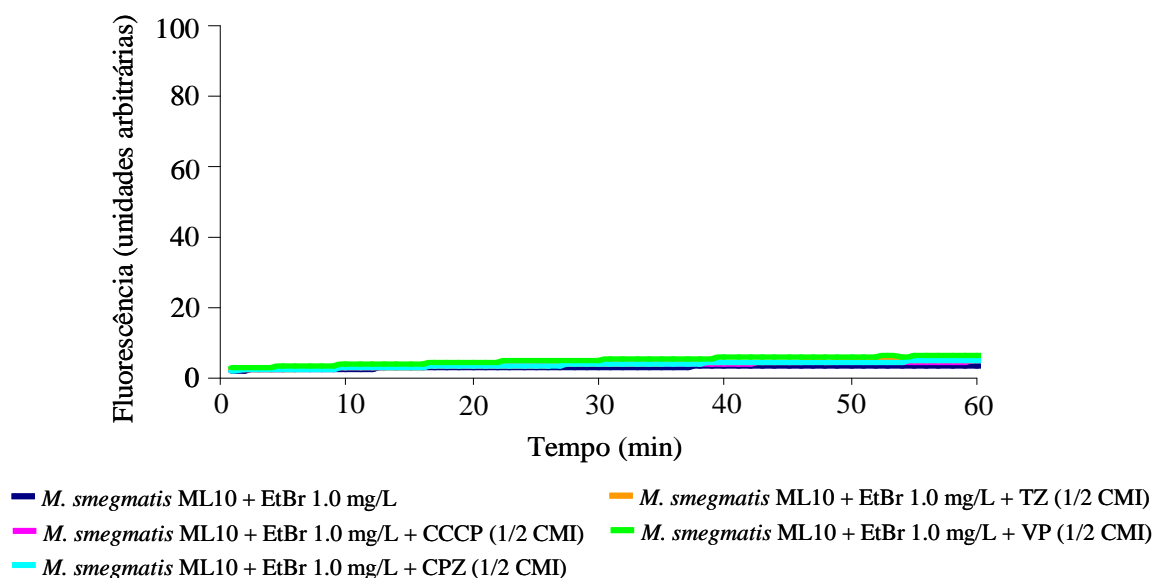


Figura III.7. Efeito dos IBEs a $\frac{1}{2}$ da CMI na acumulação de 1 mg/L de EtBr em *M. smegmatis* ML10 ($\Delta mspA \Delta mspC$). Os resultados apresentados correspondem à média aritmética dos valores obtidos em três ensaios distintos.

Nas estirpes MN01 e ML10 (figuras III.6 e III.7) não foi detectado qualquer aumento da acumulação de EtBr na presença dos IBEs testados, tendo esta sido apenas observada

para a estirpe parental SMR5 (figura III.5). De entre os IBEs utilizados, o VP foi o inibidor que demonstrou o maior efeito na redução da extrusão de EtBr.

Estes resultados excluem, assim, a possibilidade da diminuição da acumulação de EtBr nas estirpes MN01 e ML10 ser originada por um sistema de efluxo activo, sugerindo claramente uma relação entre a redução da permeabilidade da parede celular das estirpes mutantes para as porinas, com a acumulação do EtBr, estabelecendo-se a MspA como a principal via de entrada na célula para este fluorocromo (91, 128).

2.2.2. Estudo do efluxo de EtBr em *M. smegmatis* pelo método fluorimétrico semi-automático

Para a análise do efluxo de EtBr em *M. smegmatis*, foram utilizadas as estirpes XZL1675 e XZL1720, deletadas, respectivamente, para a bomba de efluxo LfrA e para o seu repressor, LfrR, e a estirpe selvagem mc²155. Estas estirpes foram inicialmente expostas a concentrações crescentes de EtBr, de forma a avaliar a capacidade de extrusão, e a acumulação de EtBr foi detectada por fluorimetria em tempo real, durante o período de 60 minutos.

Nas Figuras III.8, III.9 e III.10 podem ser observados, respectivamente, os resultados dos ensaios de acumulação de EtBr nas estirpes mc²155, XZL1675 e XZL1720.

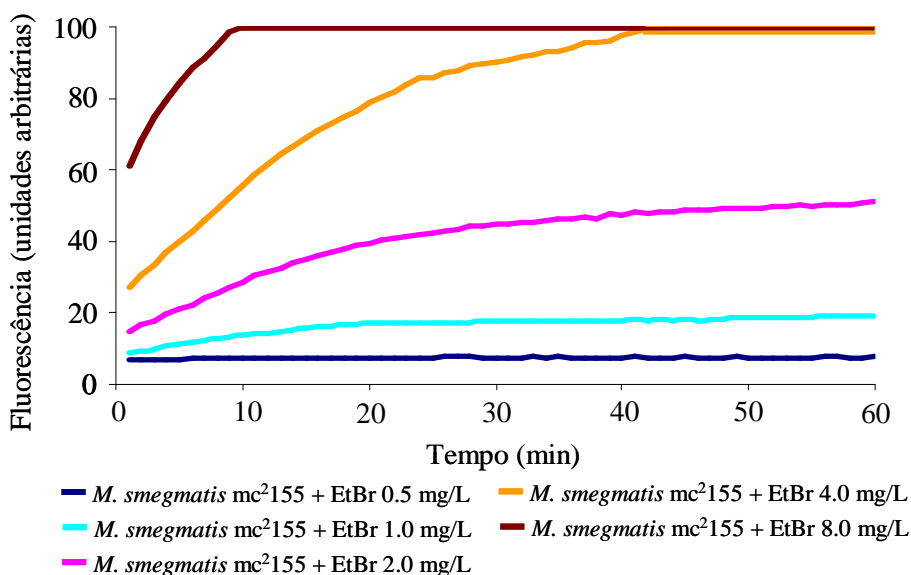


Figura III.8. Ensaio de acumulação em *M. smegmatis* mc²155 com concentrações crescentes de EtBr (0.5 - 8.0 mg/L). Os resultados apresentados correspondem à média aritmética dos valores obtidos em três ensaios distintos.

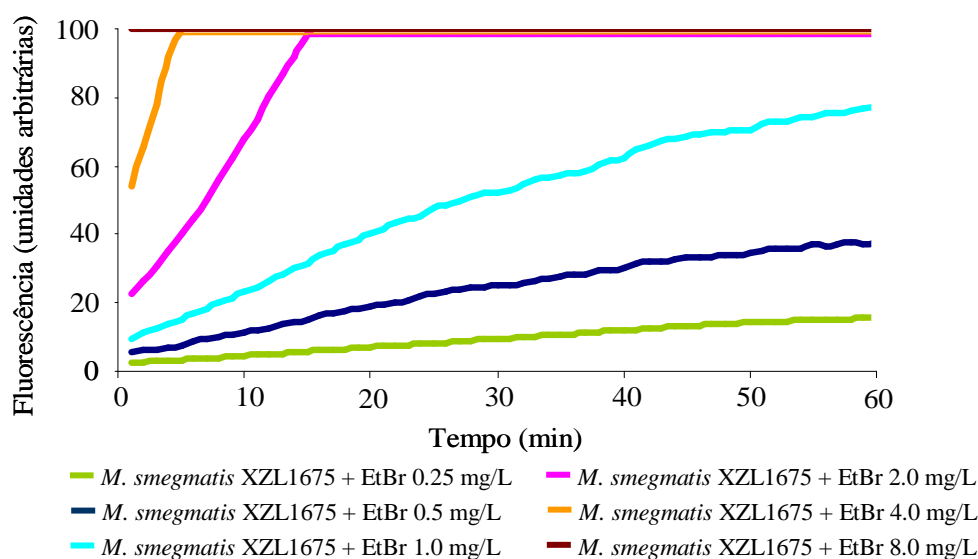


Figura III.9. Ensaio de acumulação em *M. smegmatis* XZL1675 ($\Delta lfrA$) com concentrações crescentes de EtBr (0.25 - 8.0 mg/L). Os resultados apresentados correspondem à média aritmética dos valores obtidos em três ensaios distintos.

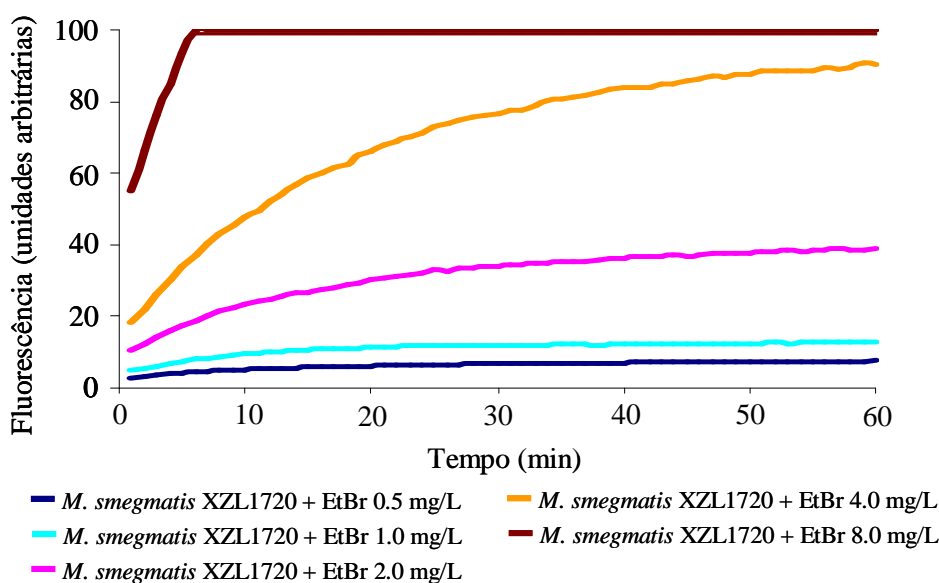


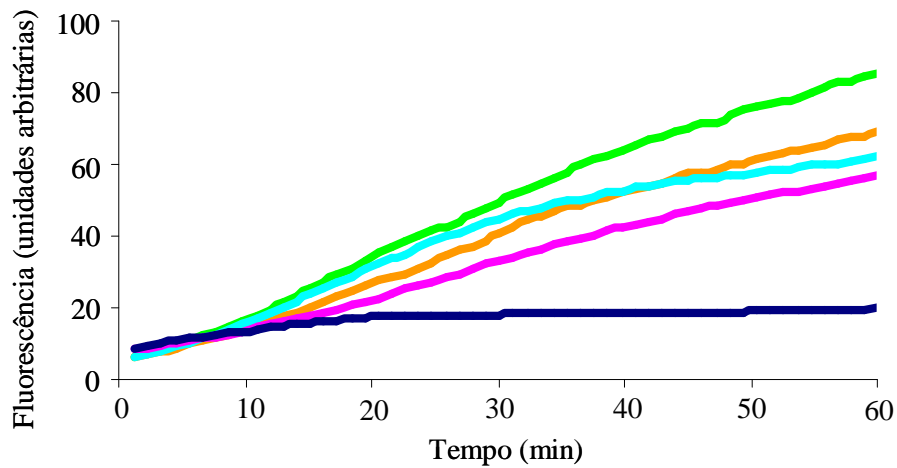
Figura III.10. Ensaio de acumulação em *M. smegmatis* XZL1720 ($\Delta lfrR$) com concentrações crescentes de EtBr (0.5 - 8.0 mg/L). Os resultados apresentados correspondem à média aritmética dos valores obtidos em três ensaios distintos.

Em relação à estirpe mutante deletada para a bomba de efluxo LfrA, XZL1675 (figura III.9), a acumulação de EtBr iniciou-se a uma concentração de 0.25 mg/L. Visto

a acumulação de EtBr na estirpe selvagem mc²155 (figura III.8) ter tido início a uma concentração de 1 mg/L, estes resultados, mais uma vez, demonstram um aumento da susceptibilidade da estirpe mutante para o EtBr devido a uma diminuição da actividade de efluxo causada pela inactivação desta bomba de efluxo. No caso da estirpe mutante XZL1720 (figura III.10), com a deleção do repressor LfrR a acumulação de EtBr teve o seu início a uma concentração de 2 mg/L, concentração esta mais elevada que a observada para a estirpe selvagem mc²155. Como referido anteriormente, estes resultados podem dever-se à expressão constitutiva da LfrA nesta estirpe como consequência da deleção do repressor LfrR (18, 70). Estes resultados estão de acordo aos previamente reportados na literatura, descrevendo a LfrA como o principal sistema de efluxo envolvido na extrusão de EtBr (70, 73, 116, 134).

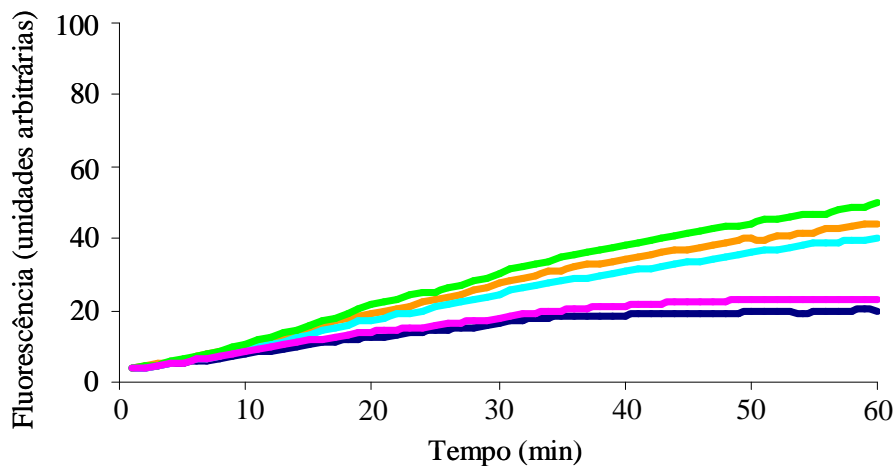
De modo a avaliar o efeito dos IBEs na extrusão de EtBr, foram efectuados ensaios de acumulação deste fluorocromo na presença dos inibidores TZ, CPZ, VP e CCCP. Para as estirpes mc²155 e XZL1720, a concentração de EtBr utilizada como limite inferior de acumulação correspondeu a 1.0 mg/L. Para a estirpe XZL1675, de forma a se poder validar o ensaio comparativo, a concentração limite seleccionada do fluorocromo foi de 0.5 mg/L, uma vez que na presença de concentrações superiores de EtBr esta estirpe apresenta uma acumulação de fluorescência elevada (Figura III.9). A concentração dos IBEs, seleccionada para estes ensaios, correspondeu a ½ da CMI.

Os resultados da acumulação de EtBr na presença dos IBEs nas estirpes mc²155, XZL1675 e XZL1720, podem observados, respectivamente, nas Figuras III.11, III.12 e III.13.



- *M. smegmatis* mc²155 + EtBr 1.0 mg/L
- *M. smegmatis* mc²155 + EtBr 1.0 mg/L + TZ (1/2 CMI)
- *M. smegmatis* mc²155 + EtBr 1.0 mg/L + CCCP (1/2 CMI)
- *M. smegmatis* mc²155 + EtBr 1.0 mg/L + VP (1/2 CMI)
- *M. smegmatis* mc²155 + EtBr 1.0 mg/L + CPZ (1/2 CMI)

Figura III.11. Efeito dos IBEs a 1/2 da CMI na acumulação de 1 mg/L de EtBr em *M. smegmatis* mc²155. Os resultados apresentados correspondem à média aritmética dos valores obtidos em três ensaios distintos.



- *M. smegmatis* XZL1675 + EtBr 0.5 mg/L
- *M. smegmatis* XZL1675 + EtBr 0.5 mg/L + TZ (1/2 CMI)
- *M. smegmatis* XZL1675 + EtBr 0.5 mg/L + CCCP (1/2 CMI)
- *M. smegmatis* XZL1675 + EtBr 0.5 mg/L + VP (1/2 CMI)
- *M. smegmatis* XZL1675 + EtBr 0.5 mg/L + CPZ (1/2 CMI)

Figura III.12. Efeito dos IBEs a 1/2 da CMI na acumulação de 0.5 mg/L de EtBr em *M. smegmatis* XZL1675 (Δ lfrA). Os resultados apresentados correspondem à média aritmética dos valores obtidos em três ensaios distintos.

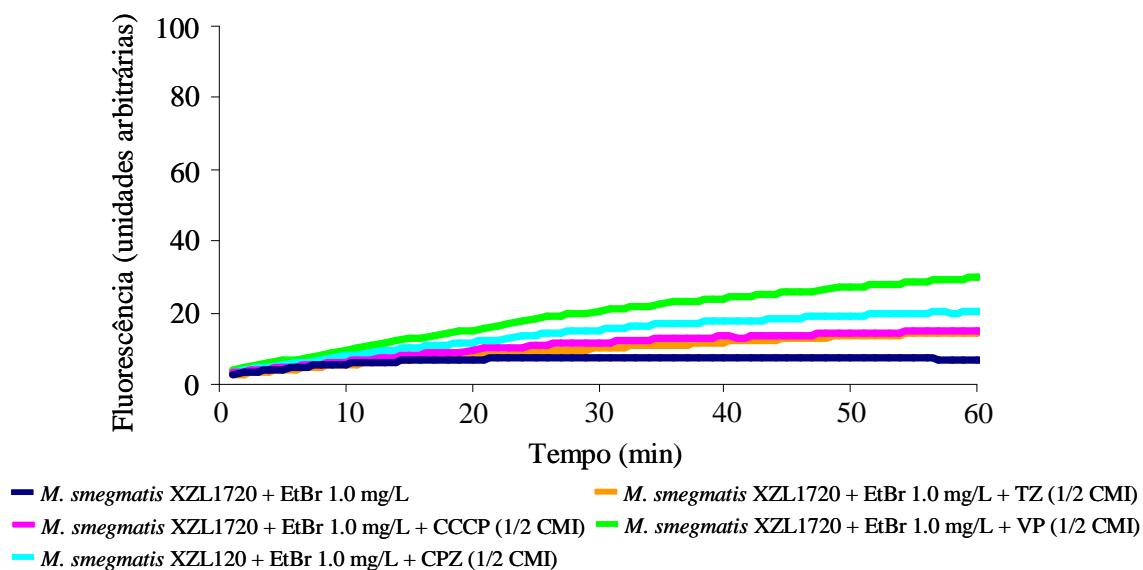


Figura III.13. Efeito dos IBEs a $\frac{1}{2}$ da CMI na acumulação de 1 mg/L de EtBr em *M. smegmatis* XZL1720 (Δ *lfrR*). Os resultados apresentados correspondem à média aritmética dos valores obtidos em três ensaios distintos.

Como se pode observar nas Figuras III.11, III.12, as estirpes mc²155 e XZL1675 na presença dos IBEs apresentaram um incremento na acumulação de EtBr. O inibidor mais eficiente neste aumento, em ambas as estirpes, foi o VP, secundado pelas fenotiazinas, CPZ e TZ. Na estirpe XZL1720 (Figura III.13), foi registado apenas um ligeiro efeito na acumulação de EtBr na presença dos inibidores, tendo sido o VP, o que demonstrou a maior acção. Comparativamente à estirpe mc²155, este efeito não foi tão evidente nas estirpes mutantes o que, uma vez mais, corrobora a importância da bomba LfrA no efluxo de EtBr em *M. smegmatis*.

Assim, estes resultados demonstram que *M. smegmatis*, na ausência da bomba de efluxo LfrA, possui uma maior dificuldade na extrusão de EtBr, e que a deleção do repressor LfrR claramente promove um aumento da actividade de efluxo deste fluorocromo.

Com o intuito de confirmar se o efeito dos IBEs na acumulação de EtBr foi devido à inibição dos sistemas de extrusão, foram realizados ensaios de efluxo de EtBr para as estirpes mc²155, XZL1675 e XZL1720 (Figuras III.14, III.15 e III.16).

Estes ensaios permitem visualizar o efluxo ao longo do tempo (30 minutos), comparando a mesma estirpe na presença e ausência de IBEs. Procura-se nestes ensaios

proporcionar às células condições ótimas de efluxo (37°C e 0.4% de glucose) de forma a potenciar a visualização dos efeitos inibitórios dos IBEs e comparar capacidades de efluxo entre estirpes.

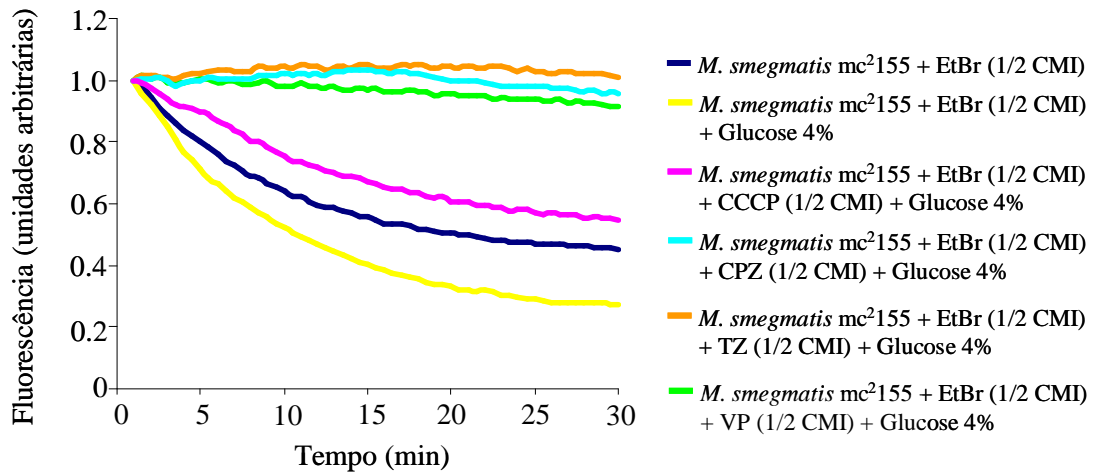


Figura III.14. Efeito dos IBEs no efluxo de EtBr (1/2 da CMI) em *M. smegmatis* mc²155. Os resultados apresentados correspondem à média aritmética dos valores obtidos em três ensaios distintos.

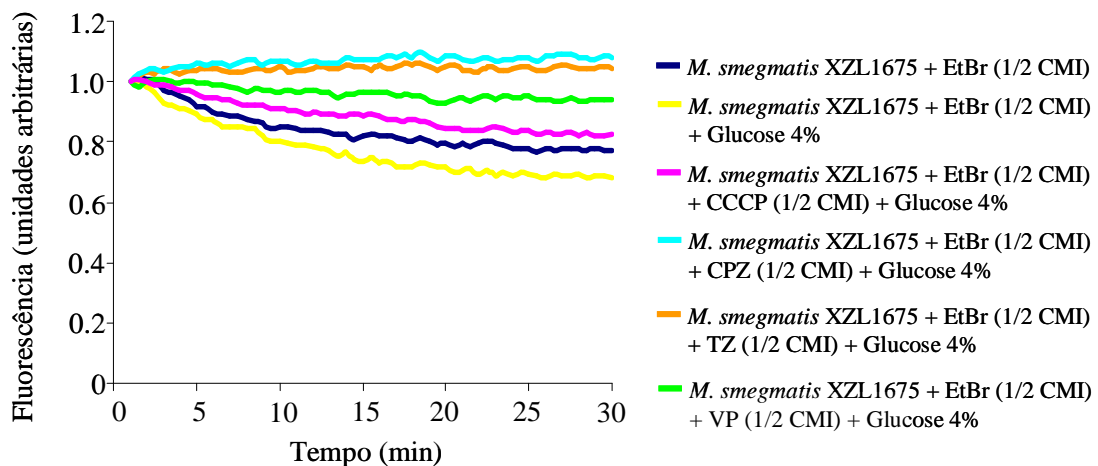


Figura III.15. Efeito dos IBEs no efluxo de EtBr (1/2 da CMI) em *M. smegmatis* XZL1675 (Δ *ifrA*). Os resultados apresentados correspondem à média aritmética dos valores obtidos em três ensaios distintos.

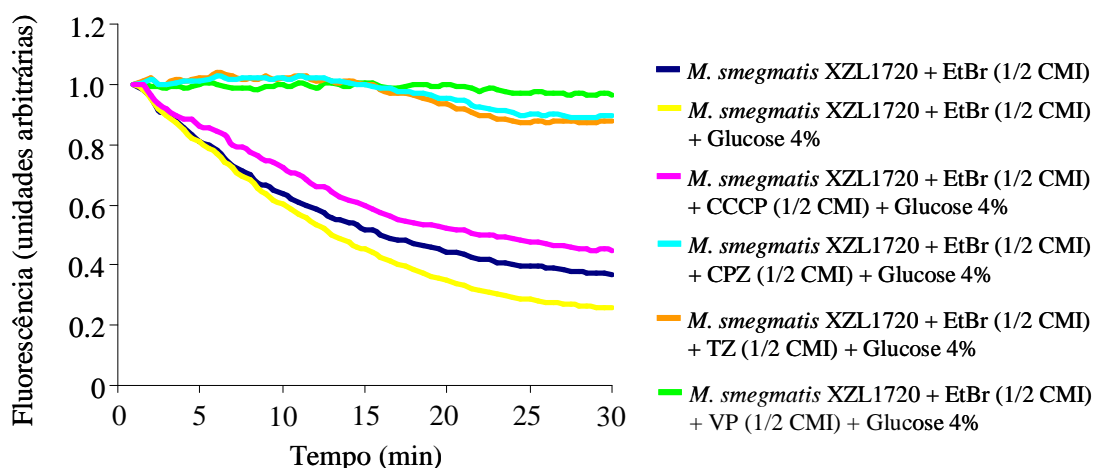


Figura III.16. Efeito dos IBEs no efluxo de EtBr (1/2 da CMI) em *M. smegmatis* XZL1720 ($\Delta lfrR$). Os resultados apresentados correspondem à média aritmética dos valores obtidos em três ensaios distintos.

Os IBEs VP, CPZ e TZ provocaram uma redução drástica na actividade de efluxo de EtBr nas estirpes mc²155 e XZL1720 (Figuras III.14 e III.16), evidenciando deste modo, a sua participação activa na inibição dos sistemas de extrusão.

Na estirpe mutante XZL1675, a presença dos inibidores deu origem a apenas um ligeiro decréscimo na já diminuída actividade de efluxo de EtBr, demonstrando deste modo o papel importante da bomba de efluxo LfrA na extrusão deste composto em *M. smegmatis*.

O CCCP, comparativamente aos restantes inibidores, exibiu um reduzido efeito na inibição da extrusão de EtBr.

3. Determinação da susceptibilidade das estirpes de *M. smegmatis* aos antibióticos na presença de IBEs

Após a monitorização do influxo e efluxo de EtBr nas diferentes estirpes de *M. smegmatis* estudadas, foi realizada a determinação da CMI, descrita no ponto 2.1 do capítulo Materiais e Métodos, para os antibióticos STR, INH, RIF, ETB, AMK, CIP, CLT e ERY, na presença dos IBEs TZ, CPZ, VP e CCCP, a 1/2 da sua CMI, de forma correlacionar a resistência aos antibióticos e a actividade de efluxo e influxo de EtBr

detectada, uma vez que este fármacos utilizam canais semelhantes para entrar e sair das células micobacterianas (70, 73, 116, 134).

Os valores de CMI, obtidos neste estudo, dos antibióticos STR, INH, RIF, ETB, AMK, CIP, CLT e ERY na presença dos IBEs TZ, CPZ, VP e CCCP, para as estirpes de *M. smegmatis*, bem como os resultados das CMIs destes antibióticos na ausência dos IBEs seleccionados, previamente descritos no ponto 1.1 deste capítulo, encontram-se sumariados nas Tabelas III.3 a III.10.

Para a garantir que o aumento da susceptibilidade de *M. smegmatis* aos antibióticos na presença dos IBEs, era devida exclusivamente a uma acção sinérgica entre ambos, e não, através da inibição da replicação micobacteriana, os inibidores em estudo foram utilizados a uma concentração correspondente a ½ da CMI.

O aumento da susceptibilidade de *M. smegmatis* aos antibióticos na presença dos inibidores foi considerada significativa, quando se registou uma redução superior ou igual a 4 vezes, do valor da CMI na ausência dos inibidores.

Tabela III.3. Efeito dos IBEs na CMI da STR para as estirpes de *M. smegmatis* estudadas.

Estirpe	CMI mg/L				
	STR	STR+TZ	STR+CPZ	STR+VP	STR+CCCP
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	0.5	0.125	0.125	0.25	0.5
<i>M. smegmatis</i> XZL1720	0.5	0.25	0.063	0.125	0.5
<i>M. smegmatis</i> XZL1675	0.5	0.125	0.032	0.25	0.25
<i>M. smegmatis</i> SMR5	>256	>256	>256	>256	>256
<i>M. smegmatis</i> MN01	>256	>256	>256	>256	>256
<i>M. smegmatis</i> ML10	>256	>256	>256	>256	>256

Legenda: CMI, concentração mínima inibitória; STR, estreptomicina; TZ, tioridazina; CPZ, clorpromazina; VP, verapamil, CCCP, carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona; IBE, inibidor de bombas de efluxo. Os resultados a negrito representam uma redução significativa (pelo menos 4 vezes) da CMI na presença de um IBE.

Tabela III.4. Efeito dos IBEs na CMI da INH para as estirpes de *M. smegmatis* estudadas.

Estirpe	CMI mg/L				
	INH	INH +TZ	INH +CPZ	INH +VP	INH +CCCP
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	8	8	8	8	8
<i>M. smegmatis</i> XZL1720	8	4	4	4	4
<i>M. smegmatis</i> XZL1675	4	4	4	4	4
<i>M. smegmatis</i> SMR5	128	128	128	128	128
<i>M. smegmatis</i> MN01	128	128	128	128	128
<i>M. smegmatis</i> ML10	128	128	128	128	128

Legenda: CMI, concentração mínima inibitória; INH, isoniazida; TZ, tioridazina; CPZ, clorpromazina; VP, verapamil, CCCP, carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona; IBE, inibidor de bombas de efluxo. Os resultados a negrito representam uma redução significativa (pelo menos 4 vezes) da CMI na presença de um IBE.

Tabela III.5. Efeito dos IBEs na CMI da RIF para as estirpes de *M. smegmatis* estudadas.

Estirpe	CMI mg/L				
	RIF	RIF +TZ	RIF +CPZ	RIF +VP	RIF +CCCP
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	4	2	1	2	2
<i>M. smegmatis</i> XZL1720	0.5	0.125	0.125	0.25	0.5
<i>M. smegmatis</i> XZL1675	0.5	0.125	0.125	0.125	0.5
<i>M. smegmatis</i> SMR5	4	2	1	2	2
<i>M. smegmatis</i> MN01	8	4	2	4	4
<i>M. smegmatis</i> ML10	8	4	2	4	4

Legenda: CMI, concentração mínima inibitória; RIF, rifampicina; TZ, tioridazina; CPZ, clorpromazina; VP, verapamil, CCCP, carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona; IBE, inibidor de bombas de efluxo. Os resultados a negrito representam uma redução significativa (pelo menos 4 vezes) da CMI na presença de um IBE.

Tabela III.6. Efeito dos IBEs na CMI do EMB para as estirpes de *M. smegmatis* estudadas.

Estirpe	CMI mg/L				
	EMB	EMB+TZ	EMB+CPZ	EMB+VP	EMB+CCCP
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	1	1	1	1	1
<i>M. smegmatis</i> XZL1720	1	1	1	1	1
<i>M. smegmatis</i> XZL1675	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
<i>M. smegmatis</i> SMR5	1	1	1	1	1
<i>M. smegmatis</i> MN01	1	1	1	1	1
<i>M. smegmatis</i> ML10	1	1	1	1	1

Legenda: CMI, concentração mínima inibitória; EMB, etambutol; TZ, tioridazina; CPZ, clorpromazina; VP, verapamil, CCCP, carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona; IBE, inibidor de bombas de efluxo. Os resultados a negrito representam uma redução significativa (pelo menos 4 vezes) da CMI na presença de um IBE.

Tabela III.7. Efeito dos IBEs na CMI da AMK para as estirpes de *M. smegmatis* estudadas.

Estirpe	CMI mg/L				
	AMK	AMK+TZ	AMK+CPZ	AMK+VP	AMK+CCCP
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	0.5	0.063	0.125	0.125	0.25
<i>M. smegmatis</i> XZL1720	0.5	0.063	0.063	0.125	0.25
<i>M. smegmatis</i> XZL1675	0.5	0.063	0.063	0.125	0.25
<i>M. smegmatis</i> SMR5	0.5	0.063	0.125	0.125	0.25
<i>M. smegmatis</i> MN01	0.5	0.125	0.125	0.125	0.25
<i>M. smegmatis</i> ML10	0.5	0.25	0.25	0.25	0.5

Legenda: CMI, concentração mínima inibitória; AMK, amicacina; TZ, tioridazina; CPZ, clorpromazina; VP, verapamil, CCCP, carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona; IBE, inibidor de bombas de efluxo. Os resultados a negrito representam uma redução significativa (pelo menos 4 vezes) da CMI na presença de um IBE.

Tabela III.8. Efeito dos IBEs na CMI da CIP para as estirpes de *M. smegmatis* estudadas.

Estirpe	CMI mg/L				
	CIP	CIP+TZ	CIP+CPZ	CIP+VP	CIP+CCCP
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	0.25	0.063	0.063	0.063	0.125
<i>M. smegmatis</i> XZL1720	0.25	0.063	0.063	0.063	0.125
<i>M. smegmatis</i> XZL1675	0.125	0.032	0.063	0.063	0.125
<i>M. smegmatis</i> SMR5	0.25	0.063	0.063	0.063	0.125
<i>M. smegmatis</i> MN01	0.25	0.063	0.063	0.063	0.125
<i>M. smegmatis</i> ML10	0.25	0.063	0.063	0.063	0.125

Legenda: CMI, concentração mínima inibitória; CIP, ciprofloxacina; TZ, tioridazina; CPZ, clorpromazina; VP, verapamil, CCCP, carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona; IBE, inibidor de bombas de efluxo. Os resultados a negrito representam uma redução significativa (pelo menos 4 vezes) da CMI na presença de um IBE.

Tabela III.9. Efeito dos IBEs na CMI da CLT para as estirpes de *M. smegmatis* estudadas.

Estirpe	CMI mg/L				
	CLT	CLT+TZ	CLT+CPZ	CLT+VP	CLT+CCCP
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	2	0.25	0.25	0.5	1
<i>M. smegmatis</i> XZL1720	2	0.25	0.25	0.5	1
<i>M. smegmatis</i> XZL1675	2	0.25	0.25	0.5	1
<i>M. smegmatis</i> SMR5	2	0.25	0.25	0.5	1
<i>M. smegmatis</i> MN01	8	1	0.5	0.5	4
<i>M. smegmatis</i> ML10	8	1	1	1	4

Legenda: CMI, concentração mínima inibitória; CLT, claritromicina; TZ, tioridazina; CPZ, clorpromazina; VP, verapamil, CCCP, carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona; IBE, inibidor de bombas de efluxo. Os resultados a negrito representam uma redução significativa (pelo menos 4 vezes) da CMI na presença de um IBE.

Tabela III.10. Efeito dos IBEs na CMI da ERY para as estirpes de *M. smegmatis* estudadas.

Estirpe	CMI mg/L				
	ERY	ERY+TZ	ERY+CPZ	ERY+VP	ERY+CCCP
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	32	4	4	8	16
<i>M. smegmatis</i> XZL1720	32	4	4	8	16
<i>M. smegmatis</i> XZL1675	32	4	4	8	16
<i>M. smegmatis</i> SMR5	32	4	4	8	16
<i>M. smegmatis</i> MN01	64	16	8	8	16
<i>M. smegmatis</i> ML10	64	16	8	8	16

Legenda: CMI, concentração mínima inibitória; ERY, eritromicina; TZ, tioridazina; CPZ, clorpromazina; VP, verapamil, CCCP, carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona; IBE, inibidor de bombas de efluxo. Os resultados a negrito representam uma redução significativa (pelo menos 4 vezes) da CMI na presença de um IBE.

Dos dados obtidos, destaca-se a acção dos IBEs TZ, CPZ e VP na redução significativa (≥ 2 diluições, i.e., pelo menos 4 vezes) na CMI para a CLT e ERY em todas as estirpes de *M. smegmatis* em estudo. Este efeito inibitório foi também observado para a AMK na presença dos IBEs anteriormente referidos, nas estirpes de *M. smegmatis* testadas, com a excepção de *M. smegmatis* ML10. A adição de CCCP proveu um aumento significativo da susceptibilidade à ERY nas estirpes MN01 e ML10.

Os IBEs TZ, CPZ e VP promoveram uma redução na resistência das estirpes mc²155, XZL1720, SMR5, MN01 e ML10 à CIP. Na estirpe XZL1675 a diminuição dos valores da CMI para este antibiótico foi apenas verificada na presença de TZ.

Na interacção dos IBEs com a RIF, a CPZ foi o composto que demonstrou o maior efeito inibitório, promovendo uma redução significativa da resistência na totalidade das estirpes de *M. smegmatis* em análise, seguida da TZ, que apresentou uma acção na redução da CMI nas estirpes XZL1720 e XZL1675.

Um incremento na susceptibilidade à STR foi observado nas estirpes mc²155 e XZL1675, na presença de TZ e CPZ, e na estirpe XZL1720 na presença de CPZ e VP.

Estes resultados demonstram a correlação que existe entre os resultados obtidos nos ensaios anteriores para o transporte de EtBr através da parede celular de *M. smegmatis* e o transporte de antibióticos e a sua actividade sobre esta micobactérias. Em particular destaca-se o efeito sobre o transporte das fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e macrólidos, os antibióticos mais eficazes contra MNT.

4. Estudo da acumulação/retenção de [¹⁴C]-eritromicina em *M. smegmatis*

Através dos diversos ensaios efectuados foi possível observar que os inibidores mais efectivos no aumento da susceptibilidade das estirpes de *M. smegmatis* aos diversos fármacos foram a CPZ, TZ e VP, e os antibióticos onde se verificou um maior efeito adjuvante dos IBEs no aumento da susceptibilidade foram a CLT, ERY, CIP e AMK.

Deste modo, o antibiótico seleccionado para a avaliação da sua acumulação/retenção intracelular na presença e ausência dos IBEs que apresentaram uma maior actividade inibitória, através da marcação com um isótopo radioactivo de carbono, foi a ERY.

Como se pode observar na Figura III.17, a presença dos IBEs VP, TZ e CPZ promoveram uma retenção intracelular de [¹⁴C]-eritromicina [¹⁴C]-ERY) em *M. smegmatis* mc²155 na ordem dos 26 a 33% (Tabela III.11). Este resultado apresenta uma concordância com o observado na determinação da CMI de mc²155 para este antibiótico na presença e ausência dos IBEs testados e confirma a acção inibitória destes compostos sobre o efluxo activo dos macrólidos em *M. smegmatis*.

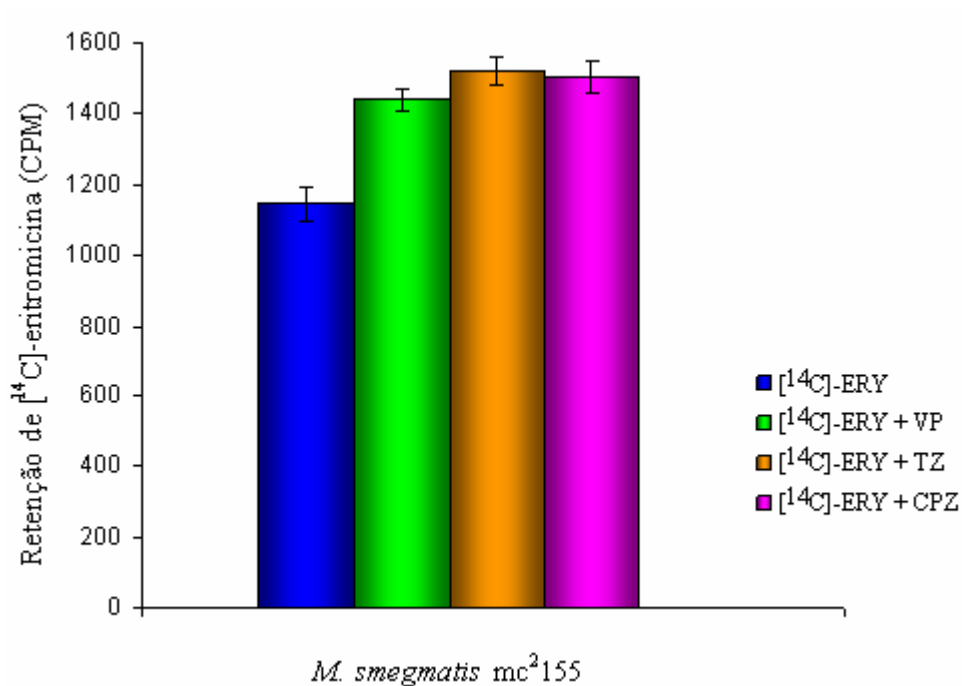


Figura III.17 – Acumulação/retenção de $[^{14}\text{C}]$ -eritromicina ($[^{14}\text{C}]$ -ERY) em *M. smegmatis* mc²¹⁵⁵ na presença e ausência de verapamil (VP), tioridazina (TZ) e clorpromazina (CPZ) a ½ da CMI. Os valores expressos em contagens por minuto (CPM) correspondem à média de três conjuntos de ensaios. As barras de erro indicam o desvio padrão.

Tabela III.11. Aumento da retenção intracelular de $[^{14}\text{C}]$ -ERY em *M. smegmatis* mc²¹⁵⁵ na presença dos IBEs VP, TZ e CPZ a ½ da CMI.

$[^{14}\text{C}]$ -ERY + VP	26%
$[^{14}\text{C}]$ -ERY + TZ	33%
$[^{14}\text{C}]$ -ERY + CPZ	31%

Legenda: $[^{14}\text{C}]$ -ERY, $[^{14}\text{C}]$ -eritromicina; VP, verapamil; TZ, tioridazina; CPZ, clorpromazina. Os valores percentuais foram calculados através do valor médio das contagens por minuto obtidas em três conjuntos de ensaios, em relação à $[^{14}\text{C}]$ -eritromicina retida no frasco controle sem inibidor.

IV - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O aumento da incidência dos casos de tuberculose, a emergência de estirpes multirresistentes de *M. tuberculosis* e o número crescente de infecções por MNT em doentes com SIDA, têm conduzido a inúmeros estudos para a compreensão dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos nestes microrganismos.

A resistência a vários antibacilares de primeira linha como a INH, RIF, PZA, EMB, e a classes de antimicrobianos de segunda linha como fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, tem sido atribuída a mutações específicas em genes alvos ou domínios regulatórios. Neste sentido, uma alteração no gene específico, por mutação, inserção ou deleção, vai alterar a estrutura da proteína alvo, influenciando o grau de susceptibilidade ao fármaco.

No entanto, para além destas alterações genéticas, consideradas como as principais responsáveis por altos níveis de resistência, existem outros mecanismos adicionais que contribuem para a resistência aos antibacilares, como a permeabilidade celular reduzida e os sistemas de extrusão activos, reconhecidos como causas importantes da resistência intrínseca em micobactérias.

Deste modo, procurou-se com este trabalho estudar e avaliar o papel da actividade dos sistemas de efluxo e da redução da permeabilidade na multirresistência aos antimicrobianos em micobactérias, recorrendo à utilização de *M. smegmatis* como modelo genético. Para o efeito, comparámos o transporte de EtBr, um substrato de bombas de efluxo, através da parede celular da estirpe selvagem *M. smegmatis* mc²155 com mutantes de *M. smegmatis* com deleções “in-frame” de genes que codificam para bombas de efluxo ou porinas, na presença e ausência de IBEs.

As estirpes mutantes utilizadas neste estudo foram: (i) XZL1675, uma estirpe derivada de *M. smegmatis* mc²155, deletada no gene *lfrA*, que codifica para LfrA, a principal bomba de efluxo de *M. smegmatis* (70), (ii) XZL1720, uma estirpe derivada de *M. smegmatis* mc²155, deletada no gene *lfrR*, que codifica para LfrR, o repressor de LfrA (70), (iii) SMR5, uma estirpe derivada de *M. smegmatis* mc²155, resistente à estreptomicina devido a uma mutação no gene *rpsL*, presente na proteína ribossómica S12 (115), (iv) MN01, uma estirpe derivada de *M. smegmatis* SMR5, deletada no gene *mshA*, que codifica para MshA, a principal porina de *M. smegmatis* (128), (v) e ML10,

uma estirpe derivada de *M. smegmatis* SMR5, deletada nos genes *mspA* e *mspC*, que codificam para as porinas MspA e MspC, respectivamente (131).

De entre os diversos compostos com actividade inibitória de bombas de efluxo, descritos na literatura, foram seleccionados para este estudo o VP, que actua através do bloqueio dos canais de cálcio, as fenotiazinas TZ e CPZ, que inibem os processos de transporte através da inibição da actividade das ATPases dependentes de cálcio, e o CCCP, um desacoplador de prótons que interfere com a FMP (38, 76).

Sabendo que muitos dos transportadores celulares utilizam as mesmas vias para mediar a entrada e a extrusão de substratos de bombas de efluxo e antibióticos (38, 61), procedemos à correlação dos resultados obtidos com a acção dos IBEs no aumento da susceptibilidade de *M. smegmatis* aos antibacilares STR, INH, RIF, EMB, AMK, CIP, CLT e ERY.

O trabalho foi encetado com a caracterização do perfil das estirpes de *M. smegmatis* aos antibióticos, substratos e inibidores de bombas de efluxo seleccionados, através da determinação das respectivas CMIs. Este passo inicial foi necessário, uma vez que a realização dos ensaios subsequentes requereram a utilização de concentrações sub-inibitórias dos diversos compostos inibidores, correspondentes a $\frac{1}{2}$ das respectivas CMIs, de forma a garantir a viabilidade celular das estirpes estudadas. Os resultados obtidos permitiram também observar que a deleção de *lfrA* conferiu a *M. smegmatis* um aumento da susceptibilidade ao EtBr e aos antibacilares INH, RIF, EMB e CIP, sugerindo uma contribuição deste sistema proteico de extrusão para a resistência intrínseca a estes compostos, como já referido em outros estudos (70, 116), e que a exclusão das porinas MspA e MspC proveu uma ligeira diminuição da susceptibilidade de *M. smegmatis* ao EtBr e aos antibióticos RIF, CLT e ERY.

Com a deleção de MspA e MspC seria expectável observar uma diminuição da susceptibilidade de *M. smegmatis* à INH, EMB, AMK, e CIP, uma vez que devido à sua hidrofobicidade o transporte destes antibióticos para o meio intracelular é realizado preferencialmente através de porinas (61, 91), no entanto, quer com a deleção do gene *mspA*, quer com a deleção simultânea dos genes *mspA* e *mspC*, não se registou nenhuma alteração na resistência de *M. smegmatis* aos antibacilares referidos. Por oposição, esperar-se-ia que a deleção de uma ou várias destas proteínas transmembranares não afecta-se a susceptibilidade de *M. smegmatis* a fármacos como a RIF, CLT e ERY, uma

vez que o influxo de antibióticos hidrofóbicos e de elevadas dimensões moleculares como a RIF, CLT e ERY ocorre preferencialmente por difusão directa através da membrana externa (35, 130). Contudo, como referido anteriormente, com a remoção de MspA e MspC, observou-se um decréscimo na susceptibilidade de *M. smegmatis* à RIF, CLT e ERY.

No sentido de se avaliar a correlação entre estas diminuições de susceptibilidade aos antibióticos com o seu transporte, procedeu-se à avaliação e quantificação do transporte de EtBr em *M. smegmatis* através do método do brometo de etídio em microplaca de 96 poços, desenvolvido no âmbito deste trabalho (80). Este método permite avaliar de forma indirecta o transporte de EtBr, através da fluorescência emitida, resultante da acumulação interna deste fluorocromo nas células depositadas nos poços da microplaca. Da aplicação deste método às estirpes em estudo foi possível observar que: (i) na ausência da LfrA ocorreu uma redução do valor da concentração de EtBr a partir do qual se detecta fluorescência, indicando uma diminuição da actividade de efluxo por inactivação deste sistema de extrusão, (ii) a deleção de *lfrR* promoveu um aumento desta concentração, provavelmente devido à expressão constitutiva da LfrA pela ausência do repressor, (iii) a deleção das porinas, e em especial da MspA, originou um incremento na concentração anteriormente referida, sugerindo uma diminuição da taxa de influxo como consequência da remoção destes sistemas proteicos de influxo. Da análise destes resultados, concordantes com os anteriormente registados para a determinação das CMIs de EtBr para as diferentes estirpes de *M. smegmatis*, foi colocada a hipótese de que o influxo de EtBr seja mediado pela porina MspA e que a sua extrusão seja realizada preferencialmente pela bomba de efluxo LfrA.

O método fluorimétrico semi-automático foi utilizado para testar esta hipótese, uma vez que permite uma avaliação directa da capacidade de transporte do EtBr através da parede celular de *M. smegmatis* (143).

Para a análise do influxo de EtBr, as estirpes mutantes MN01 e ML10 e a sua estirpe parental SMR5 foram inicialmente expostas a concentrações crescentes deste fluorocromo durante um período de 60 minutos, e na presença de glucose e incubação a 37°C, de forma a maximizar o efluxo, com o objectivo de determinar a concentração de EtBr a partir da qual é possível detectar acumulação nas células. O aumento da concentração inicial a partir da qual se detecta acumulação de EtBr em MN01 e ML10,

em relação à estirpe SMR5 aponta uma vez mais, para a deleção das porinas como principal causa do decréscimo da taxa de influxo de EtBr.

De forma a confirmar se a diminuição da acumulação de EtBr foi originada pela redução da permeabilidade devido à deleção das porinas ou resultante da actividade de sistemas de efluxo, foram efectuados ensaios de acumulação de EtBr na presença dos IBEs VP, TZ, CPZ e CCCP a ½ da sua CMI.

A ausência de acumulação de EtBr na presença dos IBEs observada nas estirpes MN01 e ML10, por oposição à registada na estirpe SMR5, excluiu o efluxo como possível responsável pela diminuição da acumulação de EtBr, confirmando, deste modo, o decréscimo da permeabilidade pela deleção das porinas. Estes resultados vão de encontro aos descritos em outros estudos, que estabelecem a MspA como a principal via de entrada de EtBr em *M. smegmatis* (91, 128).

Para o estudo do efluxo de EtBr, as estirpes mutantes XZL1675 e XZL1720, e a estirpe selvagem mc²155, foram expostas a concentrações crescentes de EtBr, nas mesmas condições iniciais utilizadas para a análise do influxo, com objectivo de avaliar a capacidade de extrusão das diferentes estirpes de *M. smegmatis*. O decréscimo da concentração inicial de EtBr observada em XZL1675, por comparação com a estirpe selvagem mc²155, demonstrou, uma vez mais, uma redução da resistência de *M. smegmatis* ao EtBr como consequência da diminuição da actividade de efluxo originada pela deleção da LfrA. Relativamente à estirpe XZL1720, esta apresentou uma concentração inicial de acumulação de EtBr superior à registada em mc²155, sugerindo, novamente, um decréscimo da susceptibilidade de *M. smegmatis* ao EtBr devido à expressão constitutiva de LfrA originada pela deleção do repressor LfrR (18, 70).

A avaliação do efeito dos IBEs no efluxo de EtBr em *M. smegmatis* foi efectuada recorrendo à acumulação deste fluorocromo na presença dos inibidores VP, TZ, CPZ e CCCP a ½ da sua CMI. Nas estirpes mc²155 e XZL1675 observou-se um aumento da acumulação de EtBr promovida pelos IBEs, tendo o VP apresentado maior eficiência na redução do efluxo do fluorocromo na estirpe selvagem, e as fenotiazinas CPZ e TZ em XZL1675. Em XZL1720, a acumulação de EtBr na presença dos inibidores sofreu apenas um ligeiro incremento, potenciado principalmente pelo VP. Estes resultados permitiram verificar que a deleção da bomba de efluxo LfrA confere a *M. smegmatis*

uma maior dificuldade na extrusão de EtBr e que na ausência do repressor desta bomba, o LfrR, a actividade de efluxo deste fluorocromo aumenta.

De modo a confirmar se a inibição dos sistemas de efluxo foi responsável pelo efeito dos IBEs na acumulação de EtBr, observado anteriormente, foram efectuados ensaios de efluxo de EtBr em mc²155, XZL1675 e XZL1720. Em mc²155 e XZL1720 verificou-se um decréscimo acentuado na actividade de efluxo do fluorocromo, na presença dos IBEs VP, CPZ e TZ, e em XZL1675 observou-se apenas uma redução marginal na extrusão de EtBr. Deste modo, os resultados obtidos demonstram que a bomba de efluxo LfrA possui um papel muito importante na extrusão de EtBr em *M. smegmatis*.

Sendo um dos principais objectivos desta tese correlacionar os resultados obtidos para o transporte parietal de EtBr com o perfil de susceptibilidade aos antibióticos das estirpes em estudo procedeu-se à avaliação do efeito dos mesmos IBEs anteriormente usados na redução da susceptibilidade de *M. smegmatis* à STR, INH, RIF, EMB, AMK, CIP, CLT e ERY. Tal avaliação foi realizada através da determinação da CMI destes antibióticos na presença dos inibidores VP, TZ, CPZ e CCCP a ½ da sua CMI. Nestes ensaios foi possível observar uma diminuição significativa da susceptibilidade, isto é, uma redução superior ou igual a 4 vezes do valor da CMI, de *M. smegmatis* a diversos antibióticos na presença dos IBEs, evidenciando o efluxo activo como responsável pela remoção de diversos antibióticos do interior da célula.

Tendo-se verificado nos ensaios anteriores um aumento notório da susceptibilidade de *M. smegmatis* aos antibióticos CLT, ERY, CIP e AMK na presença dos IBEs VP, TZ e CPZ, foi realizada uma avaliação da acumulação/retenção intracelular da ERY, marcada com um isótopo radioactivo de carbono, na presença e ausência destes três IBEs, na estirpe mc²155. O aumento da retenção celular da [¹⁴C]-ERY em mc²155 na presença dos IBEs seleccionados confirmou, deste modo, a importância dos sistemas de extrusão activos no efluxo de antimicrobianos.

Em resumo, este trabalho permitiu verificar: que a monitorização do influxo e efluxo de EtBr pode ser utilizado para antecipar e estudar a resistência aos antibióticos, mediada pelo transporte através da parede celular de *M. smegmatis*; que na ausência de MspA, a principal porina de *M. smegmatis*, a acumulação de EtBr diminuiu e as células apresentaram-se mais resistentes a diversos antibióticos; que a deleção da bomba de efluxo LfrA promoveu o aumento da acumulação de EtBr e o aumento da

susceptibilidade a este fluorocromo e aos antibióticos INH, RIF, EMB e CIP, e que a resistência a alguns destes antibióticos decresceu na presença dos IBEs, demonstrando que o efluxo activo desempenha um papel importante na extrusão de diversos substratos. Assim, o somatório destes resultados mostram que a porina MspA é um canal importante para a entrada de EtBr e antibióticos na célula e que o efluxo activo através da LfrA está envolvido na resistência de baixo nível a diversos antibióticos e EtBr em *M. smegmatis*.

Em conclusão, os resultados obtidos através das diversas metodologias desenvolvidas e aplicadas neste trabalho proporcionaram uma contribuição para a melhoria da compreensão dos sistemas de efluxo activo e da redução da permeabilidade celular, considerados como os principais mecanismos responsáveis pela resistência intrínseca micobacteriana, que através da redução da concentração intracelular de agentes antimicrobianos permitem o aumento da sobrevivência dos microrganismos na presença destes compostos, potenciando a obtenção e estabilização de um suporte genético para o desenvolvimento de mecanismos de resistência de alto nível, especialmente em regimes terapêuticos prolongados como é o caso da terapêutica para a tuberculose e infecções a MNT.

V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. Aínsa, J. A., M. C. Blokpoel, I. Otal, D. B. Young, K. A. De Smet, and C. Martín.** 1998. Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol.* **180**:5836-5843.
- 2. Amaral, L., J. E. Kristiansen, and M. Viveiros.** 2001. Activity of phenothiazines against antibiotic-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: a review supporting further studies that may elucidate the potential use of thioridazine as anti-tuberculosis therapy. *J Antimicrob Chemother.* **47**:505-511.
- 3. American Thoracic Society.** 2000. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med.* **161**:1376-1395.
- 4. Baker, L. V., T. J. Brown, O. Maxwell, A. L. Gibson, Z. Fang, M. D. Yates, and F. A. Drobniewski.** 2005. Molecular analysis of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from England and Wales reveals the phylogenetic significance of the *ahpC*-46A polymorphism. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**:1455-1464.
- 5. Ball P. R., I. Chopra, and S. J. Eccles.** 1977. Accumulation of tetracyclines by *Escherichia coli* K-12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **77**:1500-1507.
- 6. Ball P. R., S. W. Shales, and I. Chopra.** 1980. Plasmid-mediated tetracycline resistance in *Escherichia coli* involves increased efflux of the antibiotic. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **93**:74-81.
- 7. Banerjee, A., E. Dubnau, A. Quemard, V. Balasubramanian, K. S. Um, T. Wilson, D. Collins, G. De Lisle, and W. R. Jacobs, Jr.** 1994. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.* **263**:227-230.

8. **Banerjee, S. K., K. Bhatt, S. Rana, P. Misra, and P. K. Chakraborti.** 1996. Involvement of an efflux system in mediating high level of fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Biochem Biophys Res Commun.* **226**:362-368.
9. **Barrera, L.** 2007. The Basics of Clinical Bacteriology. P. 93-112. *In* J.C. Palomino, S.C. Leão, V. Ritacco (ed.), *Tuberculosis 2007: From basic science to patient care*, 1st edition.
10. **Belanger A. E., G. S. Besra, M. E. Ford, K. Mikusová, J. T. Belisle, P. J. Brennan, and J. M. Inamine.** 1996. The embAB genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:11919-11924.
11. **Blair, J. M. A., and L. J. V. Piddock.** 2009. Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Curr Opin Microbiol.* **12**:512–519.
12. **Blanchard, J. S.** 1996. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu Rev Biochem.* **65**:215-39.
13. **Bombarda, S., C. M. Figueiredo, M. B. Funari, J. Soares, Jr, M. Seiscento, and M. Terra, Filho.** 2001. Imagem em tuberculose pulmonar. *J Pneumol.* **27**:329-340.
14. **Brennen, P., and H. Nikaido.** 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **64**:29-63.
15. **Brennan, P. J., and D. C. Crick.** 2007. The cell-wall core of *Mycobacterium tuberculosis* in the context of drug discovery. *Curr Top Med Chem.* **7**:475-488.

16. **Brown-Elliott, B. A., D. E. Griffith, and R. J. Wallace, Jr.** 2002. Newly described or emerging human species of nontuberculous mycobacteria. *Infect Dis Clin North Am.* **16**:187-220.
17. **Brown-Elliott, B. A., and R. J. Wallace.** 2002. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.* **15**:716-746.
18. **Buroni, S., G. Manina, P. Gugliera, M. R. Pasca, G. Riccardi, and E. De Rossi.** 2006. LfrR is a repressor that regulates expression of the efflux pump LfrA in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **50**:4044-4052.
19. **Byarugaba, D. K.** 2004. Antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors. *Int J of Antimicrob Agents.* **24**:105-110.
20. **Centers for Disease Control and Prevention.** 1995. Essential Components of a Tuberculosis Prevention and Control Program Recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis. <http://wonder.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00038823.htm>.
21. **Centers for Disease Control and Prevention.** 2006. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with Extensive Resistance to Second-Line Drugs Worldwide, 2000-2004. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* **55**:301-305.
22. **Chan, J., X. D. Fan, S. W. Hunter, P. J. Brennan, and B. R. Bloom.** 1991. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect Immun.* **59**:1755-1761.
23. **Chopra, I.** 2001. Antibiotics. *In Encyclopedia of Life Sciences.* John Wiley & Sons, Inc., Chichester. <http://www.els.net/>.

24. **Chopra, I., and D. Greenwood.** 2001. Antibacterial agents: basis of action. *In* Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Inc., Chichester. <http://www.els.net/>.
25. **Choudhuri, B. S., S. Sen, and P. Chakrabarti.** 1999. Isoniazid accumulation in *Mycobacterium smegmatis* is modulated by proton motive force-driven and ATP-dependent extrusion systems. *Biochem Biophys Res Commun.* **256**:682-684.
26. **Choudhuri, B. S., S. Bhakta, R. Barik, J. Basu, M. Kundu, and P. Chakrabarti.** 2002. Overexpression and functional characterization of an ABC (ATP-binding cassette) transporter encoded by the genes *drrA* and *drrB* of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J.* **367**:279-285.
27. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Sixteenth Informational Supplement M100-S16. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, USA.
28. **Cohen, M. L.** 1992. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science.* **257**:1050-1055.
29. **Cold C. J., and J. R. Taylor.** 1999. The prepuce. *British Journal of Urology.* **83**:34-44.
30. **Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C.E. Barry III, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M. A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, and B. G. Barrell.** 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* **393**:537-544.

31. **Cooper, R.** 2004. A review of the evidence for the use of topical antimicrobial agents in wound care. *World Wide Wounds*. <http://www.worldwidewounds.com/2004/february/Cooper/Topical-Antimicrobial-Agents.html>.
32. **Crubezy, E., B. Ludes, J. D. Poveda, J. Clayton, B. Crouau-Roy, and D. Montagnon.** 1998. Identification of *Mycobacterium* DNA in an Egyptian Pott's disease of 5,400 years old. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. **321**:941-951.
33. **Daffé, M., and P. Drapper.** 1998. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microb Physiol*. **39**:131-203.
34. **Daffé, M. and G. Etienne.** 1999. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tubercle and Lung Disease*. **79**:153-169.
35. **Danilchanka, O., M. Pavlenok, and M. Niederweis.** 2008. Role of Porins for Uptake of Antibiotics by *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother*. **52**:3127-3134.
36. **David, H., V. Levy-Frébault, and M. F. Thorel.** 1989. *Méthodes de laboratoire pour mycobactériologie clinique*. Institut Pasteur, Paris.
37. **De Rossi, E., M. C. Blokpoel, R. Cantoni, M. Branzoni, G. Riccardi, D. B. Young, K. A. De Smet, and O. Ciferri.** 1998. Molecular cloning and functional analysis of a novel tetracycline resistance determinant, *tet(V)*, from *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother*. **42**:1931–1937.
38. **De Rossi, E., J. A. Aínsa, and G. Riccardi.** 2006. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiol Rev*. **30**:36-52.

- 39. Devkota, A.** 2005. Letter to the Editor – The Dilemma of Tuberculosis Control and the DOTS Program. *The Journal of Young Investigators*. <http://www.jyi.org/features/ft.php?id=104>.
- 40. Direcção Geral de Saúde.** 2009. Situação epidemiológica da tuberculose e resultados em Dezembro de 2008.
- 41. Eisenstadt, J., and G. S. Hall.** 1995. Microbiology and classification of mycobacteria. *Clin Dermatol.* **13**:197-206.
- 42. Esko, J. D., T. L. Doering, and C. R. H. Raetz.** 1999. Eubacteria and Archaea. *In* A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart and M.E. Etzler (ed.), *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 43. Fabrino, D. L., C. K. Bleck, E. Anes, A. Hasilik, R. C. Melo, M. Niederweis, G. Griffiths, and M. G. Gutierrez.** 2009. Porins facilitate nitric oxide-mediated killing of mycobacteria. *Microbes Infect.* **11**:868-875.
- 44. Falkinham, J. O., III.** 1996. Epidemiology of Infection by Nontuberculous Mycobacteria. *Clin Microbial Rev.* **9**:177-215.
- 45. Fischbach, M. A., and C. T. Walsh.** 2009. Antibiotics for Emerging Pathogens. *Science.* **325**:1089-1093.
- 46. Georges, E., J. T. Zhang, and V. Ling.** 1991. Modulation of ATP and drug binding by monoclonal antibodies against P-glycoprotein. *J Cell Physiol.* **48**:479-484.
- 47. Ghosh, J., P. Larsoon, B. Singh, B. M. F. Petterson, N. M. Islam, A. N. Sakar, S. Dasgupta, and L. A. Kirsebom.** 2009. Sporulation in mycobacteria. *PNAS.* **106**:10781-10786.

- 48. Good, R. C., and T. M. Shinnick.** 1998. Mycobacterium. p. 549-576. *In* L. Collier, A. Balows, M. Sussman (ed.), *Microbiology and Microbial Infections*, 9th edition, vol. 2. London: Arnold.
- 49. Grange, J. M., and M. D. Yates.** 1986. Infections caused by opportunist mycobacteria: a review. *J R Soc Med.* **79**:226-229.
- 50. Griffith, D. E., T. Aksmit, B. A. Brown-Elliott, A. Catanzaro, C. Daley, F. Gordin, S. M. Holland, R. Horsburgh, G. Huitt, M. F. Iademarco, M. Iseman, K. Olivier, S. Ruoss, C. F. von Reyn, R. J. Wallace, Jr., and K. Winthrop.** 2007. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* **175**:367–416.
- 51. Griffith, D. E.** 2010. Nontuberculous mycobacterial lung disease. *Curr Opin Infect Dis.* **23**:185-190.
- 52. Grkovic, S., M. H. Brown, and R. A. Skurray.** 2002. Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol Mol Biol. Rev.* **66**:671–701.
- 53. Gutierrez, M. G., B. B. Mishra, L. Jordão, E. Elliott. E. Anes, and G. Griffiths.** 2008. NF- κ B Activation Controls Phagolysosome Fusion-Mediated Killing of Mycobacteria by Macrophages. *J Immunol.* **181**:2651 -2663.
- 54. Harder, K. J., H. Nikaido, and M. Matsubashi.** 1981. Mutants of *Escherichia coli* that are resistant to certain B-lactam compounds lack the *ompF* porin. *Antimicrob Agents Chemother.* **20**:549-552.
- 55. Hartmans, S., J. A. M. De Bont, and E. Stackebrandt.** 1992. The genus *Mycobacterium* -nonmedical, p. 889-918. *In* M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, E. Stackebrandt (ed.), *The prokaryotes*, 3rd edition. Springer Verlag, New York, NY.

- 56. Huang, C-T., Y-J. Tsai, C-C. Shu, Y-C Lei, J-Y. Wang, C-J. Yu, L-N. Lee, P-C. Yang, and TAMI Group.** 2009. Clinical significance of isolation of nontuberculous mycobacteria in pulmonary tuberculosis patients. *Respir Med.* **103**:1484-1491.
- 57. Johnstone, R. W., A. A Ruefli, and M. J. Smyth.** 2000. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein?. *Trends Biochem Sci.* **25**:1-6.
- 58. Juliano, R. L., and V. Ling.** 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* **455**:152-162.
- 59. Kaatz, G. W.** 2002. Inhibition of bacterial efflux pumps: a new strategy to combat increasing antimicrobial agent resistance. *Expert Opin Emerg Drugs.* **7**:223-233.
- 60. Konno, K., F. M. Feldmann, and W. McDermott.** 1967. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *Am Rev Respir Dis.* **95**:461-469.
- 61. Kumar, A., and H. P. Schweizer.** 2005. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev.* **57**:1486-1513.
- 62. Kumaresan, J., P. Heitkamp, I. Smith ,and N. Billo.** 2004. Global Partnership to Stop TB: a model of an effective public health partnership. *Int J Tuberc Lung Dis.* **8**:120–129.
- 63. Lomovskaya, O., M. S. Warren, A. Lee, J. Galazzo, R. Fronko, M. Lee, J. Blais, D. Cho, S. Chamberland, T. Renau, R. Leger, S. Hecker, W. Watkins, K. Hoshino, H. Ishida, and V. J. Lee.** 2001. Identification and Characterization of Inhibitors of Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Agents for Combination Therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**:105-116.

- 64. Lamovskaya, O., and W. J. Watkins.** 2001. Efflux pumps: their role in antibacterial drug discovery. *Curr Med Chem.* **8**:1699-1711.
- 65. Lawrence, L. E., and J. F. Barrett.** 1998. Efflux pumps in bacteria: overview, clinical relevance, and potential pharmaceutical target. *Expert Opin Investig Drugs.* **7**:199-217.
- 66. Leão, S. C., and F. Portaels.** 2007. History. P. 25-52. *In* J.C. Palomino, S.C. Leão, V. Ritacco (ed.), *Tuberculosis 2007: From basic science to patient care*, 1st edition.
- 67. Leclercq, R., and P. Courvalin.** 1991. Bacterial Resistance to Macrolide, Lincosamide, and Streptogramin Antibiotics by Target Modification. *Antimicrob Agents Chemother.* **35**:1267-1272.
- 68. Lemos, A. C. M.** 2008. Tuberculosis/HIV co-infection. *J Bras Pneumol.* **34**:753-755.
- 69. Levy S. B., and L. McMurry.** 1978. Plasmid-determined tetracycline resistance involves new transport systems for tetracycline. *Nature.* **276**:90-92.
- 70. Li, X.-Z., L. Zhang, and H. Nikaido.** 2004. Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**:2415-2423.
- 71. Li, X.-Z., and H. Nikaido.** 2009. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: An Update. *Drugs.* **69**:1555-1623.
- 72. Liu, J., C. E. Barry, III, G. S. Besra, and H. Nikaido.** 1996. Mycolic Acid Structure Determines the Fluidity of the Mycobacterial Cell Wall. *J Biol Chem.* **271**:29545-29551.

- 73. Liu, J., H. E. Takiff, and H. Nikaido.** 1996 Active efflux of fluoroquinolones in *Mycobacterium smegmatis* mediated by LfrA, a multidrug efflux pump. *J Bacteriol.* **178**:3791-3795.
- 74. Louw, G. E., R. M. Warren, N. C. Gey van Pittius, C. R. McEvoy, P. D. Van Helden, and T. C. Victor.** 2009. A balancing act: efflux/influx in mycobacterial drug resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**:3181-3189.
- 75. Luna, J. A. C.** 2004. A Tuberculosis Guide for Specialist Physicians. International Union against Tuberculosis and Lung. http://www.tbrieder.org/publications/specialists_en.pdf.
- 76. Lynch, A. S.** 2006. Efflux systems in bacterial pathogens: An opportunity for therapeutic intervention? An industry view. *Biochemical Pharmacology.* **71**:949-956.
- 77. Machado Sequeira, C. M.** 2004. Resistência aos antibióticos: O uso inadequado dos antibióticos na prática clínica. *Org Farm Ibero-Latinoamer.* **14**:45-68.
- 78. Marigot-Outtandy, D., and C. Perronne.** 2009. Les nouveaux antituberculeux. *Réanimation.* **18**:334-342.
- 79. Marquez, B.** 2005. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie.* **12**:1137-1147.
- 80. Martins, A., G. Spengler, L. Rodrigues, M. Viveiros, J. Ramos, M. Martins, I. Couto, S. Fanning, J.M. Pagès, J.M. Bolla, J. Molnar and L. Amaral.** 2009. pH Modulation of efflux pump activity of multi-drug resistant *Escherichia coli*: protection during its passage and eventual colonization of the colon. *PLoS One.* **8**:e6656.

- 81. Martins, M., B. Santos, A. Martins, M. Viveiros, I. Couto, A. Cruz , J.M. Pagès, J. Molnar, S. Fanning, L. Amaral; Management Committee Members; of Cost B16; European Commission/European Science Foundation.** 2006. An instrument-free method for the demonstration of efflux pump activity of bacteria. *In Vivo.* **20:** 657–664.
- 82. McKeegan, K. S., M. I. Borge-Walmsley, and A. R. Walmley.** 2004. Structural understanding of efflux-mediated drug resistance: potential routes to efflux inhibition. *Curr Opin Pharmacol.* **4:**479-486.
- 83. McMurry, L., R. E. Petrucci, Jr., and S. B. Levy.** 1980. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77:**3974-3977.
- 84. Mdluli, K., R. A. Slayden, Y. Zhu, S. Ramaswamy, X. Pan, D. Mead, D. D. Crane, J. M. Musser, and C. E. Barry III.** 1998. Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl ACP synthase by isoniazid. *Science.* **280:**1607-1610.
- 85. Meier, A., P. Kirschner, F. C. Bange, U. Vogel, and E. C. Böttger.** 1994. Genetic alterations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: mapping of mutations conferring resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **38:**228-33.
- 86. Meier, A., P. Sander, K. J. Schaper, M. Scholz, and E. C. Bottger.** 1996. Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotypic resistance levels in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **40:**2452-2454.
- 87. Migliori, G. B., R. Loddenkemper, F. Blasi, and M. C Raviglione.** 2007. 125 years after Robert Koch's discovery of the tubercle bacillus: the new XDR-TB threat. Is "science" enough to tackle the epidemic?. *Eur Respir J.* **29:**423-427.

- 88. Minnikin, D. E.** 1982. Lipids: Complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles, p. 95–184. *In* C. Ratledge and JL Stanford (ed.), *The Biology of the Mycobacteria*. Academic Press, London.
- 89. Moazed, D., H. F. Noller.** 1987. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature*. **327**:389-394.
- 90. Newton, Jr, J. A., P. J. Weiss, W. A. Bowler ,and E. C. Oldfield, III.** 1993. Soft-Tissue Infection Due to *Mycobacterium smegmatis*: Report of Two Cases. *Clin Infect Dis*. **16**:531-533.
- 91. Niederweis, M.** 2003. Mycobacterial porins - new channel proteins in unique outer membranes. *Mol Microbiol*. **49**:1167-1177.
- 92. Nikaido, H.** 2001. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Semin Cell Dev Biol*. **12**:215-223.
- 93. Normark, B. H., and S. Normark.** 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Int Med*. **252**:91-106.
- 94. Palmero, D. J.** 2007. Tuberculosis and HIV/AIDS. P. 559-592. *In* J.C. Palomino, S.C. Leão, V. Ritacco (ed.), *Tuberculosis 2007: From basic science to patient care*, 1st edition.
- 95. Paulsen, I. T., M. H. Brown, and R. A. Skurray.** 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev*. **60**:575-608.
- 96. Paulsen I. T., M. K. Sliwinski, and M. H. Saier, Jr.** 1998. Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. *J Mol Biol*. **277**:573–592.

- 97. Phan, A. T., V. Kuryavyi, H. Y. Gaw, and D. J. Patel.** 2005. Small-molecule interaction with a five-guanine-tract G-quadruplex structure from the human MYC promoter. *Nat Chem Biol.* **1**:167-173.
- 98. Piddock, L. J.** 2006. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clin Microbiol Rev.* **19**:382-402.
- 99. Poole, K.** 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* **56**:20-51.
- 100. Poole, K.** 2007. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann Med.* **39**:162-176.
- 101. Prescott, L. M., J. Harley, and D. Klein.** 2002. *Microbiology.* 5th ed., McGraw Hill, Columbus, Ohio.
- 102. Putman, M., H. W. van Veen, and W. N. Konings.** 2000. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev.* **64**:672-693.
- 103. Rajá, A.** 2004. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res.* **120**:213-232.
- 104. Ramaswamy, S., and J. M. Musser.** 1998. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis.* **79**:3-29.
- 105. Ramaswamy, S. V., A. G. Amin, S. Göksel, C. E. Stager, S. J. Dou, H. El Sahly, S. L. Moghazeh, B. N. Kreiswirth, and J. M. Musser.** 2000. Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**:326-336.

- 106. Raynaud, C., M. A. Laneelle, R. H. Senaratne, P. Draper, G. Laneelle, and M. Daffe.** 1999. Mechanisms of pyrazinamide resistance in mycobacteria: importance of lack of uptake in addition to lack of pyrazinamidase activity. *Microbiology*. **145**:1359-1367.
- 107. Robinson, N., M. Wolke, K. Ernestus, and G. Plum.** 2007. A Mycobacterial Gene Involved in Synthesis of an Outer Cell Envelope Lipid Is a Key Factor in Prevention of Phagosome Maturation. *Infect Immun*. **75**:581-591.
- 108. Rodrigues, L., D. Wagner, M. Viveiros, D. Sampaio, I. Couto, M. Vavra, W. V. Kern, and L. Amaral.** 2008. Thioridazine and chlorpromazine inhibition of ethidium bromide efflux in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium smegmatis*. *J Antimicrob Chemother*. **61**:1076-1082.
- 109. Rodrigues, L., D. Sampaio, I. Couto, D. Machado, W. V. Kern, L. Amaral, and M. Viveiros.** 2009. The role of efflux pumps in macrolide resistance in *Mycobacterium avium* complex. *Int J Antimicrob Agents*. **34**:529-533.
- 110. Röse, L., S. H. E. Kaufmann, and S. Daugelat.** 2004. Involvement of *Mycobacterium smegmatis* undecaprenyl phosphokinase in biofilm and smegma formation. *Microbes Infect*. **6**:965-971.
- 111. Rouse, D. A., J. A. DeVito, Z. Li, H. Byer, and S. L. Morris.** 1996. Site-directed mutagenesis of the *katG* gene of *Mycobacterium tuberculosis*: effects on catalase-peroxidase activities and isoniazid resistance. *Mol Microbiol*. **22**:583-592.
- 112. Runyon, E. H.** 1959. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med Clin North Am*. **43**:273-290.
- 113. Saier, Jr, M. H., I. T. Paulsen, M. K. Sliwinski, S. S. Pao, R. A. Skurray, and H. Nikaido.** 1998. Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. *FASEB J*. **12**:265-274.

- 114. Saier, Jr, M. H., and I. T. Paulsen.** 2001. Phylogeny of multidrug transporters. *Semin Cell Dev Biol.* **12**:205-213.
- 115. Sander, P., A. Meier and E. C. Böttger.** 1995. *rpsL+*: a dominant selectable marker for gene replacement in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* **16**:991-1000.
- 116. Sander, P., E. De Rossi, B. Böddinghaus, R. Cantoni, M. Branzoni, E. C. Böttger, H. E. Takiff, R. Rodriguez, G. Lopez, and G. Riccardi.** 2000. Contribution of the multidrug efflux pump LfrA to innate mycobacterial drug resistance. *FEMS Microbiol Lett.* **193**:19-23.
- 117. Schlossberg, D.** 2006 *Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections.* 5th ed., McGraw Hill, New York.
- 118. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks.** 2009. Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides. http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_021.pdf.
- 119. Shears, P.** 2000. Antimicrobial resistance in the tropics. *Trop Doct.* **30**:114-116.
- 120. Shears, P.** 2001. Antibiotic resistance in the tropics. Epidemiology and surveillance of antimicrobial resistance in the tropics. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **95**:127-130.
- 121. Shinnick, T. M., and R. C. Good.** 1994. Mycobacterial Taxonomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **13**:884-901.
- 122. Silva, P. A., F. Bigi, M. P. Santangelo, M. I. Romano, C. Martín, A. Cataldi, and J. A. Aínsa.** 2001. Characterization of P55, a multidrug efflux pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**:800-804.

- 123. Silva, P. A., and J.A. Aínsa.** 2007. Drugs and drug interactions. P. 593-634. *In* J.C. Palomino, S.C. Leão, V. Ritacco (ed.), *Tuberculosis 2007: From basic science to patient care*, 1st edition.
- 124. Singh, A. K., and J. M. Reyrat.** 2009. Laboratory maintenance of *Mycobacterium smegmatis*. *Curr Protoc Microbiol*. Chapter 10:Unit10C.1.
- 125. Snapper, S.B., R.E. Melton, T. Kieser, S. Mustafa and W. R. Jacobs Jr.** 1990. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol*. **4**:1911-1919.
- 126. Somoskovi, A., L. M. Parsons, and M. Salfinger.** 2001. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res*. **2**:164-168.
- 127. Srivastava, S., A. Garg, A. Ayyagari, K. K. Nyati, T. N. Dhole, and S. K. Dwivedi.** 2006. Nucleotide Polymorphism Associated with Ethambutol Resistance in Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Microbiol*. **53**:401-405.
- 128. Stahl, C., S. Kubetzko, I. Kaps, S. Seeber, H. Engelhardt and M. Niederweis.** 2001. MspA provides the main hydrophilic pathway through the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol*. **40**:451-464.
- 129. Stamm, L. M., J. H. Morisaki, L.-Y. Gao, R. L. Jeng, K. L. McDonald, R. Roth, S. Takeshita, J. Heuser, W. D. Welch, and E.J . Brown.** 2003. *Mycobacterium marinum* Escapes from Phagosomes and Is Propelled by Actin-based Motility. *J Exp Med*. **198**:1361-1368.
- 130. Stephan, J., C. Mailaender, G. Etienne, M. Daffe, and M. Niederweis.** 2004. Multidrug Resistance of a Porin Deletion Mutant of *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother*. **48**:4163-4170.

- 131. Stephan, J., J. Bender, F. Wolschendorf, C. Hoffmann, E. Roth, C. Mailänder, H. Engelhardt and M. Niederweis.** 2005. The growth rate of *Mycobacterium smegmatis* depends on sufficient porin-mediated influx of nutrients. *Mol. Microbiol.* **58**:714-730.
- 132. Takayama, K., L. Wang, and H. L. David.** 1972. Effect of isoniazid on the *in vivo* mycolic acid synthesis, cell growth, and viability of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2**:29-35.
- 133. Takayama, K., and J. O. Kilburn.** 1989. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **33**:1493-1499.
- 134. Takiff, H. E., M. Cimino, M. C. Musso, T. Weisbrod, R. Martinez, M. B. Delgado, L. Salazar, B. R. Bloom, and W. R. Jacobs Jr.** 1996. Efflux pump of the proton antiporter family confers low-level fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:362-366.
- 135. Telenti, A., P. Imboden, F. Marchesi, D. Lowrie, S. Cole, M. J. Colston, L. Matter, K. Schopfer, and T. Bodmer.** 1993. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet.* **341**:647–650.
- 136. Telenti, A., P. Imboden, F. Marchesi, T. Schmidheini, and T. Bodmer.** 1993. Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Antimicrob Agents Chemother.* **37**:2054–2058.
- 137. Van Bambeke, F., E. Balzi, and P. M. Tulkens.** 2000. Antibiotic efflux pumps. *Biochem Pharmacol.* **60**:457-470.

- 138. Van Bambeke, F., Y. Glupczynski, P. Plésiat, J. C. Pechère, and P. M. Tulkens.** 2003. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *J Antimicrob Chemother.* **51**:1055-1065.
- 139. Van Bambeke, F., J. M. Pagès, and V. J. Lee.** 2006. Inhibitors of Bacterial Efflux Pumps as Adjuvants in Antibacterial Therapy and Diagnostic Tools for Detection of Resistance by Efflux. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* **1**:157-175.
- 140. van Veen, H. W., and W. N. Konings.** 1997. Multidrug transporters from bacteria to man: similarities in structure and function. *Semin Cancer Biol.* **8**:183-191.
- 141. Viveiros, M., I. Portugal, R. Bettencourt, T. C. Victor, A. M. Jordaan, C. Leandro, D. Ordway, and L. Amaral.** 2001. Isoniazid-induced transient high-level resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**:2804-2810.
- 142. Viveiros, M., C. Leandro, and L. Amaral.** 2003. Mycobacterial efflux pumps and chemotherapeutic implications. *Int J Antimicrob Agents.* **22**:274-278.
- 143. Viveiros, M., A. Martins, L. Paixão, L. Rodrigues, M. Martins, I. Couto, E. Fähnrich, W.V. Kern and L. Amaral.** 2008. Demonstration of intrinsic efflux activity of *Escherichia coli* K-12 AG100 by an automated ethidium bromide method. *Int J Antimicrob Agents.* **31**:458-462.
- 144. Viveiros, M., M. Martins, I. Couto, L. Rodrigues, G. Spengler, A. Martins, J.E. Kristiansen, J. Molnar and L. Amaral.** 2008. New methods for the identification of efflux mediated MDR bacteria, genetic assessment of regulators and efflux pump constituents, characterization of efflux systems and screening for inhibitors of efflux pumps. *Curr Drug Targets.* **9**:760-778.

- 145. Waksman, S. A.** 1947. What Is an Antibiotic or an Antibiotic Substance?. *Mycologia*. **39**:565-569.
- 146. Wallace, Jr, R. J., D. R. Nash, M. Tsukamura, Z. M. Blacklock, and V. A. Silcox.** 1988. Human disease due to *Mycobacterium smegmatis*. *J Infect Dis*. **158**:52-59.
- 147. Wengenack, N. L., J. R. Uhl, A. L. St. Amand, A. J. Tomlinson, L. M. Benson, S. Naylor, B. C. Kline, F. R. Cockerill III, and F. Rusnak.** 1997. Recombinant *Mycobacterium tuberculosis katG*(S315T) is a competent catalase-peroxidase with reduced activity toward isoniazid. *J Infect Dis*. **176**:722-727.
- 148. Winn, R. E., and P. A. Meier.** 1994. Extrapulmonary Tuberculosis, p. 465-472. *In* P. Hoepfich, M. Jordan, A. Ronald (ed.), *Infectious Diseases*. Lippincot, Philadelphia.
- 149. Wolinski, E.** 1979. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am Rev Respir Dis*. **119**:107-159.
- 150. Woods, G. L., and J. A. Washington, II.** 1987. Mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*: Review of microbiologic and clinical aspects. *Rev Infect Dis*. **9**:275-294.
- 151. World Health Organization.** 1999. What is DOTS? A Guide to Understanding the WHO-recommended TB Control Strategy Known as DOTS. Geneva. WHO/CDS/CPC/TB/99.270.
- 152. World Health Organization.** 2000. WHO report on infectious diseases 2000. Overcoming antimicrobial resistance. Geneva: WHO/CDS/2000.2.

- 153. World Health Organization.** 2001. Guidelines for drug susceptibility testing for second-line anti-tuberculosis drugs for DOTS-Plus. Geneva. WHO/CDS/TB/2001.288.
- 154. World Health Organization.** 2002. Antimicrobial resistance. Fact sheet N° 194. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>.
- 155. World Health Organization.** 2003. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. 2nd ed., Geneva: WHO/TB/2003.320.
- 156. World Health Organization.** 2007. Stop TB Coordination of Technical Assistance to Countries. WHO/HTM/TB/2007.386. http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/WHO_HTM_TB_2007.386_eng.pdf.
- 157. World Health Organization.** 2009. Treatment of Tuberculosis: guidelines for national programmes. 4th ed., Geneva: WHO/HTM/TB/2009.420.
- 158. Wright, G. D.** 2005. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev.* **57**:1451-1470.
- 159. Yoneyama, H., and R. Katsumata.** 2006. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Biosci Biotechnol Biochem.* **70**:1060-1075.
- 160. Zhang, Y., B. Heym, B. Allen, D. Young, and S. Cole.** 1992. The catalaseperoxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature.* **358**:591-593.
- 161. Zhang, Y., T. Garbe, and D. Young.** 1993. Transformation with *katG* restores isoniazid-sensitivity in *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to a range of drug concentrations. *Mol Microbiol.* **8**:521-524.

- 162. Zhang, Y., and A. Telenti.** 2000. Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, p. 111–130. *In* G. F. Hatfull and W. R. Jacobs (ed.), Molecular genetics of mycobacteria. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- 163. Zgurskaya, H. I., and H. Nikaido.** 2000. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol Microbiol.* **37**:219-225.