



Universidade Nova de Lisboa

Resistência mediada por efluxo em *Escherichia coli*: novas estratégias terapêuticas utilizando antibióticos e inibidores de efluxo

Antónia Rosa Trindade Pinto

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

JANEIRO 2012



Universidade Nova de Lisboa

Resistência mediada por efluxo em *Escherichia coli*: novas estratégias terapêuticas utilizando antibióticos e inibidores de efluxo

Antónia Rosa Trindade Pinto

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Orientador: Professor Doutor Miguel Viveiros

Co-Orientador: Professora Doutora Isabel Couto

JANEIRO 2012

Os resultados apresentados foram objecto de apresentação em co-autoria da seguinte comunicação em congresso sob a forma de Poster:

A. Pinto, D. Machado, S.S. Costa, I. Couto, L. Amaral and M. Viveiros. Multidrug resistance mediated by active efflux in *Escherichia coli*: new therapeutic strategies using antibiotics and inhibitors of active efflux. Congresso Nacional de Microbiologia, MicroBiotec11, Braga, Portugal. Dezembro 2011

Agradecimentos

Chegado este momento é minha intenção expressar os mais sinceros agradecimentos às várias pessoas que, em diferentes momentos, deram o seu contributo para a concretização deste trabalho.

Ao Professor Miguel Viveiros, Director do Grupo de Micobactérias da Unidade de Microbiologia Médica, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, orientador desta dissertação, gostaria de manifestar o meu reconhecimento pela forma como delineou as linhas deste trabalho e pelos ensinamentos prestados durante a sua realização. Não poderia deixar de reconhecer a confiança que depositou em mim, a sua disponibilidade bem como o constante incentivo que me transmitiu, um muito e reconhecido obrigado.

À Professora Doutora Isabel Couto, por todas as palavras de incentivo, pelas aulas leccionadas que muito interesse me despertaram pela ciência, e acima de tudo pelo voto de confiança e todo o apoio.

À Professora Doutora Carla Carvalho pela ajuda na microscopia de fluorescência, pela amizade e sua inteira disponibilidade.

À Unidade de Microbiologia Médica, Grupo de Micobactérias, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, gostaria de agradecer as condições disponibilizadas, e o companheirismo que ao longo do tempo se foi formando. Gostaria de agradecer à Diana Machado e à Sofia Costa por todo o apoio, ajuda, compreensão e transmissão de conhecimentos tanto práticos como teóricos. Também à Cláudia, à Lisa e ao Pedro pela amizade, entajuda e momentos de descontração. Não poderia deixar de agradecer ao Jorge Ramos, à Liliana Rodrigues e à Ana Armada pelos bons momentos proporcionados. Diana obrigado por tudo.

Aos meus pais por tudo, sem vocês não teria chegado até aqui, a compreensão, a motivação, o amor e as palavras sempre sábias nos momentos certos. À Inês e à Ana por toda a força que me transmitiram nas várias ocasiões, e por me arrancarem “aquele” sorriso como só as minhas irmãs sabem. À minha avó pela fé que sempre me transmitiu. Ao António por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, pela paciência, compreensão, carinho e amor.

Aos meus amigos sempre presentes, pelos momentos de descontração, principalmente a vós, Brígida e Fatinha, obrigada por me entenderem.

Não poderia terminar sem dar o meu grande agradecimento também à Família Pista, tantos momentos partilhados de afecto e amor, obrigada pela força transmitida e toda a compreensão e carinho.

A todos, muito obrigada!

Resumo

As bactérias desenvolveram ao longo do tempo, mecanismos que lhes permitem superar os efeitos nocivos causados por uma grande variedade de compostos antimicrobianos. Os sistemas de efluxo e a permeabilidade reduzida da parede celular são dois desses mecanismos.

Para se estudar a resistência aos antibióticos mediada por efluxo em *Escherichia coli*, a influência dos inibidores de efluxo na resistência, os mecanismos de acção desses inibidores, a sua relação com a bioenergética e a competição entre substratos de efluxo, usaram-se duas estirpes de *E. coli*: a estirpe AG100, com o sistema de efluxo AcrAB-TolC funcional, e a estirpe AG100A, com o sistema AcrAB-TolC inactivo. Os inibidores testados foram a clorpromazina, tioridazina, ortovanadato sódio, arilpiperazina, carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona e o verapamil. Estes compostos foram avaliados i) quanto à sua capacidade para inibir o sistema de efluxo AcrAB-TolC, através de um método fluorométrico semi-automático; ii) quanto à capacidade para diminuir a susceptibilidade de *E. coli* aos antimicrobianos, através da determinação de concentrações mínimas inibitórias na presença e ausência de inibidores de efluxo; iii) quanto ao seu efeito ao nível da membrana celular, nomeadamente, disrupção do potencial de membrana, por microscopia de fluorescência. Para além disso, estes inibidores foram usados em ensaios de competição entre o brometo de etídio e os antibióticos tetraciclina, ofloxacina e oxacilina.

Os resultados demonstraram que todos os compostos estudados foram capazes de diminuir a actividade de efluxo. Os compostos que apresentaram um efeito mais relevante foram a clorpromazina e o ortovanadato sódio. Contrariamente, as arilpiperazinas demonstraram um maior efeito na redução dos valores das concentrações mínimas inibitórias dos antibióticos testados realçando o facto de que o efeito destes compostos tidos como inibidores nem sempre corresponde à inibição real de efluxo. Para além disso, foi possível dividir os inibidores em dois grupos: (i) dependentes da acção da glucose – NMP e VP, e (ii) independentes da acção da glucose – CCCP, CPZ, Na_3VO_4 . Os resultados de microscopia de fluorescência demonstraram que todos os compostos testados possuem um efeito imediato ao nível da produção de energia celular, afectando o potencial de membrana. Por último, os ensaios de competição entre substratos demonstraram a existência de um efeito sinérgico, nomeadamente com tetraciclina e ofloxacina, uma vez que permitiram a retenção de mais brometo de etídeo no interior das células.

Os resultados obtidos evidenciam a relação entre a resistência aos antibióticos por efluxo activo em *E. coli*, em particular pelo sistema AcrAB-TolC, e a sua dependência de energia fornecida pela hidrólise de ATP. Deste modo, podemos concluir que os inibidores de efluxo podem ser potenciais alvos para o desenvolvimento de novas terapias no combate à resistência em *E. coli*.

Abstract

Bacteria developed mechanisms that allow overcoming the noxious effects caused by a wide variety of compounds. Two of these strategies are the increase of the activity of efflux pumps and the reduced permeability of the cell wall. This work aims to contribute to: (i) a better understanding of efflux inhibitors mechanisms of action; (ii) correlate the mechanisms of action these efflux inhibitors with bioenergetic alterations at cell wall level; (iii) study the competition between efflux pumps substrates and, (iii) evaluate, *in vitro*, combinations of antibiotics and efflux inhibitors that have the capacity to inhibit efflux pumps activity in *Escherichia coli*.

For that, we used two *E. coli* strains: strain AG100, which has the efflux system AcrAB-TolC active, and strain AG100A, with AcrAB-TolC inactivated. The efflux inhibitors tested were chlorpromazine, thioridazine, sodium orthovanadate, arylpiperazin, carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone (CCCP) and verapamil. These compounds were assayed i) for their capacity to inhibit the efflux system AcrAB-TolC by a semi-automated fluorometric method; ii) for their ability to decrease the susceptibility for the antibiotics through minimal inhibitory concentration determination in presence and absence of efflux inhibitors; and iii) for their effect on the cell membrane, namely, disruption of the membrane potential, evaluated by fluorescence microscopy. Also, these efflux inhibitors were used in competition assays between ethidium bromide and the antibiotics tetracycline, ofloxacin and oxacilin.

The results demonstrated that all inhibitors provide efflux inhibition. Chlorpromazine and sodium orthovanadate were the two efflux inhibitors with more capacity to inhibit real-time efflux of ethidium bromide. Conversely, in the reduction in the minimal inhibitory concentration values of the antibiotics tested, the arylpiperazin was the most effective inhibitory agent highlighting the fact that minimal inhibitory concentration reduction effects of putative efflux inhibitors not always reflect a real efflux-pump inhibition. Moreover, the results allow us to divide the efflux inhibitors in two groups: (i) those that are dependent of glucose – arylpiperazin and e verapamil, and (ii) those that are independent of glucose – CCCP, chlorpromazine and sodium orthovanadate. The results obtained with the fluorescence microscopy show that all the compounds tested have an immediate effect on the production of cellular energy, affecting the membrane potential. Moreover, the results obtained further supports the conclusion that combinations of antibiotic plus efflux inhibitors results in a synergistic effect allowing the retention of more ethidium bromide inside the cells.

This study revealed the relation between *E. coli* antibiotic resistance and active efflux, in particular by the AcrAB-TolC system, and its dependence on the energy provided by the hydrolysis of ATP. In conclusion, efflux inhibitors might be a new potential target for the development of new synergistic therapies to combat antibiotic resistance in *E. coli*.

Índice Geral

Comunicações em congresso	i
Agradecimentos	ii
Resumo	iv
Abstract.....	v
Índice Geral	vi
Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas	xii

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Enterobacteriaceas	1
1.1.1 <i>Escherichia coli</i> - Características gerais	1
1.1.2 Características bioquímicas.....	4
1.1.3 Vias metabólicas – produção de energia.....	4
1.2 Agentes antimicrobianos e seus mecanismos de acção	6
1.3 Mecanismos de resistência aos antibióticos.....	9
1.4 Sistemas de efluxo em <i>E. coli</i>	11
1.4.1 Transportadores primários	13
1.4.2 Transportadores secundários.....	15
1.4.2.1 “Major Facilitator Superfamily” (MFS).....	15
1.4.2.2 Família “Small Multi-drug Resistance” (SMR)	17
1.4.2.3 Família “Multidrug and Toxic compound Extrusion” (MATE).....	17
1.4.2.4 Família “Resistance Nodulation and cell Division” (RND).....	18
1.4.3 Sistema de efluxo AcrAB-TolC	20
1.5 Inibidores de efluxo e mecanismos de acção.....	22
1.5.1 Fenotiazinas.....	23
1.5.2 Desacoplador energético – CCCP	24
1.5.3 Ortovanadato de sódio.....	26
1.5.4 Arilpiperazina (NMP)	26
1.5.5 Verapamil	27
1.6 Métodos de detecção de actividade de efluxo	28

1.6.1 Método fluorométrico semi-automático para monitorização do transporte de EtBr	29
1.7 Objectivos	31
2. MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1 Material	33
2.1.1 Estirpes utilizadas	33
2.1.2 Meios de cultura e soluções	33
2.2 Métodos	35
2.2.1 Crescimento das estirpes bacterianas	35
2.2.2 Determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMI _s) pelo método de diluição seriada em microplaca	36
2.2.3 Determinação de concentrações mínimas inibitórias pelo método de diluição em microplaca para os antibióticos na presença dos compostos inibidores de efluxo ...	38
2.2.4 Método fluorométrico semi - automático em termociclador de tempo real rotor gene TM 3000	39
2.2.4.1 Preparação das estirpes bacterianas	39
2.2.4.2 Ensaio de acumulação de EtBr	40
2.2.4.3 Ensaio de acumulação de EtBr na presença de inibidores de efluxo	40
2.2.4.4 Ensaio de efluxo de EtBr	41
2.2.4.5 Ensaios de competição entre substratos	42
2.2.5 Potencial de membrana e viabilidade celular	43
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
3.1 Caracterização fenotípica das duas estirpes de <i>E. coli</i> em estudo – AG100 e AG100A	45
3.1.1 Determinação das concentrações mínimas inibitórias dos antibióticos e dos compostos inibidores de efluxo para as estirpes da <i>E. coli</i> , AG100 e AG100A	45
3.1.2 Determinação das concentrações mínimas inibitórias dos antibióticos e EtBr na presença dos compostos inibidores de efluxo para as estirpes de <i>E. coli</i> , AG100 e AG100A	47
3.2 Monitorização do transporte de EtBr pelo método fluorométrico semi-automático ..	51
3.2.1 Estudo do transporte de EtBr na presença de inibidores de efluxo	53
3.2.1.1 Na presença de CPZ e TZ	53
3.2.1.2 Na presença de um desacoplador energético (CCCP)	56
3.2.1.3 Na presença do ortovanadato de sódio (Na ₃ VO ₄)	57
3.2.1.4 Na presença de arilpiperazinas (NMP)	58
3.2.1.5 Na presença de verapamil (VP)	59
3.2.2 Influência dos inibidores no Potencial de membrana ($\Delta\Psi$)	62

3.2.3	Influência dos inibidores na viabilidade celular.....	65
3.2.4	Influência dos inibidores em estudo no efluxo de EtBr	69
3.3	Estudo de competição entre substratos do sistema de efluxo AcrAB-TolC	75
3.3.1	Estudo da competição entre os substratos na ausência de inibidores de efluxo...	76
3.3.2	Estudo da competição entre os substratos na presença de inibidores de efluxo	77
3.3.2.1	Estudo da competição entre a tetraciclina e o substrato EtBr na presença de inibidores de efluxo	77
3.3.2.2	Estudo da competição entre a oxacilina e o substrato EtBr na presença de inibidores de efluxo	79
3.3.2.3	Estudo da competição entre a ofloxacina e o substrato EtBr na presença de inibidores de efluxo	81
4.	CONCLUSÕES.....	83
5.	PERSPECTIVAS FUTURAS	85
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

Índice de figuras

Figura 1 – Composição da parede celular das bactérias Gram-negativas..	2
Figura 2 – Representação esquemática dos principais mecanismos de acção de agentes antimicrobianos..	7
Figura 3 – Representação esquemática do modelo estrutural da super família “ATP binding cassette”	14
Figura 4 - Esquema das cinco classes representativas das respectivas famílias de bombas de efluxo.....	15
Figura 5 – Representação esquemática do modelo estrutural dos transportadores MFS.	16
Figura 6 – Representação esquemática do modelo estrutural das bombas SMR	17
Figura 7 – Representação esquemática do modelo estrutural das bomba RND	18
Figura 8 – Representação esquemática da estrutura do sistema de efluxo AcrAB-TolC	21
Figura 9 – Estrutura química das fenotiazinas	24
Figura 10 – Estrutura química do CCCP	25
Figura 11 – Estrutura química do Na_3VO_4	26
Figura 12 – Estrutura química das NMP	27
Figura 13 – Estrutura química do VP.	28
Figura 14 – Representação esquemática da entrada e saída de EtBr na célula de <i>E. coli</i> .	30
Figura 15 – Representação gráfica de um ensaio de acumulação de EtBr.	30
Figura 16 – Representação gráfica de um ensaio de efluxo de EtBr.	31
Figura 17 – Determinação da concentração mínima de EtBr.	52
Figura 18 – Influência do CPZ na acumulação de EtBr	54
Figura 19 – Influência da TZ na acumulação de EtBr.	55
Figura 20 – Influência do CCCP na acumulação de EtBr.	56
Figura 21 – Influência do Na_3VO_4 na acumulação de EtBr.	57
Figura 22 – Influência do NMP na acumulação de EtBr.....	58
Figura 23 – Influência do VP na acumulação de EtBr.	60
Figura 24 – Influência dos inibidores sobre a polarização da membrana celular.....	63
Figura 25 – Imagens de microscopia de fluorescência.....	64
Figura 26 – Gráfico representativo da % de células viáveis.....	66
Figura 27 – Fotografias de microscopia fluorescência dos ensaios de viabilidade.	67
Figura 28 – Representação dos ensaios de efluxo	70
Figura 29 – Representação dos ensaios de efluxo.	71
Figura 30 – Representação do ensaio de efluxo	74
Figura 31 – Gráfico representativo da análise de competição de EtBr.....	76
Figura 32 – Gráfico representativo da análise de competição de EtBr entre diferentes concentrações de tetraciclina na presença de CPZ.	77

Figura 33 – Gráfico representativo da análise de competição de EtBr entre diferentes concentrações de tetraciclina na presença de Na_3VO_4	78
Figura 34 – Gráfico representativo da análise de competição de EtBr entre diferentes concentrações de oxacilina na presença de CPZ.	79
Figura 35 – Gráfico representativo da análise de competição de EtBr entre diferentes concentrações de oxacilina na presença de Na_3VO_4	80
Figura 36 – Gráfico representativo da análise de competição de EtBr entre diferentes concentrações de ofloxacina na presença de CPZ.	81
Figura 37 – Gráfico representativo da análise de competição de EtBr entre diferentes concentrações de ofloxacina na presença de Na_3VO_4	82

Índice de tabelas

Tabela 1 – Mecanismos de acção de alguns agentes antimicrobianos mais utilizados na terapêutica de infecções bacterianas.....	9
Tabela 2 – Tabela representativa de algumas bombas de efluxo em <i>E. coli</i> e possíveis substratos.	20
Tabela 3 – Composição dos meios de cultura.....	34
Tabela 4 – Composição e preparação de soluções de antibióticos, compostos inibidores de sistemas de efluxo e EtBr.	34
Tabela 5 – Composição e preparação de soluções.....	35
Tabela 6 – Gama de concentrações testadas para cada composto em estudo.....	36
Tabela 7 – Gama de concentrações utilizadas para os antibióticos na presença do inibidor de efluxo a ½ da CMI.	38
Tabela 8 – Valores obtidos de CMI para os antibióticos nas duas estirpes de <i>E. coli</i> , AG100 e AG100A.	45
Tabela 9 – Valores obtidos de CMI para inibidores e substratos de bombas de efluxo nas duas estirpes de <i>E. coli</i> , AG100 e AG100A.....	46
Tabela 10 – Valores obtidos de CMI para os antibióticos e EtBr na presença dos inibidores de sistemas de efluxo (a ½ da CMI) para as duas estirpes de <i>E. coli</i> , AG100 e AG100A.	48

Lista de Abreviaturas

ATP	Adenosina Trifosfato, do inglês “adenosine 5’-triphosphate”
ATPase	Adenosina Trifosfatase, do inglês “adenosine triphosphatase”
ABC	Adenosine triphosphate (ATP)-Binding Cassette
CCCP	Carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona
CLSI	“Clinical and Laboratory Standards Institute”
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CPZ	Cloropromazina
DioC₂	Corante “3,3’-diethyloxacarbocyanine iodide”
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
EtBr	Brometo de etídeo, do inglês “Ethidium Bromide”
IE	Inibidor de efluxo
FPM	Força Proto-Motriz
KAN	Canamicina, do inglês “Kanamycin”
LA	Luria Bertani Agar
LB	Luria Bertani Broth
MATE	“Multidrug And Toxic compound Extrusion”
MDR	Resistência a múltiplos compostos, do inglês “Multidrug Resistance”
MFP	Proteína Membranar de Fusão, do inglês “Membrane Fusion Protein”
MFS	“Major Facilitator Superfamily”
MHB	“Mueller-Hinton broth”
NBDs	Domínio de ligação de nuceóticos, do inglês “Nucleotids Bedings Domains”

NMP	Arilpiperazinas do inglês “(1(1-NaphthylMethylPiperazine))”
μl	microlitro
mg	miligrama
ml	mililitro
Na₃ VO₄	Ortovanadato de sódio
OFX	Ofloxacina
OMP	Proteína membrana externa, do inglês “Outer Membrane Protein”
OXA	Oxacilina
PaβN	Fenilalanil-arginil-β-nafilamida
PBS	Tampão fosfato salino, do inglês “Phosphate Buffered Saline”
PBP`s	“Penicilin Binding Protein”
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês “ribonucleic acid”
RND	“Resistance Nodulation Division”
RFF	Fluorescência relativa final, do inglês “Relative Final Fluorescence”
SMR	“Small Multidrug Resistance”
TCA	Via dos ácidos tricarboxílicos ou Ciclo de Krebs
TET	Tetraciclina
TMS	Segmentos transmembranares
TZ	Tioridazina
VP	Verapamil
Δμ H⁺	Gradiente protónico transmembranar
Δψ	Potencial de membrana

1. INTRODUÇÃO

1.1 Enterobacteriaceas

As Enterobacteriaceas constituem uma família numerosa, composta por bacilos Gram- negativos, aeróbios-anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, imóveis ou móveis, com flagelos peritricos, fermentadores de glucose, catalase positivos e citocromo-oxidase negativos. Fazem parte da flora indígena do Homem e de outros mamíferos e encontram-se dispersas na natureza colonizando um vasto número de habitats (Ferreira *et al.*, 2010).

Os microrganismos desta família são causadores de infecções humanas, podendo estas ser urinárias ou entéricas, com uma elevada morbilidade e mortalidade. As infecções causadas por microrganismos desta família constituem um sério problema de saúde pública devido à elevada emergência de estirpes com resistência aos principais grupos de antibióticos, como os β -lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos, principalmente em ambiente hospitalar (de Sousa *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2010).

De entre os géneros incluídos nesta família destacam-se *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* e *Yersinia* (Ferreira *et al.*, 2000; Walker, 1998).

1.1.1 *Escherichia coli* - Características gerais

Escherichia coli foi descrita por Theodor Escherich em 1885. Apresenta forma de bastonete com 0,5 μm de diâmetro e 1,5 μm de comprimento (Ferreira *et al.*, 2010; de Sousa *et al.*, 2000). Possui dois tipos de apêndices, os flagelos e as fímbrias. Os flagelos permitem a mobilidade e as fímbrias proporcionam a adesão da bactéria, impedindo a sua eliminação pela urina ou fezes líquidas (Neidhardt *et al.*, 1990).

Este microrganismo é frequentemente utilizado como modelo em estudos de bioquímica molecular e microbiana, devido ao reduzido tempo de geração e à reduzida necessidade de requisitos nutricionais (Berg *et al.*, 2004).

Parede celular

E. coli e todas as outras bactérias Gram-negativas caracterizam-se por possuírem uma parede celular relativamente simples (Figura 1). A região mais interna da parede celular é a membrana plasmática, composta por uma bicamada de fosfolípidos intercalados com proteínas de membrana. Esta regula o transporte de metabolitos para o interior e para o exterior do citoplasma, controlando a pressão osmótica e o pH. A membrana plasmática é seguida do periplasma, um espaço elástico, flexível e relativamente poroso, constituído por uma camada fina de peptidoglicano que confere rigidez e dá forma à célula (Molloy *et al.*, 2000; Stratton, 2002). Adjacente a esta camada de peptidoglicano encontra-se a membrana externa, exclusiva das bactérias Gram-negativas, correspondendo a uma segunda bicamada lipídica (semelhante à membrana plasmática), que contém fosfolípidos, lipoproteínas, proteínas e lipopolissacarídeos.

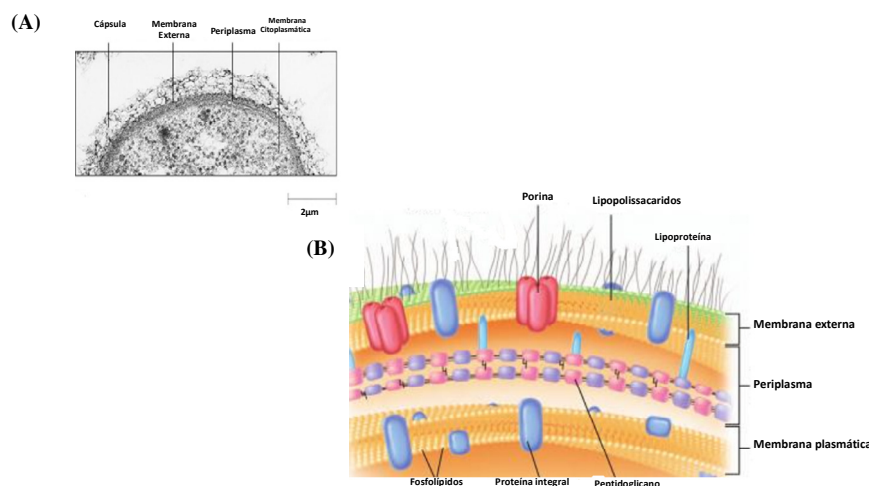


Figura 1. Composição da parede celular das bactérias Gram-negativas. (A) Observação por microscopia electrónica da parede celular de bactérias Gram-negativas; (B) Representação esquemática da constituição da parede celular de bactérias Gram-negativas, com os organelos da membrana plasmática, periplasma e membrana externa (Adaptado de Ryan *et al.*, 2010).

A membrana externa funciona como uma barreira de permeabilidade, prevenindo a entrada de substâncias tóxicas para o microrganismo, tais como antibióticos, corantes, detergentes e desinfetantes (Hancock, 1997; Nikaido, 1994; Stratton, 2002). No entanto, esta membrana não é totalmente impermeável pois permite a passagem de substâncias para o interior e para o exterior da célula. Grande parte deste fluxo ocorre por meio de proteínas ou canais específicos ancorados na membrana externa, designadas por proteínas de membrana externa (OMP; do inglês “Outer Membrane Protein”), ou simplesmente porinas. As porinas são proteínas estruturais que formam canais permitindo a difusão espontânea de pequenos solutos inespecíficos (Nikaido, 1994; Ferreira *et al.*, 2010). Em *E. coli* as principais porinas são a OmpC e OmpF (Nikaido *et al.*, 1983). Estas são proteínas estruturais que possibilitam a difusão passiva de pequenos solutos mas minimizam a penetração de compostos nocivos e de grandes dimensões, diminuindo o influxo da maioria dos antibióticos (Nikaido, 1992). Uma outra porina, a OmpA é uma proteína monomérica que permite uma difusão lenta e específica de pequenos solutos. Existem também, porinas de elevada especificidade em *E. coli* como a LamB, que facilita a difusão de maltose, a OprB que é específico para o transporte de glucose, e a OprP um canal específico do fosfato (Nikaido, 1992; Nikaido, 1994).

Muitas das proteínas de membrana são enzimas, que catalisam várias reacções biossintéticas e processos bioenergéticos. De forma generalizada sabe-se que as moléculas lipossolúveis atravessam as membranas biológicas com menor grau de dificuldade enquanto as moléculas insolúveis em lípidos não tem capacidade para atravessar a membrana (Stratton, 2002). Deste modo, necessitam de transportadores ou canais proteicos hidrofílicos, que recorrem a intermediários responsáveis pela energia necessária para a translocação membranar. Como exemplos destes intermediários temos a energia livre proveniente da hidrólise de ATP (ATPases), a energia luminosa e a dissipação do gradiente iónico (Poole *et al.*, 2007). Estas proteínas transportadoras, denominadas por bombas de efluxo, por oposição às proteínas estruturais. Transportam agentes químicos tóxicos para a célula para o exterior através de canais específicos localizados na membrana externa, diminuindo a sua concentração dentro da célula (Pagès *et al.*, 2005).

1.1.2 Características bioquímicas

O habitat natural de *E. coli* é o lúmen intestinal humano e de outros mamíferos. Consegue estabelecer uma relação simbiótica no intestino humano, uma vez que possui a capacidade de produzir vitaminas que são absorvidas pelo hospedeiro, usando a glucose por ele fornecida de modo a obter todos os constituintes celulares necessários à sua sobrevivência. Sendo mesófilo é capaz de crescer a temperaturas entre 8 °C e 48 °C, sendo a temperatura ótima de crescimento de 37 °C. É um fermentador de lactose e lisina descarboxilase, ornitina descarboxilase e β -galactosidade positivos (Ferreira *et al.*, 2010; de Sousa *et al.*, 2000; Willey *et al.*, 2011).

1.1.3 Vias metabólicas – produção de energia

Em qualquer ser vivo o crescimento é um processo dinâmico que requer energia e nutrientes para a síntese dos componentes celulares e manutenção celular (Ferreira *et al.*, 2010). Existem muitos factores que afectam o crescimento microbiano tais como a temperatura, disponibilidade de água, pH, oxigénio e macro e micronutrientes essenciais. Todos os microrganismos são caracterizados quanto às suas necessidades nutricionais, em função da fonte de energia e da fonte de carbono (Ferreira *et al.*, 2010).

Os organismos heterotróficos, aeróbios - anaeróbios facultativos, como *E. coli* retiram energia das mais diversas moléculas orgânicas. A glucose é uma delas. É um açúcar muito utilizado devido à sua fácil metabolização e funciona como fonte de carbono e fonte de energia. A conversão metabólica das moléculas orgânicas em energia ocorre por um processo designado por catabolismo¹. *E. coli* possui quatro vias metabólicas para a conversão de carbono e oxigénio em energia. Essas vias são:

- a) *Fermentação da glucose* – quando a bactéria se encontra desprovida de oxigénio, ocorrendo fermentação da glucose e produzindo essencialmente

¹ Catabolismo é uma das vias de reacções químicas que ocorrem no interior da célula (metabolismo), esta via é responsável pela degradação de moléculas, enquanto a biossíntese de moléculas é uma outra via denominada de anabolismo.

etanol, acetato, formato, succinato e lactato. Esta via anaeróbia produz três moléculas de ATP, uma de acetato, uma de etanol e duas de formato por cada molécula de glucose fermentada, traduzindo-se num rendimento energético de 0,5 moles de ATP por mole de glucose consumida.

- b) *Oxidação da glucose* – quando a bactéria se encontra na presença de oxigénio, de forma não limitante. Este processo ocorre por etapas: 1) transporte da glucose para o citoplasma através de um sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferase. Este processo está associado à fosforilação da glucose a glucose-6-fosfato. Já no citoplasma, ocorre 2) a degradação da glucose-6-fosfato a piruvato pela glicólise, ou via de Embden-Meyerhof-Parnas. Posteriormente, 3) a molécula de piruvato sofre descarboxilação oxidativa formando a acetil-coenzimaA pela enzima piruvato desidrogenase. 4) Oxidação do acetil-CoA a dióxido de carbono pela via dos ácidos tricarboxílicos (TCA) ou ciclo de Krebs, onde é gerada energia e poder redutor, para além de macromoléculas intermediárias do processo, *p.e.* oxaloacetato e α -cetoglutarato. Por último, 5) na membrana citoplasmática ocorre a fosforilação oxidativa das coenzimas reduzidas na cadeia transportadora de electrões. A cadeia transportadora de electrões ou respiração é um processo de produção de ATP no qual os complexos actuam como dadores de electrões através de uma cadeia transportadora para aceitadores de electrões. Durante essa transferência de electrões, o aceitador final fica carregado negativamente e combina-se com os protões (H^+) em solução que são transportados para fora da membrana citoplasmática, formando a força protomotriz (FPM), responsável pela variação de pH (ΔpH) e pelo potencial de membrana ($\Delta \Psi$) devido à distribuição desigual de cargas (Dimroth *et al.*, 2000). Com a passagem dos protões novamente para o citoplasma, porque ambos os parâmetros actuam em sentidos opostos, a energia da FPM é catalisada pela ATPase, conduzindo à formação de ATP. Uma vez que a membrana citoplasmática é impermeável ao H^+ , os protões apenas poderão reentrar em locais específicos onde através das ATPases ocorre a síntese de ATP (Ferreira *et al.*, 2010; Murray *et al.*, 2005).

- c) *Oxidação e fermentação da glucose* – em condições aeróbias, mas com glucose em excesso. Neste caso pode ocorrer a via fermentativa originando compostos de baixo peso molecular sendo o acetato é o composto formado com maior frequência.
- d) *Oxidação do acetato* – o acetato formado na via fermentativa pode ser oxidado e usado como fonte de carbono secundária. Quando o acetato é a única fonte de carbono, os compostos intermediários do TCA são produzidos pelo ciclo de glioxilato que é inibido pela presença de glucose (Carlson *et al.*, 2004; Murray *et al.*, 2005).

1.2 Agentes antimicrobianos e seus mecanismos de acção

O desenvolvimento e uso de antibióticos constituíram um passo importante para o controlo de doenças infecciosas. Contudo, o aparecimento de estirpes resistentes tornou muitos dos correntes antibióticos ineficazes. Como consequência, doenças infecciosas como a tuberculose reemergiram e constituem actualmente um grave problema de saúde pública (Putman *et al.*, 2000). O termo antibiótico designa uma substância que é produzida por um determinado microrganismo, antagonista do crescimento de outros microrganismos (Martins *et al.*, 2008). Os antibióticos podem ser classificados como bacteriostáticos se inibirem o crescimento do microrganismo sem afectar a sua viabilidade, ou bactericidas se afectarem a viabilidade do microrganismo (Hancock, 2005). Os agentes antimicrobianos englobam antibióticos de origem natural bem como compostos sintéticos capazes de inibir o crescimento ou afectar a viabilidade bacteriana (Mandingan *et al.*, 1997).

O uso de agentes antimicrobianos, utilizados isoladamente ou em combinação, depende em grande parte, do conhecimento do seu mecanismo de acção e da sua interacção com a célula bacteriana (Martins *et al.*, 2008). Os antimicrobianos afectam a viabilidade dos microrganismos através de cinco mecanismos: (1) inibição da síntese da parede celular, (2) inibição da síntese proteica, (3) inibição da síntese de ácidos nucleicos, (4) inibição competitiva de metabolitos essenciais, e (5) alteração da permeabilidade da membrana celular (Pagès *et al.*, 2005).

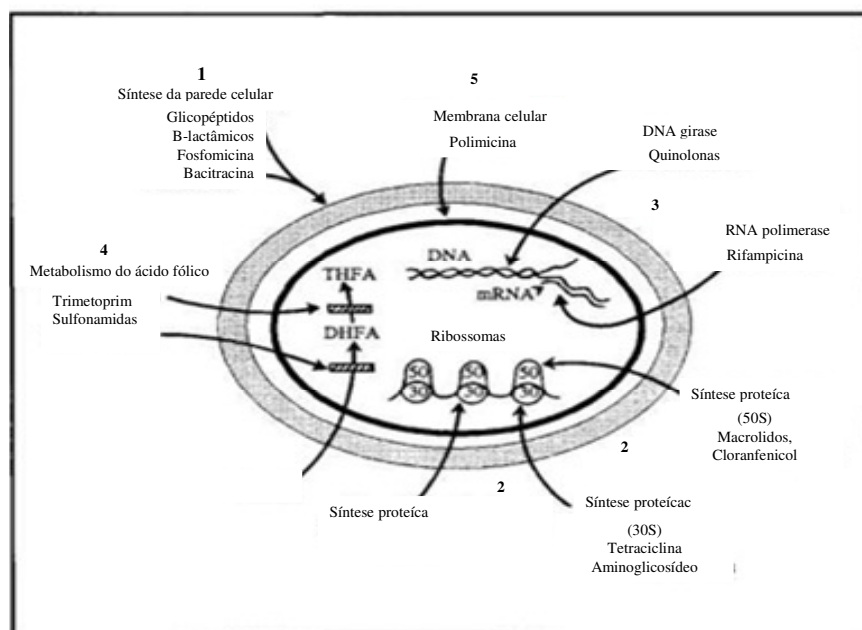


Figura 2. Representação esquemática dos principais mecanismos de acção de agentes antimicrobianos. 1) Inibição da síntese da parede celular, 2) inibição da síntese proteica, 3) inibição da síntese de ácidos nucleicos, 4) inibição por competição de metabolitos e 5) alteração da permeabilidade membranar (Adaptado de Prescott *et al.*, 2002).

A **inibição da síntese da parede celular** é um dos mecanismos mais comuns. A maioria dos antibióticos com este modo de acção são os β -lactâmicos (penicilinas, ampicilinas, cefalosporinas e cefamicinas) (Prescott *et al.*, 2002). Estes antibióticos provocam defeitos estruturais na parede celular bacteriana, suprimem a formação de uma parede celular rígida, afectando a pressão osmótica da célula, resultando na sua ruptura. Essas alterações devem-se à interacção das PBPs (do inglês “Penicillin Binding Protein”) sobre os tetrapéptidos do peptidoglicano, inibindo a sua síntese (Lomovskaya *et al.*, 2001; Poole *et al.*, 2007).

A **inibição da síntese proteica** pode ocorrer por inibição da síntese de RNA ou por inibição completa da síntese proteica. Dentro desta classe encontram-se (i) os aminoglicosídeos que actuam directamente na unidade ribossomal 30S, provocando alterações nas diferentes fases da síntese proteica; ii) os anfenicóis (cloranfenicol e tianfenicol) que se ligam reversivelmente à subunidade ribossomal 50S inibindo a ligação do tRNA e bloqueando a síntese do polipéptido (Poole *et al.*, 2007; Lomovskaya *et al.*, 2001) e a iii) tetraciclina, que inibe a síntese proteica através da sua ligação à sub-

unidade ribossomal 30S causando a interrupção da ligação do complexo tRNA-aminoácido ao ribossoma impedindo o alongamento proteico.

Outro mecanismo é a **inibição da síntese de ácidos nucleicos**. Os antibióticos com este modo de acção actuam directamente nos ácidos nucleicos, ligando-se ou à subunidade β da RNA polimerase, inibindo a transcrição (*p.e.* rifampicina) ou ligando-se à DNA girase e/ou topoisomerases (II e IV), inibindo o processo de replicação de DNA (*p.e.* quinolonas) (Lomovskaya *et al.*, 2001).

Existem outros antimicrobianos que actuam como **inibidores competitivos** bloqueando o funcionamento das vias metabólicas por inibição competitiva entre metabolitos e enzimas essenciais. Como exemplo deste modo de acção temos as sulfonamidas, que bloqueiam passos sucessivos da síntese do ácido fólico necessário à sobrevivência das bactérias (Prescott *et al.*, 1999). Por último, existem antimicrobianos que afectam a **integridade da membrana celular**. Estes provocam alterações na integridade da membrana alterando a sua permeabilidade. Antimicrobianos como as polimixinas e tirotricinas desorganizam e originam orifícios na membrana que conduzem à perda de metabolitos essenciais para a sobrevivência da célula (Martins *et al.*, 2008).

Os antibióticos mais utilizados no tratamento de infecções causadas por *E. coli* (principalmente infecções urinárias) são a sulfonamida, trimetoprim, amoxicilina, ciprofloxacina e outras quinolonas. No entanto, a amoxicilina tem-se tornado ineficaz no tratamento de infecções urinárias, devido à emergência de estirpes resistentes (Piddock *et al.*, 2006).

Tabela 1 – Mecanismos de acção de alguns agentes antimicrobianos mais utilizados na terapêutica de infecções bacterianas (Adaptado de Murray *et al*, 2005).

<i>Classe de Antimicrobiano</i>	<i>Modo de acção</i>	<i>Alvo</i>
β-lactâmicos	Inibição da síntese de peptidoglicano	Ligação às PBPs e enzimas responsáveis pela síntese do peptidoglicano
Aminoglicosídeos	Inibição da síntese proteica (provoca erros de leitura no mRNA)	Subunidade ribossomal 30S
Cloranfenicol	Inibição da síntese proteica (impede a ligação do tRNA)	Subunidade ribossomal 50S
Macrólidos	Inibição da síntese proteica (previne elongação dos polipéptidos)	Subunidade ribossomal 50S
Quinolonas	Inibição da síntese de DNA	DNA gyrase e topoisomerase IV
Rifampicina	Inibição da síntese de RNA	RNA polimerase dependente de DNA
Sulfonamidas	Interrupção da síntese de ácido fólico	Enzima “synthase dihydropteroate”
Tetraciclínas	Inibição da síntese proteica	Subunidade ribossomal 30S

1.3 Mecanismos de resistência aos antibióticos

Ao longo dos anos, o uso contínuo de agentes antimicrobianos tem levado os microrganismos a desenvolverem mecanismos de resistência que os ajudam na sua sobrevivência. Esses mecanismos são a causa da resistência múltiplos compostos, comumente designada por multirresistência (MDR; do inglês “Multi Drug Resistance” (Giedraitiene *et al.*, 2011). As bactérias são dadas como resistentes quando ocorre um aumento da concentração mínima inibitória (CMI) determinada, com consequente redução da eficácia clínica do antibiótico. A CMI é definida como a menor

concentração do antibiótico à qual ocorre inibição do crescimento do microrganismo (Pallasch, 2003).

A resistência de um microrganismo a um determinado agente antimicrobiano pode ser intrínseca ou adquirida (Blair *et al.*, 2009). A **resistência intrínseca** ou resistência natural define-se como uma característica natural, que permite à bactéria controlar ou bloquear a acção do agente antimicrobiano. Esta surge como consequência de processos adaptativos e sem que seja necessária a aquisição de informação genética adicional. Dois dos mecanismos considerados como principais causas desta resistência são a reduzida permeabilidade da membrana e os sistemas de efluxo activos (Normark *et al.*, 2002). A reduzida permeabilidade da membrana influencia fortemente o acesso do antibiótico ao interior da célula uma vez que para que o antimicrobiano atinja o seu alvo celular tem de ultrapassar barreiras físicas, como o envelope celular. As penicilinas lipofílicas (*p.e.* oxacilina), a eritromicina, a novobiocina, o ácido fusídico e as quinolonas são exemplos de antimicrobianos que proporcionam elevada resistência intrínseca em bactérias Gram-negativas (Nikaido, 1998). Os principais mecanismos que estão associados à redução do influxo do composto são a permeabilidade da bicamada fosfolipídica da membrana externa, as características das porinas de membrana e as proteínas de transporte membranas. A **resistência adquirida** refere-se ao desenvolvimento de resistência numa dada estirpe anteriormente sensível ao antimicrobiano em questão. Pode ocorrer com o aparecimento de mutações espontâneas num gene alvo, ou por transferência de genes através de diversos elementos móveis tais como plasmídeos, transposões e integrões (Giedraitiene *et al.*, 2011). Para além da aquisição de mutações, podem desenvolver outros mecanismos, tais como: a inactivação ou decomposição enzimática do antimicrobiano, alteração da molécula alvo, redução da permeabilidade da membrana para o composto, falha na activação dos antimicrobianos no interior da célula, super-produção dos locais alvo e extrusão activa do composto (Fluit *et al.*, 2001; Giedraitiene *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2005; Mahamound *et al.*, 2007; Poole *et al.*, 2005; Tennover *et al.*, 2006; Yamada *et al.*, 2006).

Um exemplo de produção de enzimas bacterianas que inactivam o composto antimicrobiano é a enzima β -lactamase. Esta promove a hidrólise do anel β -lactâmico,

evitando que este actue nas proteínas de ligação não afectando deste modo a síntese do peptidoglicano. Relativamente aos aminoglicosídeos, este mecanismo também pode ocorrer através da produção de acetiltransferases aminoglicosídicas (AAC), nucleotidiltransferases aminoglicosídicas (ANT) e fosfotransferases aminoglicosídicas (APH). As enzimas AAC modificam por acetilação os aminoglicosídeos com grupo amino e as ANT e APH modificam por fosforilação os aminoglicosídeos com grupo hidroxil. Estes perdem assim a capacidade de se ligar ao ribossoma impedindo a inibição da síntese proteica (Fluit *et al.*, 2001; Nikaido, 2009; Putman *et al.*, 2000).

Um outro mecanismo de resistência é a ocorrência de mutações ou a modificação de alvos celulares. Estas são causadas por alterações enzimáticas e proporcionam uma redução na afinidade do antibiótico para com o seu local de ligação. Um exemplo deste mecanismo é a redução de afinidade dos macrólidos ao ribossoma através da metilação da subunidade 23S do ácido ribonucleico ribossomal (rRNA) (Poole *et al.*, 2007; Putman *et al.*, 2000).

A resistência às sulfonamidas em *Enterococcus* é um exemplo de super produção de moléculas alvo resultando na super-produção de ácido para-aminobenzóico (Pallasch, 2003). A redução de permeabilidade da parede celular ocorre quer por diminuição na expressão dos poros da membrana externa, quer por fecho destes mesmos canais (Pallach, 2003) ou pela expulsão do antibiótico para o exterior, mediada por bombas de efluxo (Grkovic *et al.*, 2002; Poole *et al.*, 2007).

De entre os mecanismos anteriormente referidos, nesta tese apenas analisamos a resistência mediada por bombas de efluxo em *Escherichia coli*.

1.4 Sistemas de efluxo em *E. coli*

Para combater a MDR e os problemas que daí advêm é importante investir em várias estratégias como o desenvolvimento de compostos com capacidade de contornar ou bloquear bombas de efluxo de forma a restaurar e preservar a função do antimicrobiano (Mahamound *et al.*, 2007). Inicialmente, o único mecanismo conhecido que justificasse a resistência intrínseca era a barreira de permeabilização denominada de membrana externa. Agora sabe-se que a resistência intrínseca é resultado quer da

barreira de permeabilização quer da promíscua actividade das bombas de efluxo que nela se encontram (Machado *et al.*, 2012, dados não publicados).

Os sistemas de efluxo são proteínas de membrana específicas de transporte de substâncias para o exterior da célula. Estas proteínas podem ser codificadas em plasmídeos ou no cromossoma bacteriano, e podem ser específicas, facilitando o efluxo de exclusivamente um substrato, ou inespecíficas se transportarem vários substratos, desde antibióticos a corantes e biocidas (Langton *et al.*, 2005; Piddock *et al.*, 2006).

A existência de sistemas de efluxo encontra-se descrita quer em células procariotas quer em eucariotas. Em 1980 foi descrito o primeiro sistema de efluxo em procariotas, documentado pelo estudo do efluxo de tetraciclina em *E. coli* (Langton *et al.*, 2005). Ao longo dos últimos anos, com a sequenciação do genoma bacteriano uma grande variedade de proteínas de transporte, em diferentes espécies, foi já descrita. Na sua maioria, estes sistemas de efluxo potenciam a saída de vários compostos do interior da célula, incluindo não só agentes antimicrobianos mas também corantes, detergentes e solventes orgânicos (Li *et al.*, 2009).

A resistência mediada por bombas de efluxo não está só descrita em bactérias, mas também em outros microrganismos, tais como fungos (*Candida albicans* - CaMDR1) e parasitas (*Plasmodium falciparum* – PfMDR). Neste sentido, os sistemas ou bombas de efluxo são proteínas ubíquas localizadas na membrana citoplasmática de todos os tipos de células (Marquez *et al.*, 2005).

Os sistemas de efluxo podem ser classificados em duas grandes classes, de acordo com as suas características bioenergéticas e estruturais: 1) transportadores primários; e 2) transportadores secundários. Os primeiros são sistemas dependentes de ATP e os segundos actuam com base no gradiente do potencial electroquímico da membrana plasmática, a FPM (Bambeke *et al.*, 2000; Levy, 2002; Marquez *et al.*, 2005).

1.4.1 Transportadores primários

Os transportadores primários englobam a superfamília de transportadores “*ATP Binding Cassette*” ou também denominada de superfamília ABC. Estes transportadores são proteínas integrais de membrana que facilitam o transporte de moléculas através da membrana lipídica contra o gradiente de concentração, utilizando energia derivada da hidrólise de ATP (Moussatova *et al.*, 2008). Estas proteínas estão presentes em todos os sistemas de membrana da célula e desempenham um papel importante no transporte de toxinas, antimicrobianos e de muitas outras substâncias incluindo açúcares, aminoácidos, iões, polissacarídeos e proteínas (Marquez *et al.*, 2005; Piddock, 2006; Bambeke *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2009).

Os transportadores ABC são constituídos por seis a doze domínios transmembranares (TMDs). Entre estes, encontram-se dois domínios de ligação de nucleotídeos (NBDs) e dois domínios que reconhecem o agente a ser transportado. Os NBDs são proteínas solúveis em água associadas aos TMDs num dos lados da membrana. Os TMDs são as estruturas que formam o canal transportador. A estrutura destes transportadores, tal como o seu número de hélices transmembranares, podem variar entre oito e 20. Em contrapartida, os NBDs são altamente conservadas com os motivos A e B, que são característicos de todas as proteínas de ligação de ATP. Estas pontes de ligação são específicas dos transportadores ABC, pois é neste local que o ATP se liga e ocorre a sua hidrólise que, por sua vez, provoca a libertação de um protão para que ocorra o transporte (Moussatova *et al.*, 2008, Kumar *et al.*, 2005).

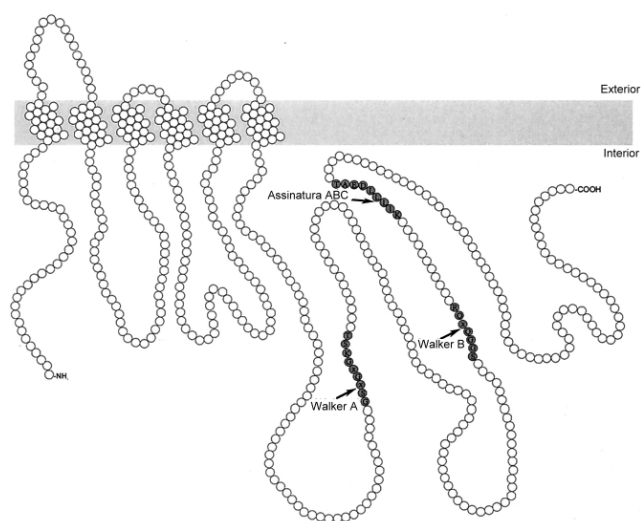


Figura 3 – Representação esquemática do modelo estrutural da super família “ATP binding cassette” (Adaptado de Putman *et al*, 2000).

Em células procariotas encontram-se descritas cerca de 21 proteínas transportadoras pertencentes a esta família (Kumar *et al.*, 2005). Algumas destas proteínas estão envolvidas na extrusão de apenas um antimicrobiano, e outras são responsáveis pelo transporte de vários compostos. Como transportadores específicos, *E. coli* possui a proteína BtuCD, responsável pela extrusão da vitamina B12. Por sua vez, a bomba LmrA nos *Lactococcus lactis*, o transportador Sav1866 em *Staphylococcus aureus* e a MsbA em *E. coli* são responsáveis pelo transporte de vários compostos (Moussatova *et al.*, 2008).

Em mamíferos também foram descritos dois dos mais importantes transportadores desta superfamília, o MDR1 e MDRP1. Estes transportadores existem em diferentes tipos de células do organismo humano, incluindo em células importantes do sistema imunitário como linfócitos, monócitos e macrófagos (Poole, 2000). A P-glicoproteína (MDR1) é responsável pela extrusão de citocinas e antibióticos como fluoroquinolonas, macrolídeos, β -lactâmicos e tetraciclina (Bambeck *et al.*, 2003).

1.4.2 Transportadores secundários

Os transportadores secundários medeiam o transporte de moléculas através de um gradiente electroquímico, denominado FPM. Este gradiente electroquímico consiste num gradiente de potencial electroquímico e um gradiente químico de protões. Os transportadores secundários funcionam por antiporte mediando o efluxo de compostos à custa da translação de protões (ou iões). Este tipo de transportadores encontra-se na sua grande maioria em bactérias e leveduras (Langton *et al.*, 2005; Paulsen *et al.* 1996.). Com base no tamanho e semelhanças nas estruturas primárias e secundárias estes transportadores são subdivididos em quatro famílias (Marquez, 2005): “Major Facilitator Superfamily” (MFS); Família “Resistance Nodulation and cell Division” (RND); Família “Small Multi-drug Resistance” (SMR); Família “Multidrug and Toxic compound Extrusion” (MATE), representadas na Figura 4.

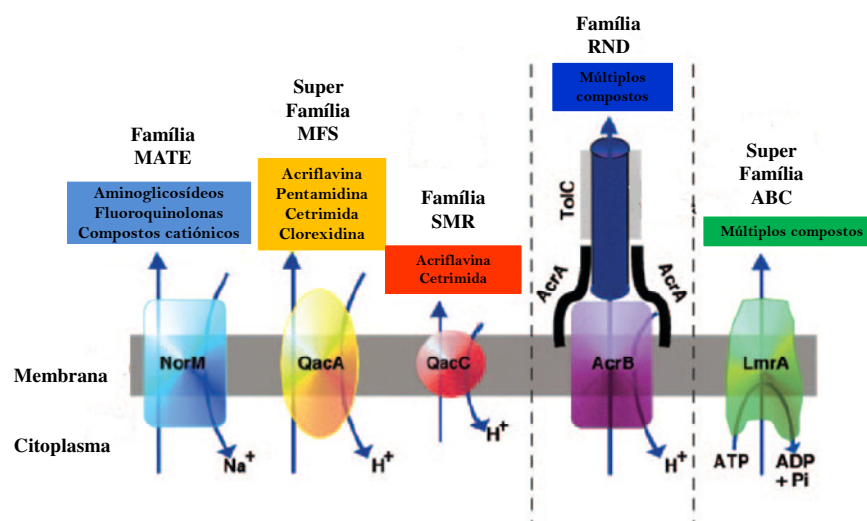


Figura 4 - Esquema das cinco classes representativas das respectivas famílias de bombas de efluxo (Adaptado de Piddock *et al.*, 2006).

1.4.2.1 “Major Facilitator Superfamily” (MFS)

Os transportadores da família MFS são proteínas integrais de membrana responsáveis pelo transporte (influxo) de açúcares, aminoácidos entre muitos outros nutrientes e pela extrusão de metabolitos intermediários, toxinas celulares e

antimicrobianos por mecanismos de antiporte ou simporte (Putman *et al.*, 2000; Bambeke *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2009). Os substratos destes transportadores são eritromicina, tetraciclina, sulfamida, fluoroquinolona, rifampicina e cloranfenicol (Bambeke *et al.*, 2000). As proteínas transportadoras da família MFS podem ser divididas em dois grupos, de acordo com o seu número de segmentos transmembranares – *transmembrane segments* (TMS): o primeiro com 12 TMS e o segundo com 14 TMS.

O grupo com 12-TMS corresponde a transportadores de múltiplos compostos. Como exemplo deste grupo temos a proteína NorA de *Staphylococcus aureus* foi a primeira a ser descrita. Esta bomba confere resistência a compostos hidrofílicos (Putman *et al.*, 2000). Um homólogo à proteína de transporte NorA foi encontrado em *Bacillus subtilis*. Em *E. coli* foram descritas três proteínas de membrana a Bcr, EmrD e MdfA. A proteína Bcr confere resistência à biciclomicina. A proteína EmrD é homóloga da Bcr e protege a célula de desacopladores energéticos, como o carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP). Por último, a proteína MdfA conhecida como bomba específica para o clorofenicol (Putman *et al.*, 2000).

O grupo com 14-TMS engloba transportadores de múltiplos compostos inclusive detergentes e desinfetantes. Neste grupo encontra-se incluída a proteína QacA de *S. aureus*. Em *E. coli* foram identificadas as proteínas EmrA e EmrB. A proteína EmrB é homóloga à QacA e a proteína EmrA é uma proteína de fusão permitindo a formação de um dímero EmrAB, responsável pela extrusão de antibióticos hidrofóbicos e desacopladores energéticos (Piddock *et al.*, 2006; Putman *et al.*, 2000).

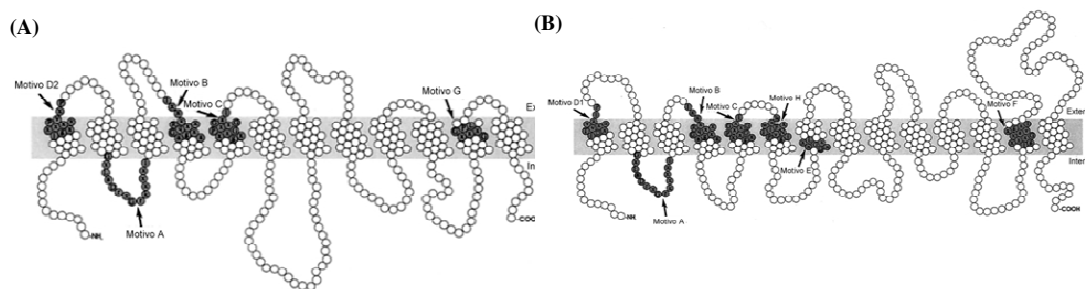


Figura 5 -Representação esquemática do modelo estrutural dos transportadores MFS com 12-TMS (A) e 14-TMS (B) (Adaptado de Piddok *et al.*, 2006 e de Putman *et al.*, 2000).

1.4.2.2 Família “Small Multi-drug Resistance” (SMR)

Os transportadores da família SMR são conhecidos por apresentarem um comprimento reduzido, com cerca de 100 resíduos de aminoácidos e quatro TMS (Borges-Walmsley *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2009; Putman *et al.*, 2000). Devido ao seu tamanho, os transportadores desta família funcionam como complexo homooligomérico ou heterooligomérico (Marquez *et al.*, 2005; Putman *et al.*, 2000). Os transportadores desta família utilizam antiporte substrato/protão através da FPM, para induzir a saída de catiões lipofílicos, detergentes e desinfetantes. São transportadores desta família as proteínas Smr de *S. aureus*, a ErmE de *E. coli.*, a Mmr de *M. tuberculosis* (Borges-Walmsley *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2009; Marquez *et al.*, 2005; Putman *et al.*, 2000).

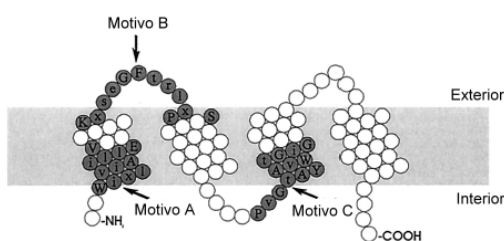


Figura 6 – Representação esquemática do modelo estrutural das bombas SMR (Adaptado de Kumar *et al.*, 2005 e Putman *et al.*, 2000).

1.4.2.3 Família “Multidrug and Toxic compound Extrusion” (MATE)

Os membros da família MATE exibem uma topologia de membrana semelhante à família MFS. No seu modelo estrutural apresentam aproximadamente 450 aminoácidos (Borges-Walmsley *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2009). Esta família inclui as proteínas transportadoras NorM de *Vibrio parahaemolyticus*, a PmpM de *P. aeruginosa*, a MepA de *S. aureus* e a YdhE de *E. coli.* Estas são responsáveis pela extrusão de fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, detergentes e corantes, através de um gradiente electroquímico, muitas vezes mediado por iões de sódio (Borges-Walmsley *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2009; Piddock *et al.*, 2006).

1.4.2.4 Família “Resistance Nodulation and cell Division” (RND)

Os membros da família de transportadores RND são majoritariamente bactérias Gram-negativas. Esta família tem um papel importante tanto na resistência intrínseca como na resistência adquirida (Blair *et al.*, 2009; Langton *et al.*, 2005). Os transportadores RND são codificados majoritariamente no cromossoma. Estas proteínas são constituídas por grandes cadeias polipeptídicas com cerca de 1300 resíduos de aminoácidos. Todos os membros desta família catalisam o efluxo de substratos por um mecanismo de antiporte mediado por iões H^+ (Li *et al.*, 2009). A estrutura secundária das proteínas transportadoras RND é composta por 12 TMS com dois “loops” de grande porte entre o TMS um e dois e TMS sete e oito (Putman *et al.*, 2000).

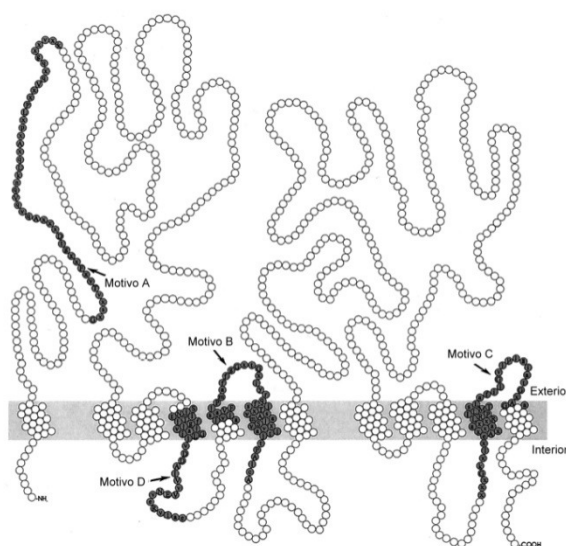


Figura 7 - Representação esquemática do modelo estrutural da bomba de efluxo da família RND (Adaptado de Putman *et al.*, 2000 e de Piddock *et al.*, 2006).

Os transportadores RND funcionam formando complexos compostos por uma estrutura tripartida, uma proteína de transporte membranar com 12 TMS, uma proteína membranar de fusão (MFP, do inglês “membranar fusion protein”) localizada no espaço periplasmático e uma proteína membranar externa (Omp) (Marquez *et al.*, 2005;

Piddock *et al.*, 2006; Putman *et al.*, 2000; Bambeke *et al.*, 2000). Na extremidade amino-terminal de cada proteína, a cadeia polipeptídica atravessa a membrana citoplasmática, do citoplasma para o periplasma, seguida de um domínio hidrofóbico situado no periplasma. A cadeia polipeptídica atravessa a membrana mais de seis vezes antes de emergir novamente no periplasma. As três proteínas citadas têm como função facilitar o transporte do substrato através da membrana interna e externa. Esta cooperação de proteínas foi demonstrada com o sistema AcrAB-TolC de *E. coli*. O sistema AcrAB-TolC é o mais bem estudado e caracterizado em *E. coli* (Li *et al.*, 2009); Langton *et al.*, 2005; Murakami *et al.*, 2003; Blair *et al.*, 2009). Os substratos desta família incluem compostos catiónicos, aniônicos, neutros e também anfifílicos (como emulsificantes, demulsificantes e detergentes) (Murakami *et al.*, 2003).

O genoma de *E. coli* revelou a presença de, pelo menos, 37 proteínas transportadoras: sete pertencem à super família ABC, 19 à MFS, um à MATE, cinco à SMR e sete à RND. Algumas dessas proteínas mais importantes em *E. coli* e respectivos substratos conhecidos encontram-se na Tabela 2 (Li *et al.*, 2009).

Tabela 2 - Tabela representativa de algumas bombas de efluxo em *E. coli* e possíveis substratos (Adaptado de Nikaído, 2009; Li *et al.*, 2009; Putman *et al.*, 2000).

<i>Sistema/Bomba/proteína</i>	<i>Possível (eis) substrato (s)</i>	<i>Família</i>
EmrE	AC, EtBr, MV, QAC	SMR
SugE	QAC	SMR
TehAB	DL, EtBr, KT, MV, PF	SMR
EmrAB-TolC	CCCP, EtBr, TL	SMR
MdtJ	DC, SDS, SP	MFS
EmrKY-TolC	DC	MFS
EmrD	CCCP	MFS
Dep	BM, CM, TC	MFS
MdfA/Cmr/CmlA	CM, EtBr, IPTG, PU, RD, RF, TC, TPP	MFS
TetA	TC	MFS
EmrB	CCCP, NA, TL, CH	MFS
Mef(B)	CM	MFS
QepA, QepA2	FQ	MFS
EmrD	CCCP	MFS
MdfA/Cmr/CmlA	EtBr, PM, TC, NO CP, IPTG, TPP, TC, PM	MFS
AcrAB-TolC	AC, BS, CM, CP, CV, EtBr, FA, FQ, ML, NO, OS, PN, SDS, TC, TM, TR, TX	RND
YdhE	AC, CPNO, TPP	RND
AcrEF-TolC	Semelhante ao sistema AcrAB-TolC	RND
AcrD	AG, DC, FU, NO	RND
Oqx B	CM, CP, EtBr,	RND
MdtBC	DC, NO	RND
YhiV	DC	RND
MacB	AZ, CL, EM, OL	ABC
MacAB-TolC	ML	ABC
YojI	MJ	ABC
YdhE	AC, FQ, TPP	MATE

AC-acriflavina, AG-aminoglicosídeos, AZ-azitromicina, BM-biciclomina, BS-sais biliares, CCCP - carbonil cianido m-chlorophenilhidrazono, CH-clorhexidina, CL-clindamicina, CM-cloranfenicol, CP-cefalosporinas, CV-violeta de cristal, DA – danorubicina, DC-“deoxycholate”, DL-decalíno, EtBr-brometo de etídio, EM-eritromicina, FA-ácidos gordos, FQ-fluoroquinolonas, FU-ácido fusídico, QAC-compostos amônio quaternários, IPTG-isopropil-β-D-thiogalactopiranosida, KM - Canamicina, KT-Telurite de potássio, ML-macrólidos, MJ- microcina J25, MV-violagénio de metil, NA-ácido nalidíxico, NO-novobiocina, OS-solventes orgânicos, OL- olchicine, PN-penicilinas, PM-polimixina B; PF- proflavina, PU-puromicina, PM-polimicina, PF-proflavina, RD- rodamina, SDS-sulfato de sódio dodecil, SP- spermidina, SF-sulfonamidas, TC-tetraciclina, TM-trimetoprim, TR-triclosan, TX-triton X-100, TPP-tetrapenilfosfona, TL- tiolactomicina

1.4.3 Sistema de efluxo AcrAB-TolC

O sistema AcrAB-TolC é um complexo tripartido formado por um conjunto de três proteínas: uma proteína membrana de fusão (AcrA), uma proteína membrana externa (TolC) e uma proteína transportadora de membrana interna (AcrB) que

cooperam entre si (Bohnert *et al.*, 2008, Ge *et al.*, 2002, Langton *et al.*, 2005, Murakami *et al.*, 2003, Piddock *et al.*, 2006). Recentemente, esta estrutura foi comprovada através de estudos de cristalografia de raios X a 35 Å, revelando um trímero composto por uma região transmembranar e uma protuberância que se estende para o citoplasma. A parte superior corresponde à proteína TolC, e apresenta um poro central em forma de funil com diâmetro interno de 30 Å. Este liga-se a um canal central, composto por três hélices com diâmetro de 50 Å, envolvido no transporte de substratos a partir do citoplasma. A proteína AcrB promove o transporte de prótons/substrato, por antiporte, através do gradiente electroquímico. A proteína AcrA (diâmetro de 40 Å) é responsável pela estabilização entre o complexo (Symmons *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2003). A proteína AcrA permite manter a estabilização da ligação entre a proteína AcrB e o canal TolC (Langton *et al.*, 2005; Murakami *et al.*, 2003; Piddock, 2006; Piddock *et al.*, 2009; Symmons *et al.*, 2009).

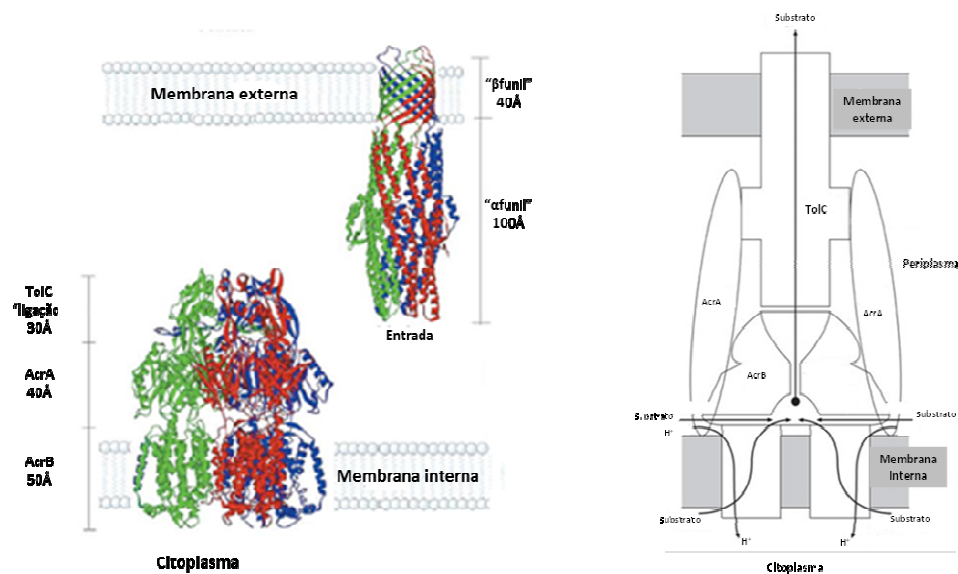


Figura 8 – Representação esquemática da estrutura do sistema de efluxo AcrAB-TolC (Adaptado de Pagès, 2005; Murakami, 2005)

O sistema AcrAB-TolC é responsável pela resistência a uma variedade de fármacos lipofílicos e anfifílicos, corantes e detergentes, incluindo tetraciclina, cloranfenicol, fluoroquinolonas, β -lactâmicos, eritromicina, novobiocina, ácido fusídico, ácido nalidíxico, brometo de etídio, acriflavina, violeta de cristal, sais biliares,

ácidos gordos, dodecil sulfato de sódio (SDS), Triton X-100 e triclosan (Piddock *et al.*, 2006; Blair *et al.*, 2009; Elkins *et al.*, 2002; Negano *et al.*, 2009).

A importância do estudo deste sistema de efluxo recai no facto de este estar associado a fenótipos de multirresistência com elevada relevância clínica. Estudos realizados em estirpes que apresentam o sistema de efluxo AcrAB-TolC inactivo revelam que estas são mais susceptíveis a alguns compostos do que a estirpe selvagem, o que poderá indicar que este sistema possui um papel na resistência intrínseca em *E. coli* (Piddock, 2006).

1.5 Inibidores de efluxo e mecanismos de acção

As bombas de efluxo poderão constituir novos alvos terapêuticos para o desenvolvimento de estratégias aplicadas no combate da resistência aos antimicrobianos. Pretende-se com a produção destas moléculas, diminuir a resistência intrínseca da bactéria aos antibióticos, reverter a resistência adquirida e ainda reduzir a frequência da emergência de estirpes mutantes (Pagès *et al.*, 2005).

A inibição da actividade de bombas de efluxo em bactérias Gram-negativas pode ocorrer por (i) alteração da regulação da expressão de bombas de efluxo; (ii) inibição de um dos componentes funcionais da bomba; (iii) bloqueio do canal da membrana externa (*p.e.* TolC); (iv) colapso da energia de efluxo de forma directa ou indirecta; (v) inibição competitiva ou não competitiva com moléculas denominadas por não-antibióticos com afinidade para locais da bomba de efluxo (vi) ou ainda, alterando a estrutura química dos antibióticos, de modo a reduzir a sua afinidade para o local de ligação (Pagès *et al.*, 2009).

Para que um composto seja classificado como inibidor de efluxo terá de apresentar alguns requisitos: (i) promover a actividade de múltiplos substratos da bomba, (ii) não possuir actividade em estirpes que não apresentam a bomba em estudo e (iii) deve ser capaz de promover o aumento concentração intracelular dos diferentes substratos, sem afectar a integridade da membrana (Lamovskaya *et al.*, 2001).

Nos últimos tempos muitos inibidores de efluxo têm sido descritos. O fenilalanil-arginil- β -naftilamida (PA β N) foi o primeiro inibidor-competidor a ser

descrito. Apresenta capacidade para inibir quatro bombas clinicamente relevantes em *P. aeruginosa*. A natureza competitiva do PA β N com o antibiótico justificava que, enquanto um sistema de efluxo bombeia preferencialmente o PA β N, o antibiótico permanece na célula na concentração necessária para exercer actividade (Pagès *et al.*, 2009).

Outros inibidores têm sido estudados e descritos. Com exemplos temos o verapamil, considerado um anti-hipertensivo, que demonstrou inibir a bomba LmrA de *Lactococcus lactis* e também em parasitas (*P. falciparum*) (Li *et al.*, 2009; Marquez *et al.*, 2005); a reserpina que é um alcalóide derivado de uma planta, com capacidade de inibir a proteína transportadora Bmr de *B. subtilis* e NorA de *S. aureus* (Li *et al.*, 2009; Marquez *et al.*, 2005). Alcalóides derivados da planta *Berberis*, como a “porphyrin pheophorbide A” e a “flavonolignan 5'-methoxyhydrnocarpin” (5'-MHC), potenciaram a actividade da ciprofloxacina ao inibir a bomba NorA de *S. aureus*. Actualmente a actividade deste composto está a ser estudada em outros microrganismos, como *p.e. E. coli* (Lomovskaya *et al.*, 2001, Marquez, 2005).

Os mecanismos de acção de compostos inibidores de efluxo estão pouco descritos na literatura. Nesta dissertação pretendeu-se estudar alguns destes compostos de modo a tentar contribuir para o esclarecimento do seu mecanismo de acção em *E. coli*. Os compostos, ou classes, seleccionados irão ser descritos em pormenor nesta secção.

1.5.1 Fenotiazinas

As fenotiazinas e a sua actividade antimicrobiana são conhecidas há mais de um século e foram descritas pelo cientista alemão Paul Ehrlich, através dos estudos com o corante vital azul-de-metileno. Este corante apresenta capacidade de inibir a mobilidade de alguns parasitas (Amaral *et al.*, 2010). Foi através da síntese deste composto com propriedade neurolépticas que se produziram outros compostos, inicialmente para terapia de psicoses. O primeiro desses compostos foi a clorpromazina, que após exaustivos estudos demonstrou evidentes propriedades antimicrobianas (Amaral *et al.*, 2004).

As fenotiazinas actuam inibindo os canais de cálcio, que ocorre devido à inibição da ligação do íon de cálcio à sua proteína de transporte, a calmodulina (Khan *et al.*, 2006). Este facto conduz a uma cascata de reacções inibitórias, uma vez que, não havendo transporte de cálcio não ocorre hidrólise de ATP. Desta forma, as fenotiazinas conseguem inibir o efluxo de compostos tóxicos da bactéria, inibindo a disponibilidade energética para as bombas de efluxo funcionarem. Se não existirem bombas de efluxo activas, a acumulação do antimicrobiano dentro da célula é potenciada, permitindo que este atinja o seu alvo, destruindo a bactéria e diminuindo a emergência da resistência (Amaral *et al.*, 2004; Amaral *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2008). As fenotiazinas mais utilizadas e estudadas são cloropromazina e tioridazina.

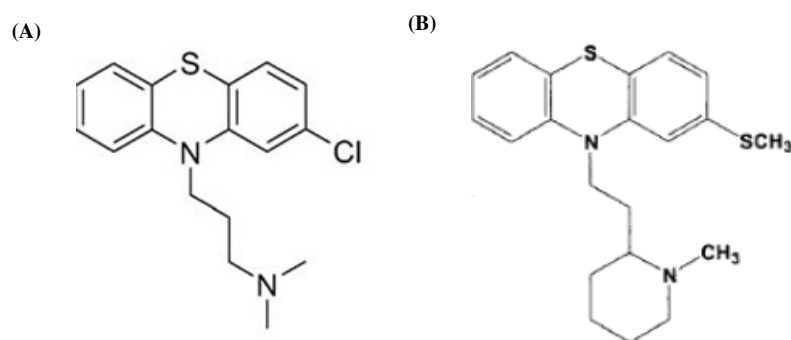


Figura 9 - Estrutura química das fenotiazinas (A) cloropromazina e (B) tioridazina (Adaptado de Kaatz *et al.*, 2003; Marquez, 2005)

1.5.2 Desacoplador energético – CCCP

Dois dos desacopladores energéticos mais conhecidos são: o carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona (CCCP) e o 2,4-dinitrofenol (2,4-DNP). Nesta dissertação apenas foi estudado o CCCP, uma vez que em estudos prévios, este demonstrou ser o mais eficiente quando comparado com o 2,4 – DNP (Doeber, 2000; Jana *et al.*, 2009).

Os agentes despolarizantes ou protonóforos são responsáveis pela dissipação da FPM através da membrana plasmática de *E. coli* (Jana *et al.*, 2009). Por definição, em eucariotas, a principal função de um desacoplador é provocar o colapso do gradiente

protónico transmembranar ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$) que existe na membrana interna da mitocôndria, provocando rearranjos e translocações dos prótons que aí se encontram. Ao tornarem a membrana permeável aos iões H^+ , ocorre o colapso do gradiente de H^+ , bloqueando assim a síntese de ATP e também a activação da hidrólise pela ATP sintetase mitocondrial (Cavari *et al.*, 1967, Alvarado *et al.*, 1998). Em células procariotas, o CCCP anula por completo o $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ levando ao efluxo de prótons e oxidação de substratos (Doebler, 2000).

O nível de ATP em células viáveis é determinado pelo equilíbrio entre a taxa de síntese de ATP e sua utilização. A síntese de ATP está associada ao processo de transferência de electrões que ocorre na membrana, e por sua vez relacionada com o transporte de electrões ao longo da cadeia transportadora. A cadeia transportadora serve de transporte de prótons ao longo da membrana, esses prótons são os intermediários da síntese de ATP e energia dependente para o transporte de solutos (Tu *et al.*, 2004). O CCCP tem capacidade para descarregar o gradiente de prótons necessários para a síntese de ATP. Como consequência, a síntese de ATP diminui, uma vez que há uma diminuição do potencial electroquímico de prótons (Tu *et al.*, 2004). A presença de CCCP pode diminuir a quantidade de ATP disponível em células viáveis, indicando a importância das respostas bioenergéticas para manter a viabilidade celular (Tu *et al.*, 2004).

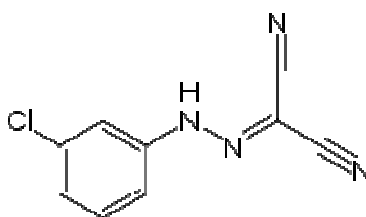


Figura 10- Estrutura química do CCCP (Adaptado de NCBI, acedido em Outubro, 2011)

1.5.3 Ortovanadato de sódio

O ortovanadato de sódio é composto por um anião vanadato simples que é denominado de ortovanadato (VO_4^{3-}) e três catiões de sódio (Na^+), formando uma estrutura geométrica trigonal piramidal, sendo o átomo central o vanádio (Davies *et al.*, 2004).

O ortovanadato de sódio é conhecido pela sua capacidade inibitória de várias fosfatases incluindo fosfatase alcalina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, ribonuclease, adenilato quinase e fosfofrutoquinase, tirosina fosfatase e ATPases (Bebane *et al.*, 1987; Nechay, 1984). Foi descrito que este composto pode ser um importante regulador das bombas Na^+/K^+ (Nechay, 1984).

O ião vanadato, presente no ortovanadato de sódio, é responsável pela inibição e activação de enzimas dependentes do ião fosfato, tais como ATPases, inibindo a hidrólise de ATP. Por este motivo, inibe bombas de efluxo como as da família de transportadores ABC, que utilizam como fonte de energia a hidrólise de ATP.

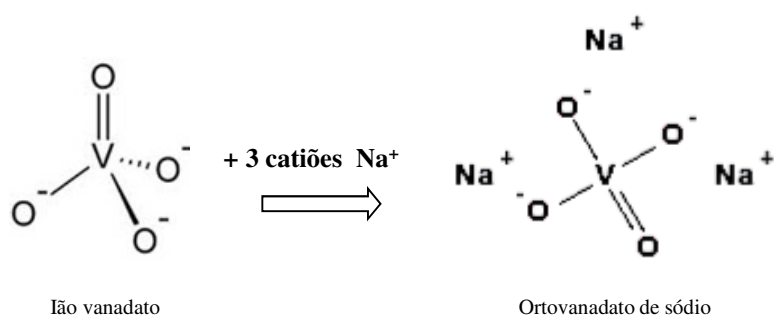


Figura 11-Estrutura química do Na_3VO_4 (Adaptado de NCBI em Outubro 2011).

1.5.4 Arilpiperazina (NMP)

As piperazinas são compostos N-heterocíclicos de cadeia longa, o que dificulta a sua acção como inibidor de efluxo pelo que, foram desenvolvidas outras moléculas com maior actividade, as arilpiperazinas (NMP) (Bonhert, 2005). Estes compostos derivam da maior classe de ligandos 5-HT_{1A} dos receptores de serotonina, um importante neurotransmissor (Kolwalski *et al.*, 2008).

Encontra-se descrito, que as NMP são consideradas inibidores de efluxo da família RND, nomeadamente dos sistemas de efluxo AcrAB e AcrEF e que são compostos potenciadores da actividade de fluoroquinolonas (Bohnert *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2009; Marquez *et al.*, 2005).

O seu mecanismo de acção não se encontra bem definido, no entanto sabe-se que não actua por inibição da FPM mas que pode actuar por inibição competitiva (Sonnet *et al.*, 2011). Este composto é em muitos estudos frequentemente comparado com o PA β N. As NMP são bastante eficientes na diminuição dos valores de CMI para antibióticos apesar de a sua actividade ser menor quando comparada com o PA β N realçando a actividade do PA β N como o mais eficiente na diminuição de CMIs (Pannek *et al.*, 2006). Estudos realizados por Sonnet *et al.*, indicam que a diminuição da CMI da ciprofloxacina na presença de NMP foi menor quando comparada com o PA β N (Sonnet *et al.*, 2011). Para além disso, este composto é capaz de aumentar a concentração intracelular de EtBr e levofloxacina e reduz quatro vezes a CMI da levofloxacina, outras fluoroquinolonas, tetraciclina, clorofenicol, linezolid, macrolidos e oxacilina (Kern *et al.*, 2006; Thorarensen *et al.*, 2001).

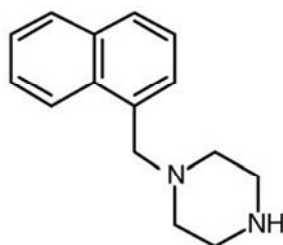


Figura 12-Estrutura química das NMP (Adaptado Pagès *et al.*, 2009).

1.5.5 Verapamil

O verapamil é um fármaco anti-hipertensivo ou anti-arrítmico muito utilizado para o tratamento de arritmias cardíacas (Hogg *et al.*, 1999). É considerado um potencial inibidor de efluxo e antagonista dos canais de cálcio. É um inibidor de bombas MDR de forma indirecta, uma vez que é através da inibição do transporte de K⁺ que ocorre a limitação do acesso às ATPases dependentes de iões de cálcio. É conhecido

como um inibidor de efluxo em eucariotas e procariotas. (Mahamound *et al.*, 2007; Marquez *et al.*, 2005; Piddock, 2006). Está descrito que é um inibidor dos transportadores ABC em Gram-positivas (*p.e. S. aureus*) e em micobactérias. Existe pouca informação sobre os efeitos do verapamil em bactérias Gram-negativas, como *E. coli* (Martins *et al.*, 2009).

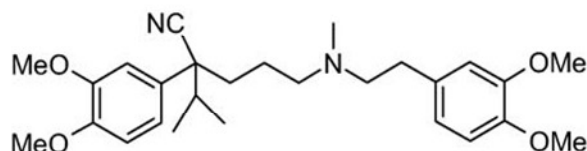


Figura 13 -Estrutura química do VP (Adaptado Marquez, 2005).

1.6 Métodos de detecção de actividade de efluxo

Com a emergência de resistência aos antibióticos mediada por bombas de efluxo torna-se importante o desenvolvimento de métodos que permitam detectar e quantificar a actividade de sistemas de efluxo em células bacterianas. Existem métodos que utilizam os substratos (antibióticos) marcados com compostos radioactivos, metais pesados ou fluorescentes (Paixão *et al.*, 2009). Na Unidade de Microbiologia Médica do IHMT, foram realizados esforços para desenvolver um método simples e directo para a detecção da actividade de efluxo, baseado em fluorometria em tempo real. Este método utiliza um composto quaternário fluorescente, o EtBr, que é usado como marcador visual para influxo/efluxo, na presença e na ausência de inibidores com auxílio de detectores de fluorescência (Paixão *et al.*, 2009). A selecção do EtBr como molécula fluorescente deve-se ao facto de este possuir capacidade para emitir fluorescência quando se encontra no interior das células. Deste modo, quanto maior for o nível de fluorescência emitida maior será a acumulação do composto no interior da célula e vice-versa.

1.6.1 Método fluorométrico semi-automático para monitorização do transporte de EtBr

O método fluorométrico semi-automático permite analisar a acumulação e extrusão do fluorocromo EtBr, utilizando um termociclador em tempo real, o Rotor GeneTM3000. O EtBr é considerado um substrato universal de bombas de efluxo e substrato preferencial do sistema AcrAB-TolC (Nikaido, 1996; Paixão *et al.*, 2009).

As condições necessárias a definir para cada ensaio, adaptada a cada estirpe, são: (i) definir a concentração de EtBr à qual cada estirpe por si só não apresenta acumulação significativa de EtBr, existindo apenas uma acumulação de EtBr residual e basal, que resulta do equilíbrio entre a entrada por difusão passiva e a saída por efluxo activo (esta fluorescência basal não deve exceder os 10 a 20% de fluorescência máxima no intervalo de tempo definido); (ii) definir a concentração do inibidor de efluxo a testar, para que não afecte a viabilidade celular (definiu-se que a concentração de composto a usar em ensaios de inibição deveria ser ½ do valor determinado para a CMI); e (iii) garantir a disponibilidade de glucose e estudar a sua influência na acumulação de EtBr, sem que as três condições (EtBr, inibidor de efluxo e glucose) afectem a viabilidade celular. Para os ensaios de competição foi necessário optimizar também o efeito de concentrações crescentes do antibiótico em estudo, pois o objectivo será a utilização de uma terapia adjuvante (antibiótico com inibidor de efluxo). O modelo funcional proposto encontra-se apresentado na Figura 14.

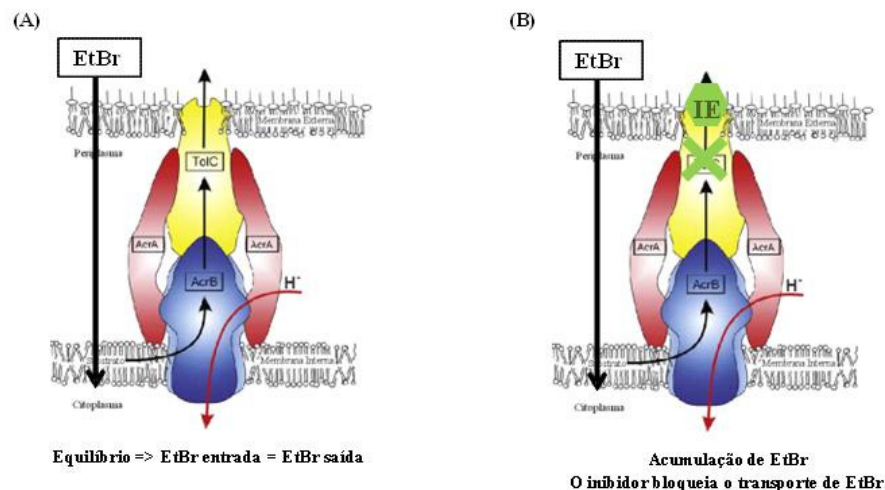


Figura 14 - Representação esquemática da entrada e saída de EtBr na célula de *E. coli*. (A) Estado de equilíbrio: na presença da bomba AcrAB-TolC a entrada de EtBr é semelhante à saída de EtBr. (B) Presença do IE a obstruir o canal TolC, a saída de EtBr é bloqueada e a sua acumulação é aumentada: a taxa de entrada é superior à taxa de saída de EtBr.

Num ensaio de acumulação, como o apresentado na Figura 14, observa-se a capacidade de acumulação de EtBr no interior da célula, *p.e.* quanto maior a sua acumulação menor será a sua capacidade de extrusão. Na presença de um IE verifica-se uma maior acumulação de EtBr, uma vez que este bloqueia a actividade de efluxo, retendo no interior da célula, uma maior quantidade de EtBr. Assim, a diferença de fluorescência (Δ) corresponde à capacidade do IE inibir o efluxo do EtBr, uma vez que a concentração EtBr é o balanço entre a entrada de EtBr para o interior da célula e a sua capacidade de o efluxar, como representado na Figura 15.

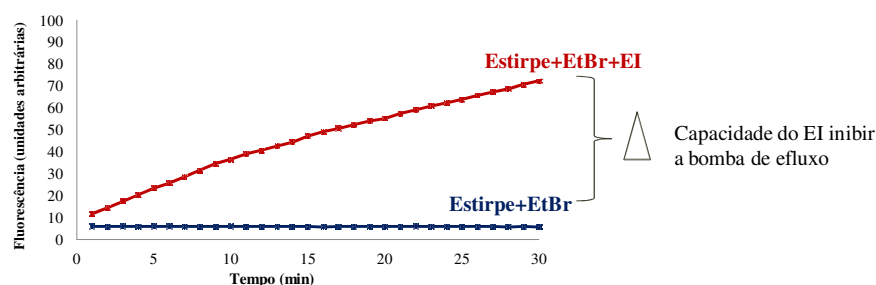


Figura 15 - Representação gráfica de um ensaio de acumulação de EtBr. A diferença de fluorescência entre as duas curvas (curva vermelho – estirpe com EtBr e inibidor, curva azul – estirpe com EtBr e sem inibidor) indica a acumulação de EtBr devido à acção do inibidor, possibilitando deste modo analisar a capacidade inibitória do composto em estudo.

Para comprovação dos resultados, e de forma a estudar a capacidade do inibidor diminuir a extrusão de EtBr, realizaram-se ensaios de efluxo. Com este ensaio, podemos observar em tempo real a extrusão de EtBr para o meio extracelular. Um exemplo de um ensaio de efluxo encontra-se esquematizado na Figura 16.

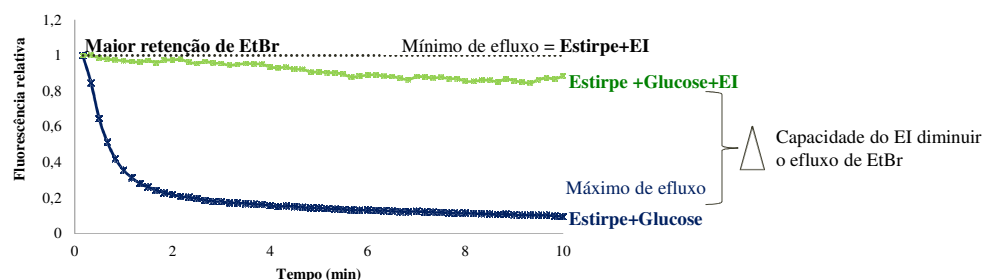


Figura 16 - Representação gráfica de um ensaio de efluxo de EtBr. Este ensaio permite demonstrar em tempo real a inibição do efluxo provocada pelo EI (linha verde). Através da normalização dos valores de fluorescência obtêm-se um ponto inicial (unidade) que corresponde ao máximo de acumulação de EtBr (linha tracejado), a partir desse ponto observa-se a extrusão de EtBr ao longo do tempo (linha azul).

Num ensaio de efluxo, como apresentado na Figura 16, é observada a capacidade efluxo de EtBr para o exterior da célula. Quanto mais acentuado for o decréscimo da curva azul “estirpe+glucose” maior será o efluxo de EtBr. Quanto menor o decréscimo da curva verde “estirpe+glucose+inibidor” maior será o efeito do inibidor. De forma a obter um indicador quantitativo que permita um gradiente de comparação entre os vários inibidores, determinou-se a fluorescência relativa final (RFF) para cada inibidor. Nesta fórmula, a fluorescência relativa no último ponto do gráfico de acumulação na presença do inibidor é comparada com a fluorescência relativa no último ponto da mesma curva, na ausência do inibidor, obtendo-se um índice de inibição relativo e normalizado para cada inibidor (*Vide* Material e Métodos 2.1.6.4).

1.7 Objectivos

A bactéria Gram-negativa *E. coli* é responsável por infecções de relevância clínica humana e animal, às quais se associa um elevado nível de resistência aos

antibióticos utilizados na terapêutica destas infecções. A resistência mediada por bombas de efluxo tem sido descrita como um dos mecanismos de resistência aos antibióticos em *E. coli*. Trabalhos preliminares demonstraram que a actividade de efluxo em *E. coli* depende também da energia proveniente da hidrólise de ATP (Costa, 2010). Assim, de modo a estudar qual a relação entre a resistência aos antibióticos e o efluxo activo em *E. coli*, e a sua dependência de energia fornecida pela hidrólise de ATP, propomo-nos nesta dissertação avaliar e estudar a actividade inibitória e o mecanismo de acção de compostos inibidores de efluxo que actuam sobre o principal sistema de efluxo de *E. coli*, o sistema AcrAB-TolC.

Para tal, foram estudados compostos inibidores de efluxo i) quanto à sua capacidade para inibir o sistema de efluxo AcrAB-TolC, através de um método fluorométrico semi-automático; ii) quanto à capacidade para diminuir a resistência de *E. coli* aos antimicrobianos, através da determinação de concentrações mínimas inibitórias na presença e ausência de inibidores de efluxo; e iii) quanto ao seu efeito ao nível da membrana celular, nomeadamente, na disrupção do potencial de membrana, através de métodos de microscopia de fluorescência. Para além disso, estes inibidores foram usados em ensaios de competição de substratos entre o brometo de etídeo e os antibióticos tetraciclina, ofloxacina e oxacilina.

Procura-se assim clarificar quais os mecanismos de acção dos diferentes inibidores de efluxo testados, e ao mesmo tempo identificar compostos ou procedimentos que possam prevenir a emergência da resistência, de forma a contribuir para o estabelecimento de uma antibioterapia co-adjuvante contra as infecções por *E. coli*.

Material e Métodos

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1 Estirpes utilizadas

Para a execução deste trabalho foram seleccionadas duas estirpes de *Escherichia coli*:

- Estirpe selvagem *E. coli* K-12 AG100 (*argE3 thi-1 rpsL xyl mtl Δ(gal-uvrB) supE44*) que possui o sistema de efluxo AcrAB intacto e funcional (Okuso *et al.*, 1996).
- Estirpe *E. coli* K-12 AG100A (Δ *acrAB::Tn903 Kan^r*), que provém da estirpe AG100 e apresenta o operão *acrAB* inactivo por inserção do transposão Tn903 (Okuso *et al.*, 1996).

Ambas as estirpes foram caracterizadas e gentilmente cedidas pelo Dr. Hiroshi Nikaido (Departamentos de Química e Biologia Celular e Molecular, da Universidade da California, Berkeley, CA, EUA).

2.1.2 Meios de cultura e soluções

A composição e modo de preparação dos meios de cultura, soluções e antibióticos utilizados ao longo do trabalho encontram-se descritos nas Tabelas 3 a 5.

Todos os meios de cultura e soluções foram preparados com água destilada e quando necessário, esterilizados por autoclavagem a 121°C durante 20 minutos, excepto quando indicado em contrário.

Tabela 3 - Composição dos meios de cultura.

Meio de cultura	Composição (por litro)
Luria Bertani broth (LB)	10 g de peptona caseína ⁽¹⁾ ; 5g de extracto de levedura ⁽¹⁾ e 10g de cloreto de sódio ⁽²⁾
Luria Bertani agar (LA)	LB e 20 g de agar ⁽³⁾
Mueller-Hinton broth (MHB) ⁽³⁾	21 g de Muller-Hinton Broth

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

Tabela 4 - Composição e preparação de soluções de antibióticos, compostos inibidores de sistemas de efluxo e EtBr.

Solução ⁽¹⁾	Composição / Preparação da solução “stock”
Arilpiperazina (NMP)	10 mg/ml em dimetilsulfóxido (DMSO) ^{(2)(a)} Diluições em água bidestilada
Brometo de etídio (EtBr) ⁽³⁾	10 mg/ml em água bidestilada estéril ^(b) Diluições em água bidestilada
Canamicina (KAN)	20 mg/ml em água bidestilada estéril ^(a) Diluições em água bidestilada
Carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP)	1 mg/ml em água bidestilada estéril e etanol absoluto ^{(4) (a)} 1:1 Diluições em água bidestilada. Armazenada ao abrigo da luz
Clorpromazina (CPZ)	10 mg/ml em água bidestilada estéril ^(a) Diluições em água bidestilada
Ofloxacina (OFX)	1 mg/ml em água bidestilada (adicionar 5-8 µl de NaOH ⁽²⁾ a 0,1 M) ^(a) Diluições em água bidestilada
Ortovanadato de sódio (Na ₃ VO ₄)	100 mg/ml em água bidestilada estéril ^(a) Diluições em água bidestilada
Oxacilina (OXA)	10 mg/ml de água bidestilada estéril ^(a) Diluições em água bidestilada
Tetraciclina (TET)	1 mg/ml em etanol ⁽²⁾ a 95% ^(a) Diluições em água bidestilada
Tioridazina (TZ)	10 mg/ml em água bidestilada estéril ^(a) , protegida da luz (fotossensível) Diluições em água bidestilada
Verapamil (VP)	20 mg/ml em água bidestilada estéril ^(a) Diluições em água bidestilada

(1) Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha; (2) Merck; (3) Sigma Chemical Co., St.Louis, EUA; (4) Panreac; (a) as soluções depois de preparadas foram esterilizadas por filtração com filtros de seringa estéreis de PVDF com 0,22µm de diâmetro de poro da Rotilabo ® Spritzenfilter Steril, Karlshure, Alemanha; (b) necessário aquecimento a 50°C para total dissolução do composto.

Tabela 5- Composição e preparação de soluções.

Solução	Composição
Tampão fosfato salino (PBS) 1X ⁽¹⁾	10mM tampão fosfato; 2,7mM KCL; 137mM NaCl; pH 7,4
Glucose ⁽¹⁾	20% (p/v) 20 g de glucose ^(a) em 100mL de água bidestilada

(1) Sigma Aldrich Chemie; (a) Solução esterilizada por filtração com filtros de seringa estéreis de PVDF com 0,22µm de diâmetro de poro da Rotilabo ® Spritzenfilter Steril, Karlsruhe, Alemanha.

As soluções “*stock*” dos compostos descritos nas Tabelas 3, 4 e 5 foram alíquotadas e armazenadas a -20°C, com exceção da solução de EtBr que foi armazenada a 4°C ao abrigo da luz de modo a evitar a degradação do composto.

2.2 Métodos

2.2.1 Crescimento das estirpes bacterianas

As estirpes foram repicadas para placas de isolamento em LA, e incubadas a 37°C durante 24 horas. Para o crescimento da estirpe AG100A todos meios de cultura foram suplementados com 100mg/L de canamicina, de modo a evitar a perda do transposão Tn903.

Para determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMIs), as estirpes foram crescidas em meio MHB, enquanto para os ensaios de acumulação e efluxo, ambas as estirpes foram crescidas em meio LB a 37°C, com agitação (180 rpm), durante a noite.

Ambas as estirpes foram armazenadas a -80°C em meio LB suplementado com 10% (v/v) de glicerol (Sigma Aldrich Chemie).

2.2.2 Determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMIs) pelo método de diluição seriada em microplaca

A CMI é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano com capacidade capaz de inibir o crescimento de um microrganismo. As CMIs dos compostos descritos na Tabela 4, para cada estirpe em estudo, foram determinadas através do método de microdiluição seriada, em placas de 96 poços, de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2007).

Para a determinação de CMIs prepararam-se culturas primárias das estirpes em meio LA. As placas foram incubadas a 37°C, durante a noite. A partir das culturas primárias, prepararam-se culturas em meio líquido, por inoculação de colônias isoladas em meio MHB. As estirpes foram incubadas a 37°C, com agitação (180 rpm), durante a noite.

As diferentes gamas de concentrações de cada um dos compostos em estudo encontram-se descritas na Tabela 6.

Tabela 6- Gama de concentrações testadas para cada composto em estudo.

Antibiótico	Gama de concentrações (mg/L)	
	AG100	AG100A
TET	0,03 - 16	0,03 - 16
OFX	0,015- 8	0,00375-2
OXA	1,90 - 1000	0,019-10
CPZ	0,93 - 480	0,15-160
TZ	0,39 - 200	0,39-200
CCCP	0,15 - 80	0,15-80
Na ₃ VO ₄	9,7 – 5000	11,7-12000
NMP	1,56 - 800	0,78-400
VP	6,25-3200	4,68-2400
EtBr	1,1-600	0,15-160

TET – tetraciclina; OFX – ofloxacina; OXA – oxacilina; CPZ – clorpromazina; TZ – tioridazina; CCCP - carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone; Na₃VO₄ – ortovanadato de sódio; NMP- arilpiperazinas; VP- verapamil EtBr- brometo de etídio.

A partir das soluções “stock” de cada composto foram preparadas soluções de trabalho. Após a preparação destas soluções preparou-se a placa de 96 poços como descrito abaixo. Distribuiu-se 130 µl de MHB em todos os poços da placa. De seguida, acrescentou-se 50 µl de MHB aos poços da coluna 1 (esta corresponde ao controlo negativo, sem inóculo). A cada poço da coluna 2, acrescentou-se 110 µl de MHB e 20 µl do composto cuja CMI se quer determinar. Esta é a coluna que apresenta uma concentração mais elevada do composto, a partir da qual se iniciam as diluições seriadas de 1:2. Retirou-se 130 µl dos poços da coluna 2 e adicionou-se aos poços da coluna 3, e assim sucessivamente até à coluna 11, que corresponde à concentração final testada para cada composto. Nesta, os últimos 130 µl são descartados. Por último, adicionou-se 20 µl de inóculo, previamente ajustado à escala de 0,5 de McFarland, a cada poço desde a coluna 2 à coluna 12. A coluna 12 corresponde ao controlo de crescimento, contendo apenas apresenta MHB e a estirpe. No final, cada poço deverá apresentar 150 µl de volume. As placas foram incubadas a 37°C, durante 18 horas.

Em todos os ensaios foram realizados quatro tipos de controlo: i) controlo de esterilidade – apenas o meio de cultura (MHB); (ii) controlo de crescimento – MHB e estirpe; (iii) controlo do solvente – MHB, estirpe e solvente à concentração usada para cada composto (para garantir que o solvente não afecta o crescimento celular); e (iv) controlo do composto – MHB e composto (para verificar se existe turbidez do composto e garantir que esta não influencia a leitura dos resultados).

A leitura dos resultados foi realizada visualmente após um período de incubação de 16 a 18 horas. Consideraram-se os ensaios válidos através da presença de crescimento no respectivo controlo positivo (controlo de crescimento) e ausência de crescimento no respectivo controlo negativo (controlo de esterilidade). O crescimento da estirpe observado em cada poço que contém o composto em estudo foi comparado com o controlo de crescimento, com o controlo do composto e com o controlo de solvente. O valor da CMI corresponde à concentração mais baixa de composto em que se verifica a ausência de crescimento. Os ensaios de determinação de CMIs foram realizados em triplicado.

2.2.3 Determinação de concentrações mínimas inibitórias pelo método de diluição em microplaca para os antibióticos na presença dos compostos inibidores de efluxo

Após a preparação das soluções de trabalho preparou-se a placa de 96 poços como descrito abaixo. Distribuiu-se 110 µl de MHB em cada poço de todas as colunas. De seguida adicionou-se mais 40 µl de MHB aos poços da coluna 1, (esta corresponde ao controlo negativo, sem inóculo). Aos poços da coluna 2, acrescentou-se 110 µl de MHB e 20 µl do antibiótico (Tabela 7). Esta corresponde à coluna que apresenta a concentração mais elevada do composto, a partir da qual se iniciam as diluições de 1:2. De seguida, retirou-se 130 µl dos poços da coluna 2 e adicionou-se aos poços da coluna 3, e assim sucessivamente até à coluna 11. Na última coluna são descartados os 130 µl. Posteriormente, para avaliar o efeito do composto inibidor de efluxo sobre o antibiótico, adicionou-se 20 µl do composto, a ½ da CMI determinada previamente, a cada poço, desde a coluna 2 à coluna 11. Por último, adicionou-se 20 µl de inóculo, previamente ajustada à escala de 0,5 de McFarland, da coluna 2 à coluna 12. A coluna 12 corresponde ao controlo de crescimento, contendo apenas MHB e a estirpe. No final do ensaio cada poço deverá conter 150 µl de volume final. As placas foram incubadas a 37°C, durante 18 horas.

Tabela 7 - Gama de concentrações utilizadas para os antibióticos na presença do inibidor de efluxo a ½ da CMI.

Antibiótico	Gama de concentrações (mg/L)	
	AG100	AG100A
TET	0,015- 8	0,003 - 2
OFX	0,003 - 2	0,003-2
OXA	0,95 - 500	0,019-10

TET – tetraciclina; OFX – ofloxacina; OXA – oxacilina.

Desta forma, conseguiu-se avaliar a capacidade do inibidor de efluxo sob o valor da CMI de cada antibiótico. Considerou-se como inibidor de actividade de efluxo, o decréscimo de pelo menos ¼ do valor da CMI do antibiótico na presença do inibidor em estudo (DeMarco *et al.*, 2007).

2.2.4 Método fluorométrico semi - automático em termociclador de tempo real rotor gene™3000

O método fluorométrico semi – automático é realizado num termociclador em tempo real, o Rotor Gene™ 3000 (Corbett, Sidney, Austrália). Esta técnica tem por base um protocolo padronizado na Unidade de Ensino e Investigação em Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, e permite em tempo real monitorizar o transporte do fluorocromo EtBr, através de uma estimativa do transporte cinético, que reflecte o balanço entre a acumulação do EtBr através de difusão passiva e a sua extrusão através do efluxo (Paixão *et al.*, 2009).

2.2.4.1 Preparação das estirpes bacterianas

Foram efectuadas culturas primárias de ambas as estirpes em meio LA. Incubaram-se as placas a 37°C, durante a noite. A partir destas culturas em placa, prepararam-se culturas em meio líquido, por inoculação de colónias isoladas em 10 ml de meio LB. Incubaram-se os tubos a 37°C, com agitação (180 rpm). O crescimento celular foi acompanhado, por medição da densidade óptica (DO) a 600 nm num espectrofotómetro de tubos de ensaio (Spectronic 20D, Thermo Scientific, Cambridge, Reino Unido), até uma DO_{600nm} de 0,6, correspondendo à fase exponencial de crescimento. Uma vez alcançada a DO_{600nm} de 0,6, as células foram recolhidas por centrifugação (Biofuge Pico Heraeus Kendro Laboratory Products, Osterode, Alemanha) a 13.000 rpm, durante três minutos, à temperatura ambiente (Viveiros *et al.*, 2008; Paixão *et al.*, 2009), descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o “pellet” em 1 ml de PBS. Repetiu-se o processo de lavagem por três vezes. Após as lavagens a suspensão celular foi transferida para um tubo de 15 ml e a DO_{600nm} foi ajustada a 0,6 (PU8620 UV/VIS/NIR Philips, Cambridge, Reino Unido), com PBS.

2.2.4.2 Ensaio de acumulação de EtBr

Os ensaios de acumulação realizaram-se em microtubos de 0,2 ml, com um volume final de 0,1 ml. De modo a determinar a menor concentração de EtBr que causa acumulação, 0,05 ml da suspensão celular lavada foi adicionada aos tubos de 0,2 ml que continham diferentes concentrações de EtBr (0,25; 0,5; 1, 2 e 3 mg/L) na presença e ausência de glucose a 0,4%. As soluções de trabalho, bem como a suspensão da estirpe, foram preparadas com o dobro da concentração final pretendida, para que ao serem colocados 0,05 ml da suspensão celular e 0,05 ml da solução preparada se obtenham as concentrações acima mencionadas. Os tubos foram depois colocados no aparelho Rotor-GeneTM 3000. Os ensaios de acumulação foram efectuados a 37°C e a leitura da fluorescência de EtBr adquirida a 530 e 585 nm, após cada ciclo de 60 segundos, durante 60 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicado. Os resultados serão apresentados apenas até aos 30 minutos de ensaio devido ao tempo de geração das estirpes em estudo.

2.2.4.3 Ensaio de acumulação de EtBr na presença de inibidores de efluxo

De modo a estudar a influência de inibidores de efluxo na actividade de efluxo do EtBr, as culturas bacterianas de ambas as estirpes foram tratadas de forma idêntica ao anteriormente descrito até se obter uma suspensão celular com DO_{600nm} de 0,6. Prepararam-se soluções de trabalho com o dobro da concentração final pretendida, para que ao serem colocados 0,05 ml da suspensão celular e 0,05 ml da solução preparada se obtenham as seguintes concentrações finais: (i) glucose a 0,4% (v/v); (ii) glucose a 0,4% e EtBr (1 mg/L AG100 e 0,5 mg/L AG100A); (iii) glucose a 0,4% e EtBr (1 mg/L AG100 e 0,5 mg/L AG100A) e inibidor a testar a ½ da CMI determinada; (iv) EtBr (1 mg/L AG100 e 0,5 mg/L AG100A); (v) EtBr (1 mg/L AG100 e 0,5 mg/L AG100A) e inibidor a testar a ½ da CMI determinada. Os tubos foram colocados no Rotor-GeneTM3000, a medição fluorométrica decorreu durante 30 minutos e as leituras foram

efectuadas após ciclos de 60 segundos, a 37°. A leitura da fluorescência de EtBr foi adquirida a 530 e 585 nm. Os ensaios foram realizados em triplicado. Os resultados serão apresentados apenas até aos 30 minutos de ensaio (cerca de 25 ciclos) devido ao tempo de geração das estirpes em estudo.

2.2.4.4 Ensaio de efluxo de EtBr

Para iniciar o protocolo de efluxo, começou-se por tratar as culturas para ambas as estirpes de *E. coli* como descrito em 2.1.6.1. Após se atingir uma DO_{600nm} de 0,6, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS, a DO_{600nm} ajustada a 0,3 e incubadas durante 60 minutos com EtBr (AG100 – 1mg/L e AG100A – 0,5mg/L) e com o inibidor de efluxo (½ da CMI) na ausência de glucose (Viveiros *et al.*, 2008).

No final dos 60 minutos, as células foram recolhidas por centrifugação a 13.000 rpm durante cinco minutos, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o “pellet” (OD_{600nm}=0,6) em PBS refrigerado de modo a minimizar o efluxo. De seguida, adicionou-se 0,05 ml da suspensão celular aos tubos, nos quais tinha sido previamente colocado: (i) apenas 0,05 ml de PBS; (ii) 0,05 ml de PBS com glucose, concentração final de 0,4%; (iii) 0,05 ml de inibidor de efluxo, concentração final de ½ CMI; e (iv) 0,05 ml de inibidor de efluxo, concentração final de ½ CMI com glucose a 0,4%. No final, a suspensão celular apresenta uma DO_{600nm} de 0,3. (Viveiros *et al.*, 2008). Os tubos foram colocados no Rotor-GeneTM3000 e a fluorescência foi medida a cada 30 segundos durante 30 minutos, a 37°C.

A análise comparativa dos resultados de efluxo realizou-se através da normalização dos dados obtidos pelo Rotor-GeneTM3000. A fluorescência produzida pelas células “carregadas” com EtBr e impedidas de efluxar, devido à acção do inibidor de efluxo e ausência de glucose, foi definida como o valor de fluorescência máxima (fluorescência relativa equivalente a um) que pode ser obtido durante um ensaio. A fluorescência relativa dos restantes tubos foi obtida através do rácio entre os valores de fluorescência de efluxo para cada estirpe testada e o valor de fluorescência máxima, por unidade de tempo. Cada ensaio foi realizado em triplicado.

De forma, a quantificar a capacidade do composto inibir a extrusão de EtBr, foi definido um referencial de fluorescência relativa final (RFF) (Adaptado de Ramallete *et al.*, 2011).

$$\text{RFF (}\Delta 30\text{min)} = \frac{\text{RF}_{\text{tratado}} - \text{RF}_{\text{n\~ao tratado}}}{\text{RF}_{\text{n\~ao tratado}}}$$

Nesta fórmula, o $\text{RF}_{\text{tratado}}$ corresponde à fluorescência relativa no último ponto (30 minutos) na presença do inibidor e o $\text{RF}_{\text{n\~ao tratado}}$ corresponde à fluorescência relativa no último ponto (30 minutos) na ausência do inibidor.

2.2.4.5 Ensaios de competição entre substratos

Para os ensaios de competição entre o EtBr e os antibióticos (TET, OFX, OXA) foi utilizado o protocolo para a acumulação de EtBr, descrito anteriormente no ponto 2.1.6.3, com algumas alterações, que serão indicadas abaixo. De modo, a estudar se a competição entre EtBr e antibióticos, caso exista, é dependente da concentração do antibiótico, foram testadas diferentes concentrações de antibiótico ($\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}$ da CMI). Os ensaios foram realizados na presença de glucose a 0,4% e na presença dos melhores inibidores testados, o CPZ e Na_3VO_4 , a $\frac{1}{2}$ da CMI. Estas condições mantiveram-se em todos os ensaios.

Prepararam-se as suspensões celulares de ambas as estirpes para uma $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,6 como descrito em 2.1.6.1. Depois da suspensão preparada, foi adicionado 0,05 ml da mesma aos tubos de 0,2 ml, aos quais tinha sido adicionado previamente as diferentes concentrações das soluções de trabalho: com EtBr (1mg/L em AG100 ou 0,5mg/L em AG100A), inibidor de efluxo a $\frac{1}{2}$ da CMI (CPZ ou Na_3VO_4) e os antibióticos a $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ da CMI (TET, OFLX, OXA), sempre na presença e ausência de glucose a 0,4%. O volume final em cada tubo foi de 0,1 ml. Os tubos foram colocados no Rotor-GeneTM3000, e a medição fluorométrica decorreu por um período de 30 minutos (cerca de 25 ciclos) com leituras em cada ciclo de 60 segundos, a 37°C, adquiridas a 530 e 585 nm. Cada ensaio foi realizado em triplicado.

2.2.5 Potencial de membrana e viabilidade celular

A viabilidade celular foi estudada com recurso ao teste para determinação de viabilidade bacteriana BacLight™ Live/Dead e o potencial de membrana com o teste de potencial de membrana BacLight™, ambos da Molecular Probes (Invitrogen Co. E.U.A). As estirpes foram crescidas, como o descrito em 2.1.6.1. Inocularam-se em 10 ml de meio LB, 3 a 4 colónias de cada estirpe antecipadamente crescida em meio sólido LA. As estirpes foram incubadas a 37°C, com agitação (180 rpm). O crescimento celular foi acompanhado, por medição da DO a 600 nm num espectrofotómetro (Hitachi, U-2000 spectrophotometer), até uma DO_{600nm} de 0,6 (fase exponencial de crescimento). Uma vez alcançada a fase exponencial, as células (1 ml) foram recolhidas por centrifugação (Sartorius, 1-15P, Sigma) a 13.000 rpm, durante cinco minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuscitado em 1 ml de PBS. De seguida, adicionou-se 0,25 ml da suspensão celular a 0,25 ml da solução de composto a testar (concentração final: ½ CMI do inibidor com e sem glucose a 0,4%). Posteriormente adicionou-se o respectivo corante dependendo do ensaio (2,5 µl de DioC₂ para potencial de membrana ou 2,5 µl do corante SYTO 9 e 2,5 de iodo de propídio, para a viabilidade celular) homogeneizou-se e incubou 10 minutos, ao abrigo da luz. Retirou-se 50 µL de cada amostra e colocou-se entre lâmina e lamela para observação ao microscópio de fluorescência (Olympus CX40, com uma câmara Olympus U-RFL-T e uma unidade de filtros em cubo: filtro de excitação BP450-480 e filtro de barreira: BA515). As imagens foram capturadas com uma câmara CCD digital Evolution™ MP 5.1 (MediaCybernetics, Inc, EUA). As imagens foram adquiridas com o software Image-Pro Plus (MediaCybernetics, Inc, EUA). As imagens foram analisadas como descrito em Carvalho (2003). O erro associado à microscopia de fluorescência e análise de imagem foi baseado no desvio padrão e média de oito imagens repetidas, tiradas da mesma amostra, com um intervalo de confiança de 95%.

Resultados e Discussão

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como referido na Introdução desta dissertação, as bactérias possuem sistemas de efluxo activo (dependentes de energia) de substâncias tóxicas que previnem o acesso destas às moléculas alvo, diminuindo a sua concentração intracelular para níveis subletais e assim permitir a sua sobrevivência em ambientes hostis. Muitos destes sistemas, ao não serem específicos para um substrato, são responsáveis pela multirresistência aos antibióticos (Yerushalmi *et al.*, 1995).

O principal objectivo desta dissertação consiste na avaliação da actividade inibitória de diferentes compostos que actuam sobre o principal sistema de efluxo activo em *E. coli*. Esses compostos são, como já foi referido anteriormente, o CPZ, TZ, CCCP, Na₃VO₄, NMP e o VP. Pretende-se determinar o perfil de susceptibilidade de duas estirpes isogénicas, *E. coli* AG100 e AG100A, para estes inibidores e para três famílias de antibióticos, as fluoroquinolonas, tetraciclina e β-lactâmicos, onde a única diferença entre estas duas estirpes é a inactivação do sistema de efluxo AcrAB-TolC. Posteriormente avaliou-se a capacidade inibitória destes compostos no efluxo dos antibióticos, com a determinação da CMI dos antibióticos na presença dos inibidores, para se analisar se existe ou não decréscimo da CMI dos antibióticos quando se encontram na presença dos inibidores. Um segundo objectivo pretende comprovar que o supracitado efeito inibitório ocorre por diminuição do efluxo activo, através de um método fluorométrico semi-automático, que analisa a capacidade dos inibidores em promover uma maior acumulação/menor efluxo de EtBr, um reconhecido substrato do principal sistema de efluxo em estudo, o sistema AcrAB-TolC. Com este método pretendeu-se ainda compreender, em tempo real, quais os mecanismos de acção inibitória destes compostos e analisar a presença ou ausência de outras bombas/sistemas de efluxo funcionais neste microrganismo. Para isso, o estudo de competição entre substratos foi uma estratégia importante, que permitiu analisar possíveis sinergismos entre os diferentes substratos e substratos preferenciais.

3.1 Caracterização fenotípica das duas estirpes de *E. coli* em estudo – AG100 e AG100A

Começou-se por definir o perfil de susceptibilidade aos compostos em estudo para as estirpes, AG100 e AG100A, através da determinação da CMI para cada um dos compostos em separado, antibióticos e inibidores de sistemas de efluxo. Posteriormente determinou-se a CMI de cada antibiótico na presença dos inibidores, com o intuito de avaliar a capacidade inibitória dos compostos inibidores de bombas de efluxo e o potencial efeito sinérgico dos inibidores sobre a actividade dos antibióticos.

3.1.1 Determinação das concentrações mínimas inibitórias dos antibióticos e dos compostos inibidores de efluxo para as estirpes da *E. coli*, AG100 e AG100A

A CMI por definição é a menor concentração do composto antimicrobiano com capacidade para impedir o crescimento visível de um dado microrganismo durante um período padrão, usualmente 16-18 horas para bactérias como *E. coli* (CLSI, 2007). Esse valor permite avaliar a susceptibilidade de uma dada estirpe e também avaliar a eficiência desse composto no tratamento antibiótico de infecções por estas estirpes.

O resultado do perfil de susceptibilidade dos antibióticos e dos inibidores de efluxo, para ambas as estirpes apresentam-se nas Tabelas seguintes (Tabela 8 a 10).

Tabela 8 - Valores obtidos de CMI para os antibióticos nas duas estirpes de *E. coli*, AG100 e AG100A.

Antibióticos	CMI (mg/L)	
	AG100	AG100A
Tetraciclina	2	0,5 (↓4x)
Ofloxacina	0,125	0,015 (↓≈ 8x)
Oxacilina	250	0,625 (↓≈ 400x)

Da análise da Tabela 8, verifica-se que a estirpe AG100A apresenta maior susceptibilidade aos três antibióticos testados quando comparada com a estirpe AG100.

Este facto deve-se à estirpe susceptível não apresentar a bomba AcrAB-TolC activa. Assim sendo, comprova-se que os antibióticos escolhidos para este trabalho, tetraciclina, ofloxacina e oxacilina, são substratos do sistema de efluxo em causa, como já havia sido descrito por Piddock (Piddock, 2006).

Tabela 9 - Valores obtidos de CMI para inibidores e substratos de bombas de efluxo nas duas estirpes de *E. coli*, AG100 e AG100A.

Compostos	CMI (mg/L)	
	AG100	AG100A
CPZ	60	20 (↓3x)
TZ	100	25 (↓4x)
CCCP	10	10 (=)
Na ₃ VO ₄	3000	5000 (↑ ≈ 0.6x)
NPM	400	200 (↓2x)
VP	3200	300 (↓ ≈ 11x)
EtBr	150	5 (↓30x)

CMI- Concentração mínima inibitória; **CPZ**- Clorpromazina; **TZ** - Tioridazina; **CCCP** - Carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona; **Na₃VO₄**- Ortovanadato de Sódio; **NMP** – Arilpiperazinas.

Da análise da Tabela 9, verifica-se que a estirpe AG100A apresenta uma maior susceptibilidade aos compostos inibidores quando comparada com a estirpe AG100. O composto onde este resultado é mais evidente é para o EtBr. A estirpe AG100A é 30 vezes mais susceptível que a estirpe AG100, comprovando-se como já fora descrito em trabalhos anteriores, que o EtBr é um substrato preferencial da bomba AcrAB-TolC (Viveiros *et al.*, 2005).

Igualmente, verificaram-se diferenças significativas no valor da CMI para os compostos TZ, CPZ e VP. A TZ apresenta um valor de CMI quatro vezes superior para a estirpe AG100 comparativamente com a estirpe AG100A, enquanto o composto CPZ para a estirpe AG100 apresenta um valor de CMI três vezes superior em relação à estirpe AG100A. Assim sendo, tanto a TZ como o CPZ demonstram que a estirpe AG100A é mais susceptível do que a estirpe AG100 para estes compostos. Para o VP observou-se um aumento da CMI da AG100A comparativamente com a AG100 de 11 vezes. Estes resultados indicam que os compostos podem ser, eles próprios, substratos da bomba AcrAB-TolC, ou que são inibidores que, na ausência do sistema AcrAB-TolC, inibem igualmente os restantes sistemas de efluxo e poderão ter um efeito

primordial na sua inibição levando a uma menor capacidade de sobrevivência da estirpe em condições normais.

Para os restantes compostos, CCCP, Na₃VO₄ e NMP, os valores determinados de CMI para ambas as estirpes, AG100 e AG100A, não apresentam diferenças significativas entre elas. O valor de CMI para o CCCP é o mesmo tanto para a AG100 como para a AG100A. E a CMI do Na₃VO₄ e NMP apresentam apenas diferenças na ordem de uma diluição. Estes resultados indicam a possibilidade de não serem substrato da bomba AcrAB-TolC, ou seja, não apresentam um efeito primordial na inibição directa sobre esta bomba de efluxo, não excluindo porém que podem ter um efeito potenciado noutras bombas.

3.1.2 Determinação das concentrações mínimas inibitórias dos antibióticos e EtBr na presença dos compostos inibidores de efluxo para as estirpes de *E. coli*, AG100 e AG100A

De forma a avaliar a capacidade dos inibidores de efluxo em estudo diminuírem a CMI dos antibióticos, determinaram-se as CMI dos antibióticos na sua presença, numa concentração fixa igual a ½ da sua CMI para garantir que o efeito inibitório se deve ao sinergismo com o antibiótico e não à actuação do inibidor *per se*. Portanto, cada antibiótico utilizado no estudo foi submetido à presença dos inibidores de efluxo no ensaio de CMI a ½ da respectiva CMI. Como referência para o efluxo utilizou-se o EtBr, anteriormente demonstrado ser um substrato preferencial do sistema AcrAB-TolC. Os resultados obtidos apresentam-se na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores obtidos de CMI para os antibióticos e EtBr na presença dos inibidores de sistemas de efluxo (a ½ da CMI) para as duas estirpes de *E. coli*, AG100 e AG100A.

Antibiótico na presença/ausência do Inibidor de efluxo	AG100		AG100A	
	CMI (mg/L)	Efeito Inibitório	CMI (mg/L)	Efeito inibitório
<i>Tetraciclina</i>	2		0,5	
+ CPZ	0,5	4	0,0625	8
+ TZ	0,5	4	0,0625	8
+ CCCP	0,5	4	0,25	2
+ ORV*	>16	-	4	-
+ NMP	0,0625	32	0,125	4
+VP	1	2	0,125	4
<i>Ofloxacina</i>	0,125		0,015	
+ CPZ	0,015	8	0,0075	2
+ TZ	0,015	8	0,0075	2
+ CCCP	0,015	8	0,015	1
+ ORV	0,03	4	0,015	1
+ NMP	0,0075	16	0,015	1
+VP	0,015	8	0,0075	2
<i>Oxacilina</i>	250		0,625	
+ CPZ	125	2	0,625	1
+ TZ	125	2	0,312	2
+ CCCP	62,5	4	0,625	1
+ ORV	62,5	4	1,25	-
+ NMP	7,68	32	0,3125	2
+VP	31,2	8	0,3125	2
EtBr	150		5	
+ CPZ	37,5	4	2,5	2
+ TZ	18,75	8	5	1
+ CCCP	75	2	5	1
+ ORV	4,6	32	2,5	2
+ NMP	2,34	64	5	1
+VP	9,3	16	1,25	4

CMI- Concentração mínima inibitória; **CPZ**- Clorpromazina; **TZ** - Tioridazina; **CCCP** - Carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona; **Na₃VO₄**- Ortovanadato de Sódio; **NMP** – Arilpiperazinas; **VP**-Verapamil; **EtBr** – Brometo de etídio. *Antagonismo entre tetraciclina e Na₃VO₄, resultados não validados para esta combinação. As “**bold**” encontram-se os valores obtidos de CMI que diminuiram a CMI do antibiótico acima de ¼ da CMI.

Com a análise dos resultados descritos na Tabela 10, verifica-se de um modo geral, que a CMI do antibiótico na presença do inibidor de efluxo, decresce significativamente, quando comparada com o valor da CMI determinada para o antibiótico na ausência do inibidor de efluxo.

Para a **tetraciclina**, o composto com efeito inibitório mais significativo foi a NMP, uma vez que, diminuiu o valor da CMI da tetraciclina de dois para 0,06 mg/L, ou seja, a CMI da tetraciclina diminuiu 32 vezes na presença da NMP. Os compostos TZ, CPZ e o CCCP diminuíram o valor da CMI da tetraciclina, de dois para 0,5 mg/L. A CMI da tetraciclina decresceu quatro vezes na presença dos referidos inibidores. O verapamil foi o inibidor com menos efeito no decréscimo da CMI da tetraciclina, apresentando-se duas vezes inferior. Para a estirpe AG100A, os compostos que efectuam uma redução na CMI mais acentuada são a TZ e o CPZ, pois decresceram o valor da CMI da tetraciclina oito vezes.

Para a **ofloxacina** na estirpe AG100, o inibidor de efluxo que demonstrou maior efeito inibitório, continuou a ser a NMP, uma vez que diminuiu a CMI da ofloxacina de 0,125 para 0,0075 mg/L, ou seja, 16 vezes menor. Os compostos TZ, CPZ, CCCP e o VP apresentaram um decréscimo da CMI da ofloxacina de 0,125 para 0,015mg/L, decrescendo oito vezes na presença destes inibidores. Por último, o Na_3VO_4 proporcionou um decréscimo menor, o valor da CMI da ofloxacina diminuiu para 0,03, ou seja, diminuiu quatro vezes o valor da CMI da ofloxacina na ausência do Na_3VO_4 . Para a estirpe com o sistema AcrAB-TolC inactivado, os compostos CPZ, TZ e VP apresentam um efeito inibitório mais relevante.

Analisando os resultados da **oxacilina** verificou-se que o inibidor que proporcionou um maior decréscimo da CMI revelou-se o mesmo que para os restantes antibióticos, a NMP. Este composto decresceu o valor da CMI da oxacilina de 250 para 7,68 mg/L, ou seja, a CMI é 32 vezes inferior. Seguido a este, o VP apresentou capacidade de tornar a CMI da oxacilina oito vezes inferior. O CCCP e Na_3VO_4 diminuíram quatro vezes o valor da CMI da oxacilina. Por último, os inibidores com menor capacidade para diminuir a CMI da oxacilina foram o CPZ e TZ, pois a CMI na sua presença decresceu apenas duas vezes, de 250 para 125 mg/L. Analisando o **EtBr**, substrato preferencial da bomba AcrAB-TolC, verificou-se que os inibidores que mais decrescem a sua CMI são o VP, Na_3VO_4 e NMP, diminuindo 16, 32 e 64 vezes,

respectivamente, o valor da CMI do EtBr. Os restantes inibidores, TZ, CPZ e CCCP, decresceram o valor da CMI, oito, quatro e duas vezes, respectivamente. De todos, o inibidor que se revelou mais eficiente foi a NMP. A estirpe AG100A apresentou maior susceptibilidade para o EtBr na presença do VP (inibição de quatro vezes da CMI).

Os resultados apresentados nas Tabelas 8 a 10 resultam da média de três ensaios independentes, onde todos eles foram concordantes. Os solventes da NMP e do CCCP são o DMSO e metanol, respectivamente, pelo que para estes dois casos foram realizados controlos de crescimento e viabilidade celular, onde se verificou que estes solventes não alteram o crescimento das estirpes nem a sua viabilidade celular, nas concentrações utilizadas.

Da análise global destes resultados podemos inferir: (i) que a tetraciclina, ofloxacina e oxacilina, são substratos do sistema de efluxo AcrAB-TolC de *E. coli*; (ii) o composto quaternário fluorescente EtBr é um substrato preferencial do sistema de efluxo AcrAB-TolC de *E. coli*; (iii) todos os inibidores de efluxo seleccionados promoveram a diminuição da CMI dos antibióticos e EtBr a ½ da sua respectiva CMI, com especial destaque para a NMP.

Assim, face às evidências apresentadas e à luz do que se conhece sobre estes compostos, seria legítimo concluir que todos estes inibidores de efluxo promovem a retenção dos antibióticos e do EtBr por inibição dos sistemas de efluxo, em particular do sistema de efluxo AcrAB-TolC de *E. coli*. Contudo, este efeito inibitório é avaliado pelo aumento da inibição do crescimento pelo antibiótico/substrato após 16-18 horas de exposição a uma concentração não letal do inibidor (diminuição da CMI). Nada garante que não existe um efeito sinérgico entre antibiótico e inibidor no seu modo de acção, para além da inibição do efluxo. Para se estudar este efeito temos de utilizar tecnologia que nos permita visualizar o efluxo e a sua inibição por estes compostos em tempo real, e assim discriminar quais, de entre estes compostos, são verdadeiramente inibidores de efluxo.

3.2 Monitorização do transporte de EtBr pelo método fluorométrico semi-automático

Na interpretação dos resultados é importante ter presente alguns dos critérios que estiveram implícitos na execução dos ensaios realizados:

- O influxo do EtBr deriva da permeabilidade da parede celular bacteriana, e ocorre por difusão passiva. O equilíbrio entre a difusão passiva e a expulsão activa do EtBr pelos sistemas de efluxo (em particular pelo sistema AcrAB-TolC em *E. coli*) resulta no estabelecimento de um equilíbrio entre o influxo e o efluxo que, se desequilibrado para o primeiro por inibição do segundo, resulta na acumulação de EtBr na célula bacteriana.

- O EtBr que entra na célula deriva do balanço entre o transporte activo e passivo ligando-se aos ácidos nucleicos e a proteínas intracelulares e periplasmáticas, sendo esta ligação responsável pelo nível de fluorescência emitido pelas células. A sua intensidade reflecte a quantidade de EtBr no interior da célula (Paixão *et al.*, 2009).

- A concentração do composto inibidor de efluxo deverá ter como concentração de trabalho, 1/2 do valor determinado para a CMI da estirpe em estudo, para manter a viabilidade celular. Este é um factor fundamental no ensaio para evitar variações de fluorescência que podem influenciar negativamente os resultados. Por este mesmo motivo, os ensaios tem uma duração de apenas 30 minutos.

- Outro pressuposto também importante é o uso de tampão fosfato para impedir/minimizar a replicação celular durante o ensaio. As células sofrem três lavagens com esta solução para retirar todo o meio de cultura que possibilitaria a replicação celular. Para além disso, o tampão fosfato também é utilizado como meio de ressuspensão celular ao longo dos 30 minutos de ensaio, porque desta forma criam-se as condições ideais para interromper a replicação celular assim como evitar a fluorescência intrínseca associada às proteínas da replicação (Jones *et al.*, 2003).

- As células devem-se encontrar nas condições energéticas ideais, fornecendo-se uma fonte de energia (glucose a 0,4%). Este é um aspecto essencial e comum a todas as bombas de efluxo com capacidade para expelir antibióticos: a sua dependência energética, como é o caso da dependência do potencial protónico, no sistema tripartido AcrAB-TolC.

Dados os postulados supracitados começou-se por determinar a menor concentração de EtBr para a qual se consegue detectar acumulação de EtBr celular sem que essa concentração provoque alterações nas funções vitais da célula. Para tal, realizou-se um primeiro ensaio em que as estirpes são expostas a concentrações crescentes de EtBr (0,25 a 3 mg/L). A primeira concentração com níveis baixos de acumulação (< 10-20% de fluorescência relativa) será a concentração que tem capacidade de manter o equilíbrio da entrada e saída do substrato.

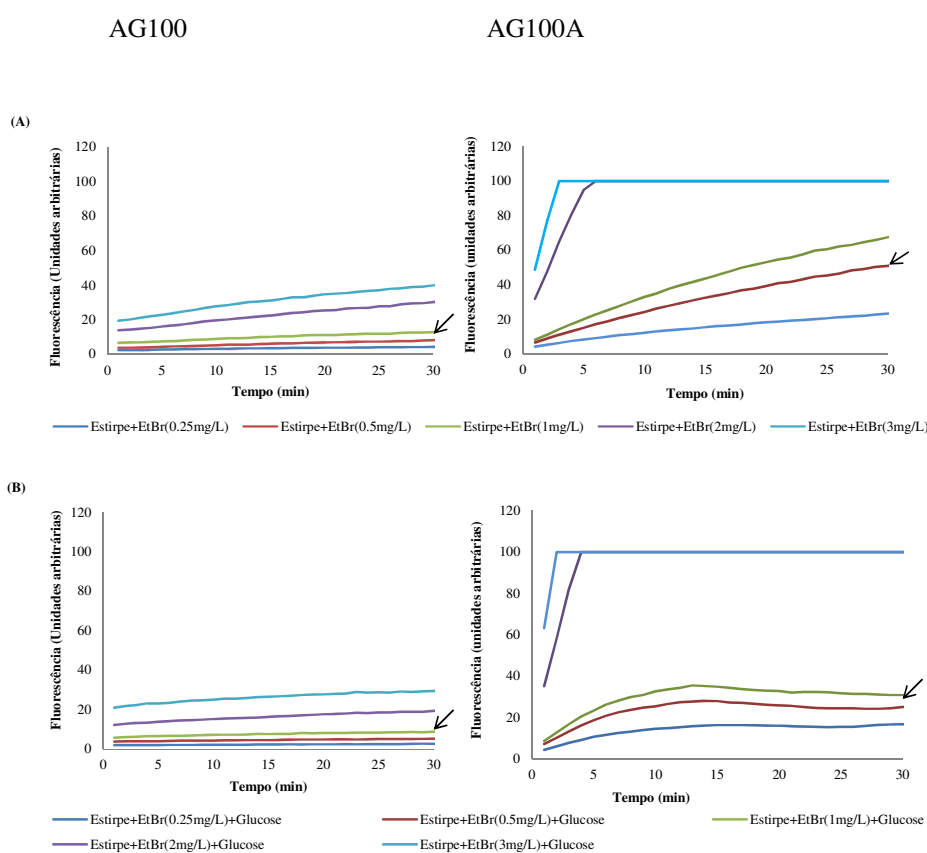


Figura 17 – Determinação da concentração mínima de EtBr necessária para manter o equilíbrio nas duas estirpes, AG100 e AG100A. Ensaio realizado com diferentes concentrações de EtBr, 0,25 a 3 mg/L na ausência (A) e na presença (B) de glucose a 0,4%.

Os resultados obtidos na detecção fluorométrica do ensaio de acumulação de concentrações crescentes de EtBr, apresentados na Figura 17 demonstraram que a concentração que pode ser utilizada como limite inferior para a estirpe AG100A é de 0,5 mg/L e para a estirpe AG100 é 1 mg/L. Como já foi referido, estas são as concentrações de equilíbrio a partir das quais se começa a detectar acumulação celular

de EtBr nas melhores condições para o efluxo (presença de glucose), correspondendo à fluorescência basal para os ensaios de acumulação de EtBr subsequentes (Paixão *et al.*, 2009). Assim sendo, as concentrações a utilizar nos ensaios de acumulação e efluxo não serão iguais para ambas as estirpes, isto porque a estirpe AG100A apresenta o sistema de efluxo AcrAB-TolC inactivo, o que uma vez mais reforça a evidência de que o EtBr é um substrato específico deste sistema de efluxo. Este resultado é concordante com os valores obtidos para a CMI de cada estirpe, em que em AG100A a CMI é muito inferior à da estirpe AG100 uma vez que esta tem capacidade para expulsar o substrato EtBr pela bomba AcrAB-TolC activa.

3.2.1 Estudo do transporte de EtBr na presença de inibidores de efluxo

O estudo do transporte do EtBr na presença de inibidores de efluxo procedeu-se de acordo com o descrito em 2.2.4 dos Materiais e Métodos. Foram realizados dois tipos de ensaios: ensaios de acumulação de EtBr e os ensaios de efluxo de EtBr (Paixão *et al.*, 2009). Começou-se por estudar a acumulação de EtBr no interior da célula, para verificar se alguns dos inibidores potenciam essa acumulação. Como referido anteriormente, a concentração de EtBr foi optimizada para cada estirpe de *E. coli*, produzindo 100% de viabilidade para o ensaio. Os resultados de fluorescência em função do tempo, para os inibidores de efluxo encontram-se apresentados nos gráficos seguintes.

3.2.1.1 Na presença de CPZ e TZ

Os fenotiazinas são compostos que inibem os canais de cálcio e como consequência inibem as enzimas dependentes dos canais de cálcio, como as enzimas fornecedoras de energia, as ATPases, cinases e fosfatases (Khan *et al.*, 2000; Amaral *et al.*, 2007). O cálcio tem um papel crucial na sinalização celular e na actividade de transporte da célula, e como tal o CPZ e a TZ serão utilizadas neste estudo para se observar o efeito que exercem sobre a acumulação e efluxo de EtBr, como potenciais inibidores de efluxo em *E. coli*. Os resultados encontram-se nas Figuras 18 e 19.

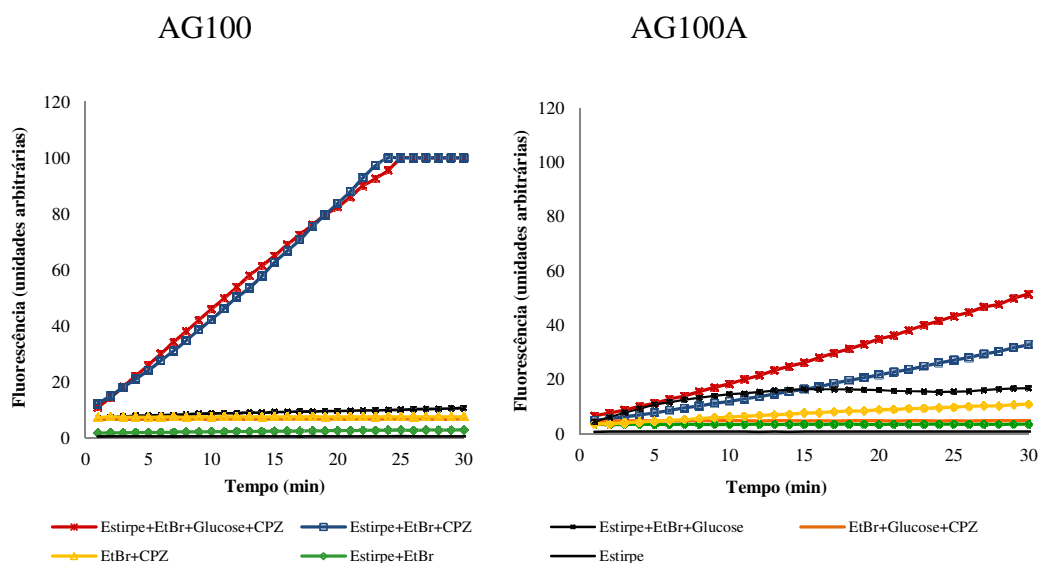


Figura 18 - Influência do CPZ na acumulação de EtBr - Ensaio de acumulação de EtBr, durante 30 min, a 37°C na presença e ausência de glucose a 0,4% e na presença de CPZ a ½ da CMI (30 mg/L e 10 mg/L). Concentração de EtBr (1 mg/L e 0,5 mg/L) para ambas as estirpes *E. coli* AG100 e AG100A, respectivamente.

Observando os gráficos apresentados na Figura 18, verifica-se que existe acumulação significativa de EtBr na presença de CPZ. Para a estirpe AG100 ocorre acumulação crescente ao longo do tempo, atingindo um valor máximo aos 25 minutos de 100 unidades arbitrárias de fluorescência. Na estirpe AG100A a acumulação existe mas com valores de fluorescência mais reduzidos, apresentando um máximo de acumulação aos 30 minutos atingindo 55 unidades arbitrárias de fluorescência. Estes resultados indicam que o CPZ tem um efeito inibitório nos sistemas de efluxo de *E. coli*, indicando ter um efeito inibitório preferencial sobre o sistema AcrAB-TolC, apesar de outros sistemas estarem funcionais, como é constatado pelos resultados obtidos em AG100A, que apresenta significativamente menor acumulação de EtBr induzida pela inibição do efluxo pelo CPZ. A presença de glucose não altera significativamente os níveis de acumulação.

Os dois gráficos seguintes apresentam o efeito do TZ na acumulação de EtBr.

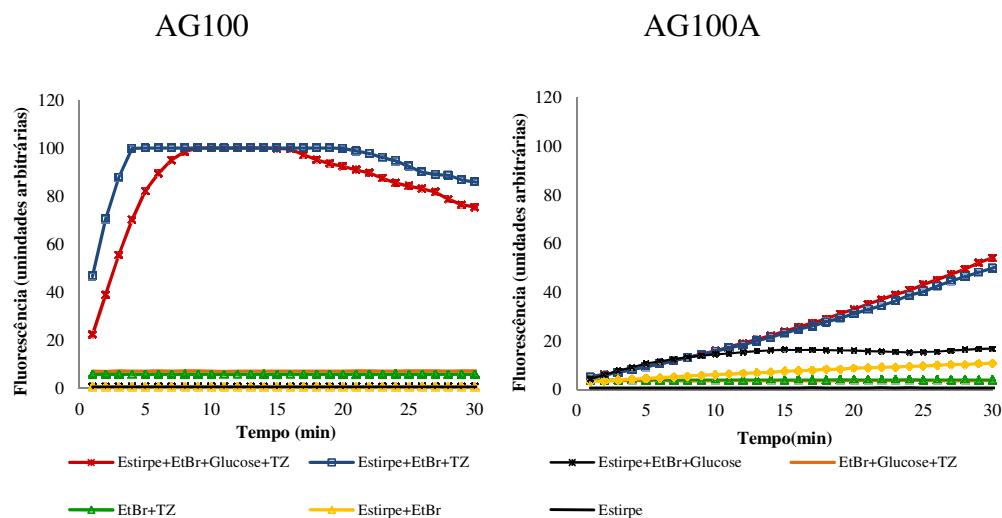


Figura 19 - Influência da TZ na acumulação de EtBr. Ensaio de acumulação de EtBr, durante 30 min, a 37°C, na presença e ausência de glucose a 0,4% e na presença de TZ a ½ da CMI (50 mg/L e 12,5 mg/L) e Concentração de EtBr (1 mg/L e 0,5 mg/L) para as estirpes *E. coli* AG100 e AG100A, respectivamente.

No ensaio com presença de TZ, a estirpe AG100 acumula o EtBr até 100 e 90 unidades relativas de fluorescência aos 10 minutos de ensaio, mantendo esse valor máximo de acumulação (100 unidades de arbitrarias de fluorescência) até aos 25 minutos de ensaio, após esse período ocorre um decréscimo acentuado na acumulação. Na estirpe AG100A, a acumulação é muito inferior, com um aumento gradual ao longo do tempo atingindo os 30 minutos, 50 unidades arbitrarias de fluorescência. Essa diferença significativa apresentada entre ambas as estirpes comprova que a TZ tem um efeito inibitório preferencial sobre o sistema de efluxo AcrAB-TolC mas, apesar de menor, também tem efeito noutros sistemas de efluxo. A presença de glucose não altera significativamente os níveis de acumulação de EtBr para ambas as estirpes.

Com estes resultados verifica-se que o CPZ e a TZ são inibidores do efluxo de EtBr, promovendo uma significativa acumulação de EtBr no interior celular quando o sistema AcrAB-TolC está funcional. A presença de glucose não influencia essa acumulação. A TZ aparenta ter uma acção inibitória superior ao CPZ, na linha do efeito inibitório que ambos apresentaram sobre a CMI do EtBr para AG100 (Tabela 10).

3.2.1.2 Na presença de um desacoplador energético (CCCP)

Os desacopladores energéticos inibem a síntese de ATP através de um colapso do gradiente prótonico transmembranar que garante a FPM. Normalmente, o transporte de electrões está relacionado com a fosforilação oxidativa, sendo que o balanço da síntese de ATP controla o balanço do transporte de electrões. Os desacopladores interrompem a fosforilação oxidativa no transporte de electrões, assim a energia produzida pela cadeia transportadora não permite a libertação da energia necessária sob a forma de ATP. Muitos dos desacopladores facilitam o transporte de hidrogénios e de potássio pela membrana, sem que ocorra a activação da ATPase, destruindo dessa forma o gradiente iónico e o gradiente de pH. O desacoplador escolhido para este trabalho foi o CCCP e os resultados obtidos encontram-se apresentados na Figura 20.

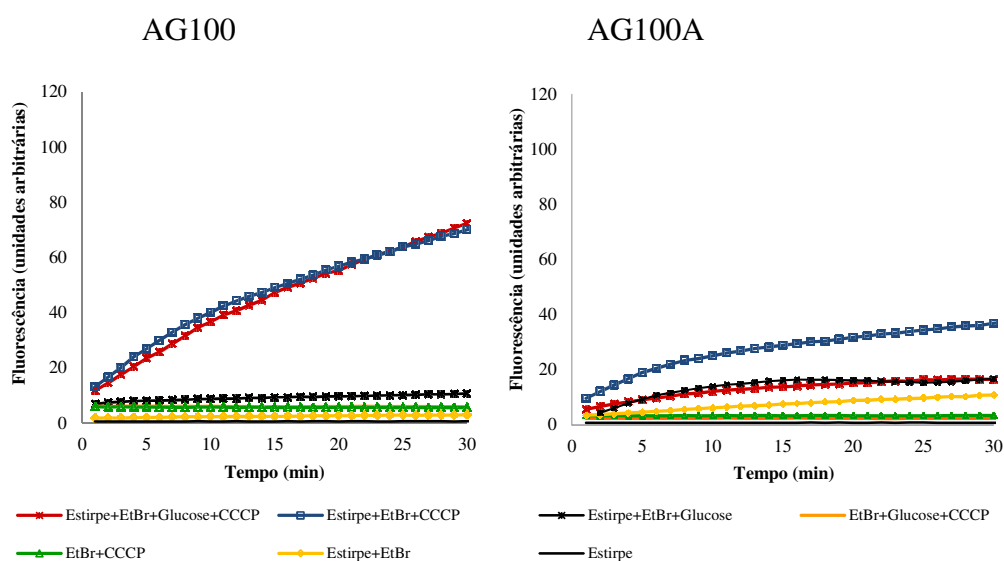


Figura 20- Influência do CCCP na acumulação de EtBr. Ensaio de acumulação de EtBr durante 30 min, a 37°C, na presença e ausência de glucose a 0,4% e na presença de CCCP a ½ da CMI (5 mg/L) para ambas as estirpes. Concentração de EtBr (1 mg/L e 0,5 mg/L) para as estirpes *E. coli* AG100 e AG100A, respectivamente.

Na presença do CCCP, constata-se que para a estirpe AG100, existe acumulação ao longo do tempo, apresentando aos 30 minutos 70 unidades de fluorescência. Para a estirpe AG100A a acumulação não é tão elevada, pois apresenta apenas 35 unidades de fluorescência aos 30 minutos. Os resultados apresentados indicam que o CCCP não é

específico do sistema AcrAB-TolC, existem outros sistemas de efluxo a funcionar, que possivelmente também utilizam a FPM como fonte de energia. A presença de glucose não altera significativamente os níveis de acumulação de EtBr para ambas as estirpes. Com este resultado, demonstra-se mais uma vez que o sistema AcrAB-TolC não é o único sistema de efluxo a transportar o substrato, EtBr, para o exterior da célula, bem como se demonstra que o sistema AcrAB-TolC depende da FPM para funcionar. Coloca-se agora a questão de como é mantida essa FPM e se são as ATPases as principais fornecedoras de prótons para a manutenção da FPM ou se, tal como a maioria das teorias bioenergéticas postulam, o papel das ATPases na manutenção da FPM é secundário.

3.2.1.3 Na presença do ortovanadato de sódio (Na_3VO_4)

O Na_3VO_4 inibe a acção de todos os sistemas energéticos que utilizam como fonte de energia a hidrólise de ATP, ou seja, é um inibidor de ATPases. Como o seu mecanismo de acção ainda não se encontra bem definido, pretende-se estudar a sua acção sobre a acumulação de EtBr. Na Figura 21, encontram-se os resultados para ambas as estirpes, AG100 e AG100A.

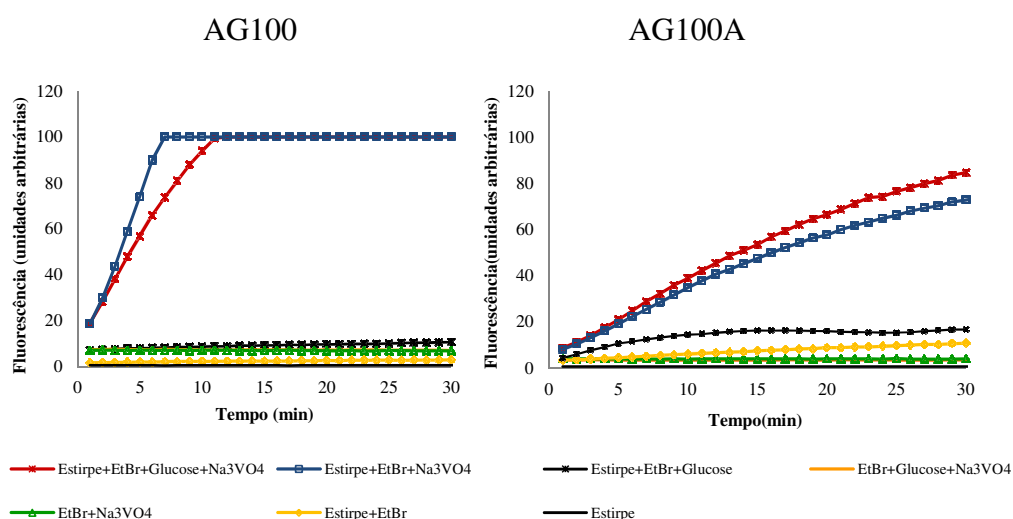


Figura 21 - Influência do Na_3VO_4 na acumulação de EtBr. Ensaio de acumulação de EtBr, durante 30 min, a 37°C, na presença e ausência de glucose a 0,4% e na presença de Na_3VO_4 a 1/2 da CMI (1500 mg/L e 2500 mg/L), concentração de EtBr (1 mg/L e 0,5 mg/L), para as estirpes de *E. coli* AG100 e AG100A, respectivamente.

Comparando ambas as estirpes verifica-se que a estirpe AG100 na presença do Na_3VO_4 apresenta uma forte inibição da actividade do sistema de efluxo AcrAB-TolC, o que acarreta uma rápida e elevada acumulação de EtBr nas células. Após cinco minutos de ensaio as células na presença do Na_3VO_4 acumulam o máximo de EtBr, atingindo 100 unidades arbitrárias de fluorescência. Verifica-se ainda, que a presença de glucose não influencia o efeito inibitório do composto. O mesmo acontece para a estirpe AG100A, este composto continua a apresentar um forte efeito inibitório, mesmo com a bomba AcrAB-TolC inactiva, tal facto indica que esta inibição não é específica do sistema AcrAB-TolC. Com este resultado, o Na_3VO_4 apresenta-se como um excelente inibidor de bombas de efluxo em *E. coli* apesar de não promover reduções de CMIs tão significativas como as fenotiazinas (Tabela 10).

3.2.1.4 Na presença de arilpiperazinas (NMP)

Este composto e seus derivados têm sido bastante estudados, e vários estudos comprovaram que o seu uso decresce significativamente a CMI de antimicrobianos como a levofloxacina (Bohnert *et al.*, 2005). Apesar do seu mecanismo de acção ainda não se encontrar bem descrito, tudo indica que tem potencial para ser considerado inibidor de efluxo.

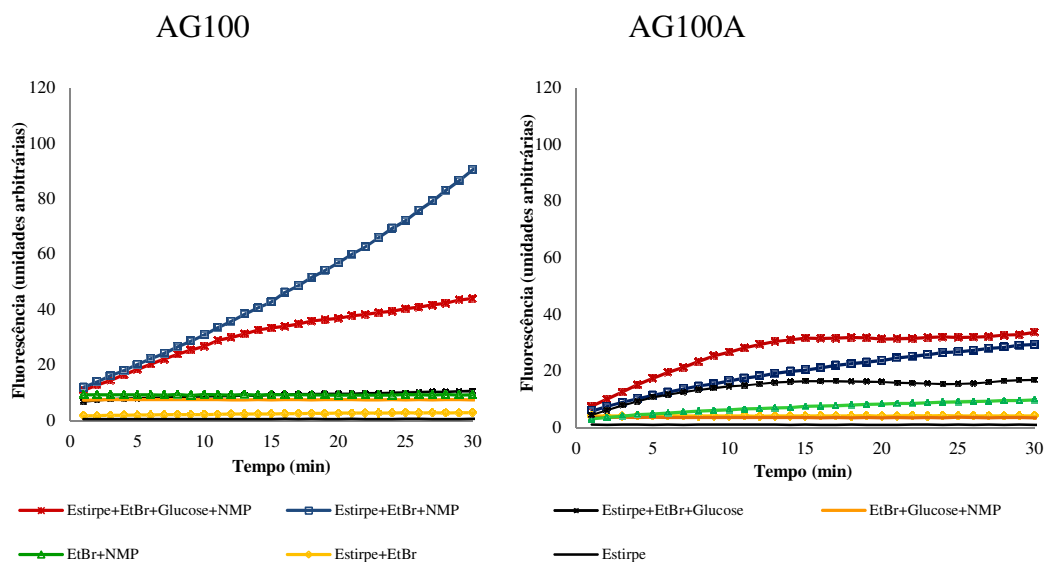


Figura 22 - Influência do NMP na acumulação de EtBr. Ensaio de acumulação de EtBr, durante 30 min, a 37°C, na presença e ausência de glucose a 0,4% e na presença de NMP a ½ da CMI (200 mg/L e 100 mg/L), concentração de EtBr de (1 mg/L e 0,5 mg/L), para as estirpes *E. coli* AG100 e AG100A, respectivamente.

Com a análise dos gráficos da Figura 22, verifica-se que a estirpe AG100 apresenta um máximo de acumulação aos 30 minutos de ensaio com 90 unidades arbitrárias de fluorescência e a estirpe AG100A, também apresenta o máximo de acumulação aos 30 minutos, mas com apenas 35 unidades arbitrárias de fluorescência. Este resultado indica que este inibidor tem um efeito principal sobre o sistema AcrAB-TolC, embora promova acumulação de EtBr para a estirpe AG100A. Assim, este inibidor, também exerce algum efeito sobre outros sistemas de efluxo. Analisando o efeito da fonte de carbono, verifica-se que existem diferenças quanto à presença de glucose (curva a vermelho) em relação à sua ausência (curva azul). A presença de glucose, para a estirpe AG100, proporciona uma menor acumulação de EtBr no interior da célula. A glucose mesmo na presença do inibidor NMP consegue manter a sua acção e o inibidor não tem capacidade de inibir o sistema de efluxo AcrAB-TolC. No entanto, na ausência de glucose a acumulação de EtBr é maior, e este inibidor exerce uma maior inibição do sistema AcrAB-TolC. Assim, uma vez que a glucose consegue atenuar o efeito das arilpiperazinas, deduz-se que estes compostos actuaram directamente nas vias glicolíticas que abastecem as ATPases que garantem a FPM para a actividade do sistema AcrAB-TolC.

3.2.1.5 Na presença de verapamil (VP)

O verapamil encontra-se descrito como um bloqueador dos canais de cálcio, existe pouca informação sobre o seu mecanismo de acção, e por isso pretende-se estudar a sua influência na acumulação do substrato EtBr como potencial inibidor de bombas de efluxo. Os resultados estão ilustrados na Figura 23.

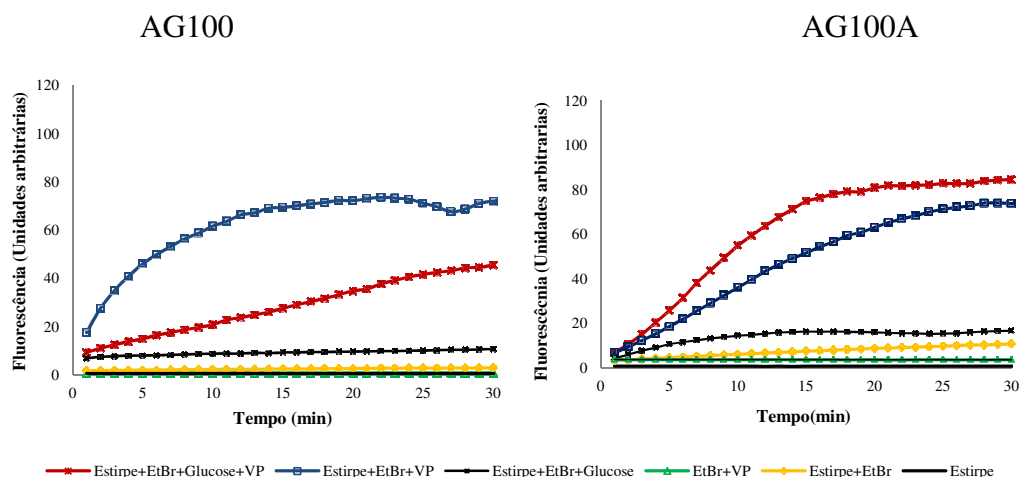


Figura 23 - Influência do VP na acumulação de EtBr. Ensaio de acumulação de EtBr, durante 30 minutos, a 37°C, na presença e ausência de glucose a 0,4% e na presença de VP a ½ da CMI, concentração de EtBr de (1 mg/L e 0,5 mg/L), para as estirpes *E. coli* AG100 e AG100A, respectivamente.

A estirpe AG100 apresenta um máximo de acumulação aos 20 minutos de ensaio com 73 unidades arbitrárias de fluorescência e a estirpe AG100A, apresenta também o máximo de acumulação aos 30 minutos, mas com 80 unidades arbitrárias de fluorescência. Com este resultado verifica-se que este inibidor apresenta um efeito notório sobre os vários sistemas de efluxo que bombeiam EtBr em *E. coli* não sendo específico do sistema AcrAB-TolC. Analisando o efeito da fonte de carbono, verifica-se que existem diferenças quanto à presença de glucose (curva a vermelho) em relação à sua ausência (curva azul). Na presença de glucose, na estirpe AG100, observa-se uma menor acumulação de EtBr no interior da célula, por sua vez a ausência da fonte de carbono implica uma acumulação contínua de EtBr no meio intracelular. O que indica que na ausência da fonte de carbono existe inibição da actividade de efluxo pelo sistema AcrAB-TolC que obtém energia a partir da hidrólise de ATP. Tal como para o NMP, a glucose consegue atenuar o efeito do verapamil, pelo que se infere que estes compostos actuaram directamente e de forma transiente nas vias glicolíticas que abastecem as ATPases garantindo a FPM para a actividade do sistema AcrAB-TolC. Igualmente se infere que os restantes sistemas de efluxo que substituem o AcrAB-TolC, na sua ausência, estão menos dependentes das vias glicolíticas.

Os resultados apresentados permitem concluir que todos os compostos testados demonstraram ser, com maior ou menor eficiência, inibidores do efluxo em *E. coli* promovendo a acumulação de EtBr. Todos os inibidores estudados demonstraram contribuir para a acumulação de EtBr no interior da célula em tempo real, sendo que o Na_3VO_4 foi o inibidor que promoveu o efeito inibitório mais relevante. Este composto tem um forte efeito inibidor de sistemas energéticos que utilizam a FPM acoplada às ATPases (Bebane *et al.*, 1987), como é o caso do sistema AcrAB-TolC. Por sua vez, o CPZ, a TZ e o VP também apresentaram um significativo efeito na acumulação de EtBr. A TZ demonstrou-se eficiente na inibição da bomba AcrAB-TolC, mas apenas durante os primeiros 15 minutos, porque posteriormente ocorreu uma diminuição na acumulação do substrato, possivelmente por activação de mecanismos sistemas de efluxo acessórios ou eventual efeito sobre a viabilidade celular. Contudo, verifica-se que nenhum destes inibidores é específico da bomba AcrAB-TolC. Inibem o sistema de efluxo AcrAB-TolC mas também inibem outras bombas de efluxo de uma forma não específica. Embora as fenotiazinas tenham apresentado um efeito inibitório preferencial sobre o sistema AcrAB-TolC, o CCCP e NMP foram os inibidores que promoveram menor efeito inibitório em tempo-real ao induzirem a menor acumulação do substrato EtBr dos ensaios realizados.

De realçar que o NMP foi o composto com maior capacidade na redução das CMI's dos antibióticos estudados, bem como do EtBr. Tal aparente contradição com os resultados anteriores, deve ser enquadrada no contexto dos procedimentos experimentais de cada ensaio: o ensaio de determinação da CMI tem duração de 18 horas e o ensaio de fluorimetria em tempo real tem duração de 30 minutos. No segundo ensaio avalia-se o efeito inibitório sobre o efluxo/influxo de EtBr enquanto no primeiro se avalia o efeito destes compostos sobre a acção conjunta com um antibiótico, misturando-se dois mecanismos de acção que podem ser sinérgicos e não obrigatoriamente envolver apenas a inibição do efluxo de longo prazo.

Reside assim a questão de como actuam estes “supostos” inibidores de sistemas de efluxo do ponto de vista do mecanismo de acção, uma vez que já se demonstrou que promovem a diminuição das CMI's de antibióticos e EtBr bem como promoveram, em tempo real e em condições sub-inibitórias, a retenção celular deste reconhecido substrato de sistemas de efluxo.

Sabendo-se que o sistema de efluxo AcrAB-TolC actua recorrendo à FPM resultante do gradiente protónico é importante recolher informação de como se encontra o estado de polarização das células ao fim de cada ensaio de acumulação de EtBr na presença e ausência dos inibidores, isto é, aos 30 minutos de exposição, através da medição do respectivo potencial de membrana.

3.2.2 Influência dos inibidores no Potencial de membrana ($\Delta\Psi$)

Como os resultados anteriores mostraram que todos os compostos estudados evidenciaram ser inibidores do efluxo, tornou-se relevante para o estudo dos mecanismos de acção de cada um dos inibidores, determinar qual a sua influência no potencial de membrana das células bacterianas. O potencial de membrana é gerado pela diferença de concentrações de iões no interior e no exterior da membrana citoplasmática, componente do gradiente electroquímico, relacionado com a formação de ATP na célula (Shapiro, 2000). O potencial de membrana foi medido com recurso a um corante, DiOC₂, de acordo com o protocolo apresentado em 2.2.5 nos Materiais e Métodos. Este composto é um corante catiónico e lipofílico que atravessa facilmente a membrana celular. Os microrganismos com a membrana polarizada apresentam no seu interior a carga negativa. Nestas condições, o corante por afinidade electrostática, forma agregados no interior da célula que promovem a fluorescência vermelha (Novo *et al.*, 1999; Shapiro, 2000). Quando a célula se encontra despolarizada, ou seja quando tende a ficar menos negativa a fluorescência emitida será verde (Novo *et al.*, 1999; Shapiro, 2000). O potencial de membrana será nulo quando a membrana apresenta danos estruturais que permitam a passagem livre de iões entre as duas faces ou quando compostos como o CCCP, designados por desacopladores, também anulam o potencial de membrana (Novo *et al.*, 1999 e 2000). Uma vez que, a fluorescência do EtBr interfere com o sinal do DiOC₂ estes ensaios de medição da polarização celular mimetizaram as condições experimentais dos ensaios de acumulação excepto no que se refere à presença de EtBr no meio, isto é, a percentagem de células polarizadas foi medida ao fim de 30 minutos de exposição para cada inibidor na ausência de EtBr de forma a medir-se exclusivamente o efeito destes no potencial de membrana e poder inferir-se sobre o efeito de cada inibidor sobre o potencial protónico. Uma vez que

anteriormente se evidenciou que o sistema AcrAB-TolC é o principal sistema de efluxo de EtBr em *E. coli*, a estirpe seleccionada para este ensaio foi a AG100 que retém todo o sistema funcional. Os resultados obtidos para o potencial de membrana na presença dos diferentes inibidores encontram-se na Figura 24.

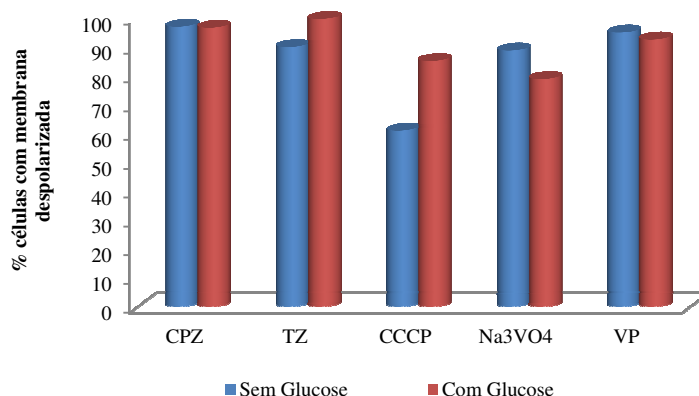


Figura 24 – Influência dos inibidores sobre a polarização da membrana celular da estirpe AG100, aos 30 minutos de ensaio de exposição aos inibidores. Os inibidores foram utilizados numa concentração final de $\frac{1}{2}$ CMI determinada, na presença e na ausência de glucose (0,4%).

Através da análise do gráfico apresentado verifica-se que as células da estirpe AG100 na presença dos inibidores CPZ, TZ, CCCP, Na₃VO₄ e VP aos 30 minutos apresentam uma percentagem de células despolarizadas de 98, 98, 95, 95 e 92%, respectivamente. Na presença de inibidores com glucose aos 30 minutos de ensaio as células apresentaram 89, 95, 90, 95 e 98% de células despolarizadas, respectivamente. Demonstra-se assim que, uma grande maioria das células sofre despolarização da membrana com quebra do potencial protónico aos 30 minutos de exposição a todos os inibidores estudados pelo que se infere que tal conduza à inibição da actividade do sistema AcrAB-TolC (e de outros sistemas de efluxo dependentes da FPM) levando à acumulação de EtBr no interior das células, tal como evidenciado nos ensaios de acumulação anteriores (Figuras 18 a 23). Este efeito despolarizante é independente da presença da glucose uma vez que as diferenças de percentagem de despolarização são pouco significativas. Não são apresentados resultados para o NMP porque os resultados não puderam ser validados em tempo útil para a inclusão neste manuscrito.

Estes resultados são suportados pela análise das imagens obtidas para cada condição analisada, e apresentados na Figura 25.

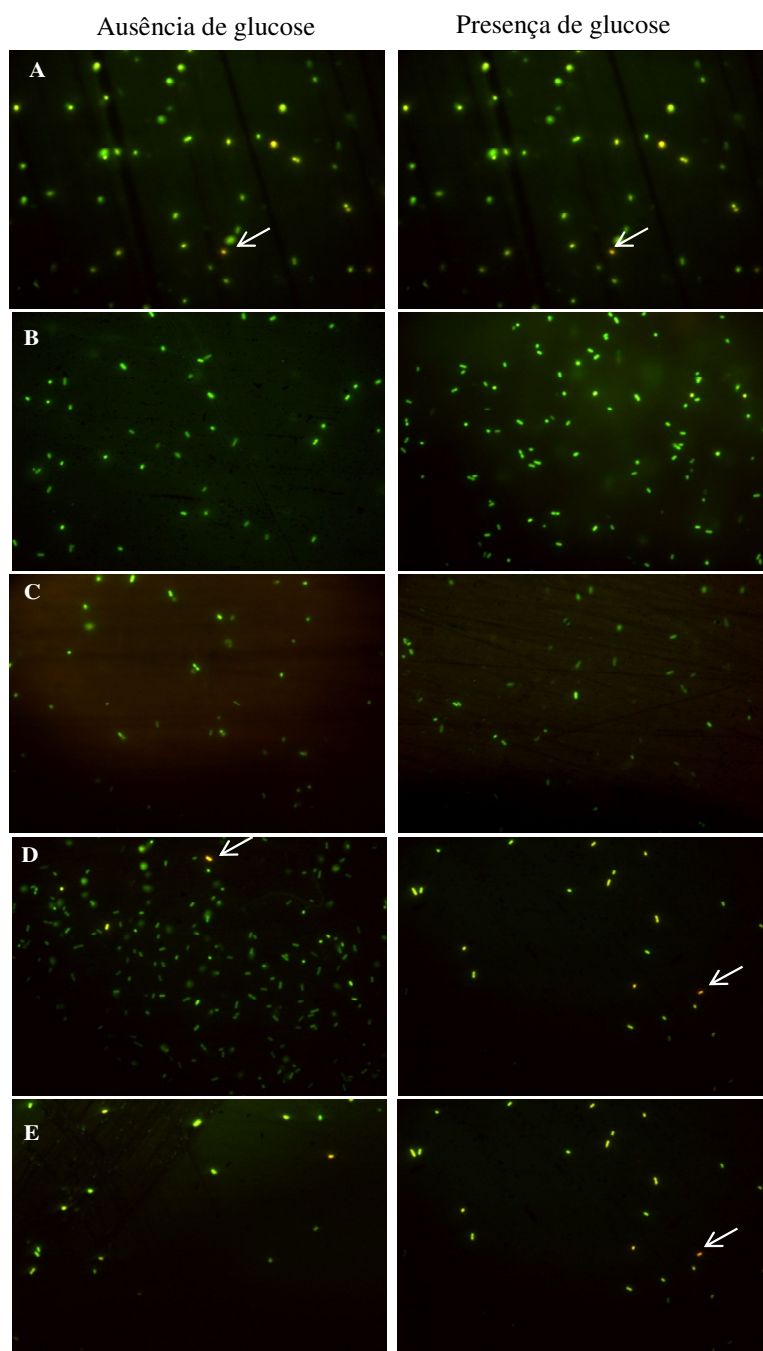


Figura 25 – Imagens de microscopia de fluorescência representativas da influência dos inibidores sobre a polarização da membrana celular da estirpe AG100 ao fim de 30 minutos de ensaio. Os inibidores (A) CPZ, (B) TZ, (C) CCCP, (D) Na_3VO_4 , (E) VP foram testados com a concentração final de $\frac{1}{2}$ CMI, na presença e na ausência de glucose (0,4%). Ampliação: 1500X, Imagem com campo horizontal de 0,08 mm, 80 μm e campo vertical de 0,06mm, 60 μm . Resolução: 2580 X 1920.

As imagens da Figura 25 representam o potencial de membrana no final de 30 minutos de ensaio; as células verdes são representativas de células despolarizadas, ou seja células livres de energia e com carga menos negativa no interior da membrana. Em todas as imagens, verifica-se que a presença dos inibidores potenciam a despolarização da membrana nos primeiros 30 minutos de ensaio, uma vez que as células na sua maioria apresentam cor verde.

3.2.3 Influência dos inibidores na viabilidade celular

Os resultados anteriores só terão significado para a inibição do efluxo se a despolarização das células for transiente e que tenha ocorrido em células com a membrana intacta, logo viáveis. Assim, o estudo de viabilidade celular no final de cada ensaio de acumulação na presença dos inibidores é essencial para a interpretação dos resultados de fluorometria. Pretende-se garantir que o incremento de fluorescência se deve à inibição do fornecimento de energia às bombas de efluxo e não à difusão para o exterior do EtBr resultante da morte celular, que advém da exposição das estirpes a concentrações letais do composto. Assim, efectuou-se a análise da viabilidade celular de acordo com o protocolo apresentado em 2.2.5 nos Materiais e Métodos, que avalia a integridade da membrana através da fluorescência emitida pelo corante SYTO9 que floresce de verde nas células com as membranas intactas em contraste com o iodeto de propídio que cora de vermelho as células danificadas uma vez que a membrana celular integra não é permeável ao mesmo (Boulos *et al.*, 2009). Resumindo, a integridade da membrana é representada/avaliada pela fluorescência verde e a perda dessa integridade é representada/avaliada pela fluorescência vermelha das células. De notar que este protocolo está optimizado para uma exposição de uma hora aos agentes em avaliação, razão pela qual os ensaios de viabilidade foram estendidos por mais 30 minutos relativamente às experiências anteriores. Os resultados encontram-se ilustrados nas Figuras 26 e 27.

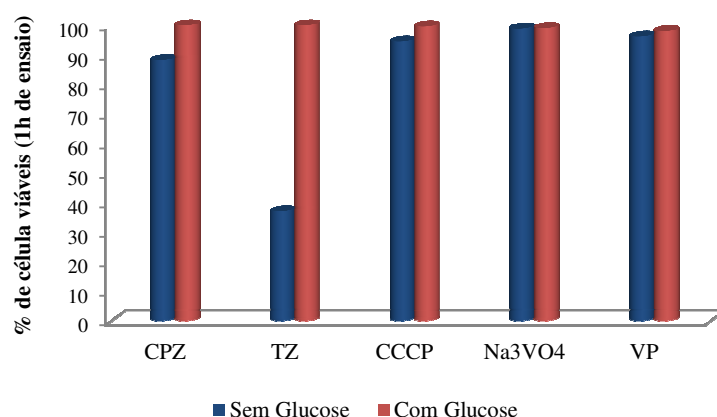


Figura 26 – Gráfico representativo da % de células viáveis para AG100. Estas células foram analisadas ao microscópio no final de 1 hora de ensaio.

Com a análise do gráfico representado na Figura 26, observou-se que os inibidores testados não degradam a membrana celular, mantendo-se a viabilidade celular até ao final de uma hora de ensaio. O único inibidor que coloca em causa a viabilidade celular é a TZ que apresentou apenas 35% de células viáveis no final de uma hora quando as células são expostas a este agente na ausência de glucose. Esses resultados podem ser comprovados pelas fotografias de microscopia de fluorescência apresentadas na Figura 27.

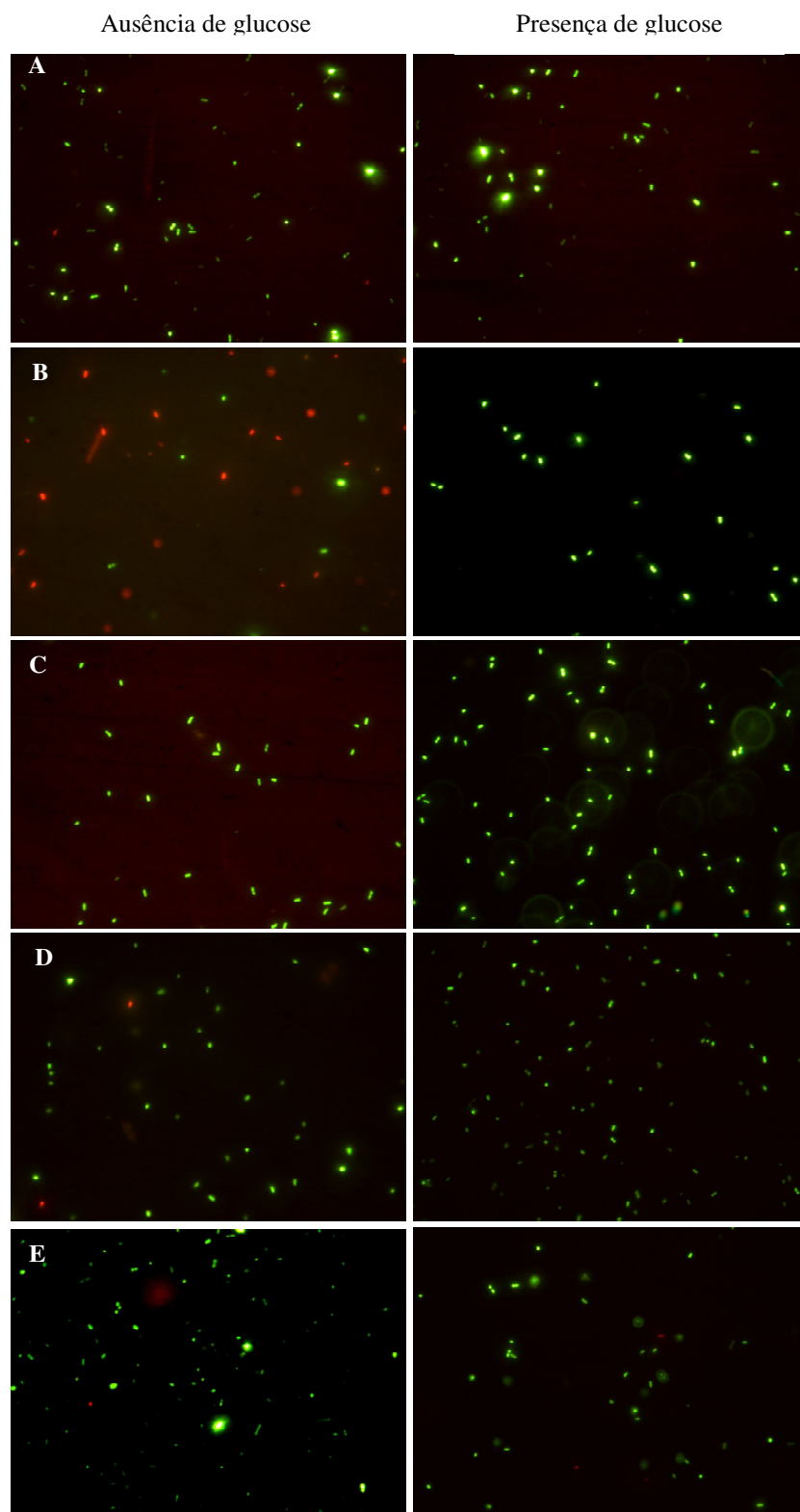


Figura 27 – Fotografias de microscopia fluorescência dos ensaios de viabilidade. As células foram analisadas ao microscópio de fluorescência ao fim de 1 hora de ensaio. Os inibidores (A) CPZ, (B) TZ, (C) CCCP, (D) Na_3VO_4 , (E) VP foram testados a $\frac{1}{2}$ CMI, na presença e na ausência de glucose. Ampliação: 1500X, Imagem com campo horizontal de 0,08 mm, 80 μm e campo vertical de 0,06 mm, 60 μm . Resolução: 2580 X 1920.

Face a estes resultados podemos afirmar que a inibição do efluxo, por exposição ao inibidor nos ensaios de acumulação de EtBr (Figuras 18 a 23), deveu-se à despolarização transiente das células tendo esta ocorrido com a membrana celular intacta, logo em células viáveis. Deste modo, comprova-se a viabilidade celular durante os ensaios de acumulação. Conclui-se que o incremento de fluorescência deve-se à inibição da fonte de energia para a actividade das bombas de efluxo, a FPM, e não à difusão para o exterior do EtBr resultante da morte celular que advém da exposição das estirpes a concentrações letais do composto. A única condição em que isto não se verifica, foi no ensaio de acumulação de EtBr na presença de TZ e ausência de glucose (vide curva a azul na Figura 19). O “retomar do efluxo” neste caso poderá ser devido ao “leakage” do EtBr pela significativa diminuição da viabilidade celular durante o ensaio de exposição das células usando $\frac{1}{2}$ da MIC da TZ. Conrad *et al.* (1979) verificou que a presença de glucose como fonte de carbono pode influenciar significativamente a susceptibilidade aos antibióticos em *P. aeruginosa*. A glucose parece exercer um efeito “protector” sobre as células e possivelmente foi esse o efeito que se observou nos resultados de microscopia com a TZ, na presença de glucose, *p.e.* a glucose torna *E. coli*, menos susceptível à TZ.

Não são apresentados resultados para o NMP porque os resultados não puderem ser validados em tempo útil para a inclusão neste manuscrito.

De forma a validar estes resultados torna-se essencial realizar ensaios onde se avalie exclusivamente o efluxo do substrato EtBr em tempo real, durante 30 minutos na presença e ausência dos inibidores. Nestes ensaios, promove-se a acumulação de EtBr durante 60 minutos nas condições de efluxo mínimo (sem glucose e na presença do inibidor a $\frac{1}{2}$ MIC) findo o qual o inibidor é retirado por lavagem. Seguidamente monitoriza-se durante 30 minutos o decaimento da fluorescência por efluxo de EtBr em condições de efluxo máximo (com glucose) na presença e ausência do inibidor, sendo o processo normalizado contra as condições de efluxo mínimo.

3.2.4 Influência dos inibidores em estudo no efluxo de EtBr

O ensaio de efluxo de EtBr na presença do inibidor de efluxo foi realizado como descrito nos Materiais e Métodos, ponto 2.1.6.4. Com estes ensaios pretende-se visualizar, em tempo real, exclusivamente o efluxo do substrato EtBr, e igualmente “quantificar” a capacidade dos compostos em estudo de inibirem esse mecanismo de efluxo. Para otimizar a leitura e interpretação dos resultados, efectua-se a sua normalização em função do controlo de células inibidas, porque é essencial ter um ponto de comparação, em tempo real, entre células com efluxo inibido (onde a acumulação/retenção do EtBr é máxima, ponto onde a fluorescência relativa é 1) e o processo normal de efluxo de células de onde é eliminado o inibidor por lavagem. A partir desse ponto avalia-se a extrusão do EtBr, através do decréscimo de acumulação ou em relação à fluorescência relativa da unidade referência (células inibidas) (Viveiros *et al.*, 2008, Paixão *et al.*, 2009). Os resultados apresentam uma recta a tracejado e duas curvas. A recta a tracejado refere-se à normalização pelo mínimo de efluxo (estirpe na presença do inibidor e sem glucose), pois nesta situação o inibidor potencia o máximo de acumulação de EtBr, bloqueando a saída do mesmo, sendo arbitrariamente igual a 1 ao longo do ensaio (Figuras 28 e 29). A curva referente à “estirpe+glucose” (a azul nos gráficos das Figuras 28 e 29) evidencia o efeito das condições óptimas para o efluxo pois será nesta situação que ocorre o máximo de efluxo possível devido à presença da fonte energética, e numa segunda curva observa-se a “estirpe+glucose+inibidor” (a verde nos gráficos das Figuras 28 e 29) onde se pretende verificar o efeito do inibidor. Neste ultimo caso, espera-se que o efluxo seja reduzido ou até nulo caso o inibidor seja realmente eficiente na inibição dos sistemas de efluxo. Os resultados obtidos para cada inibidor testado neste trabalho encontram-se nas Figuras 28 e 29.

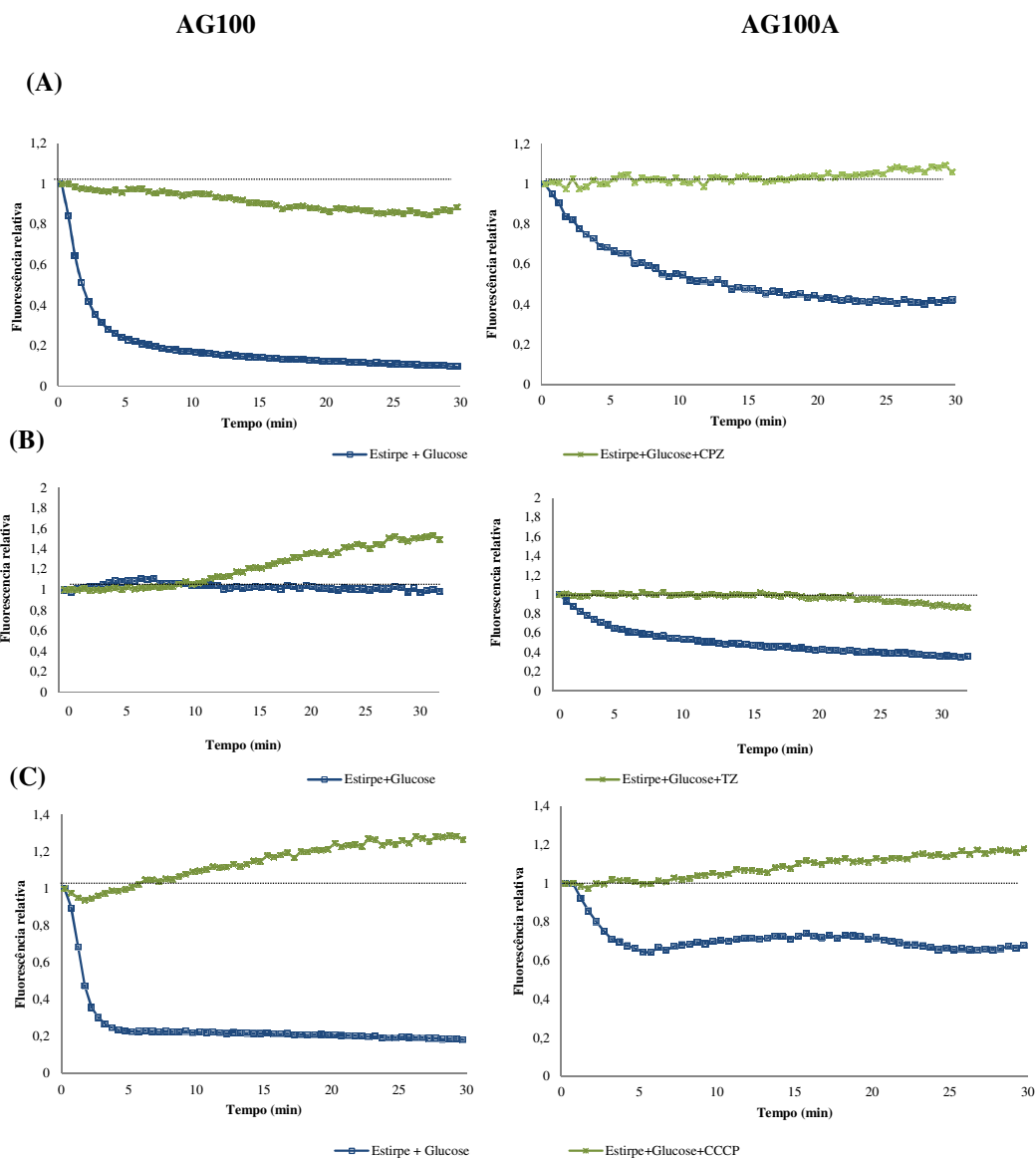


Figura 28 – Representação dos ensaios de efluxo para as duas estirpes AG100 e AG100A. Em (A) influência do inibidor CPZ no ensaio de efluxo, (B) inibidor TZ, (C) inibidor CCCP. No ensaio de efluxo de EtBr, as células sofreram uma incubação, uma hora à temperatura ambiente, com concentração de EtBr de (1mg/L-AG100 e 0,5 mg/L-AG100A) e com os referidos inibidores a uma concentração de $\frac{1}{2}$ de CMI. Os resultados foram normalizados por comparação de todas as condições em relação à condição mínima de efluxo (estirpe + inibidor).

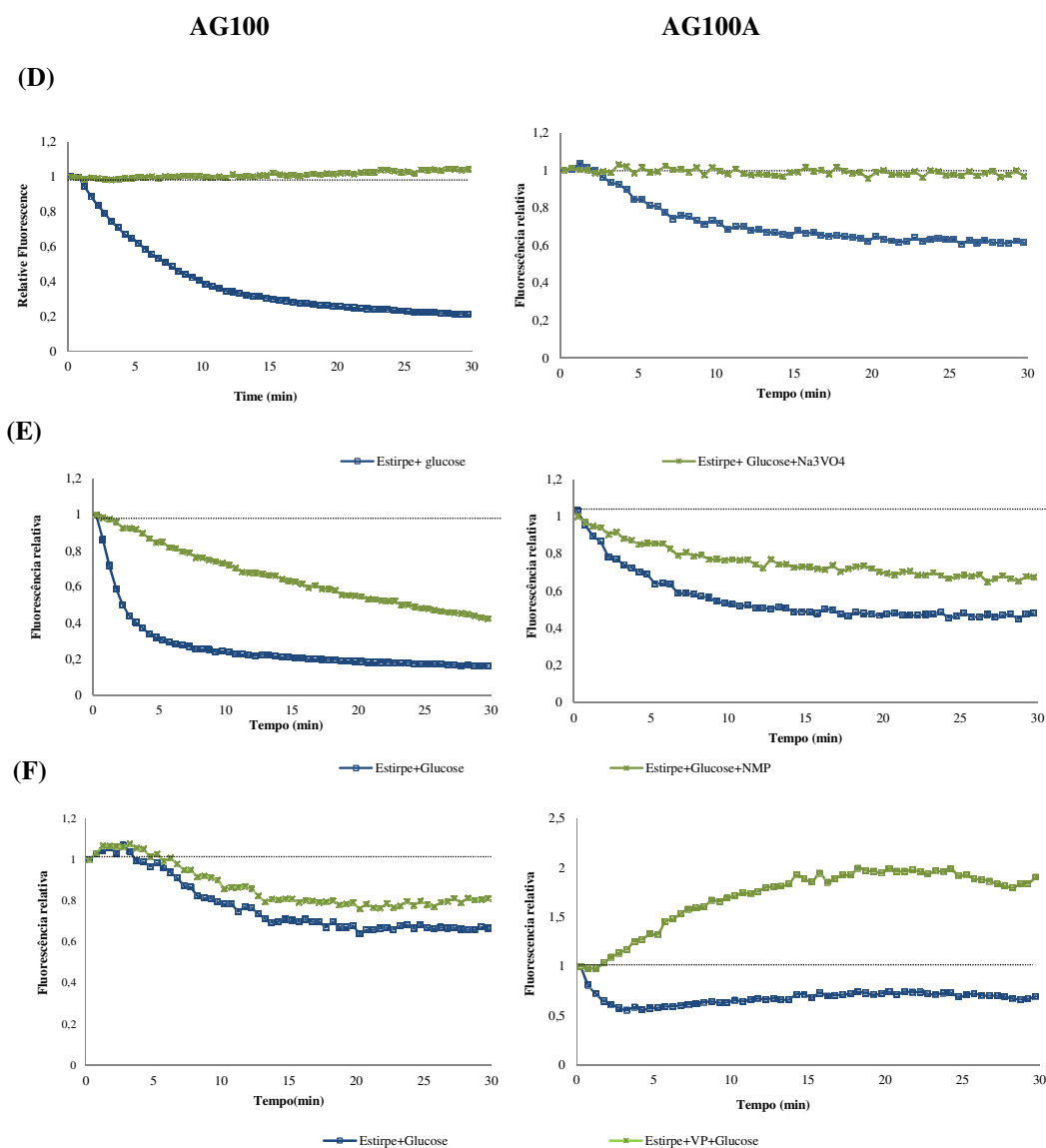


Figura 29 - Representação dos ensaios de efluxo para as duas estirpes AG100 e AG100A. Em (D) influência do inibidor Na_3VO_4 no ensaio de efluxo, (E) inibidor NMP, (F) inibidor VP. No Ensaio de efluxo de EtBr, as células sofreram uma incubação, uma hora à temperatura ambiente, com concentração de EtBr de (1mg/L e 0,5 mg/L) e com os referidos inibidores a uma concentração de $\frac{1}{2}$ de CMI. Os resultados foram normalizados por comparação de todas as condições em relação à condição mínima de efluxo (Estirpe + inibidor).

Da análise detalhada dos resultados obtidos para o inibidor CPZ, representado na Figura 28 (A) confirma-se que este é um potente inibidor de efluxo em *E. coli* e em particular do sistema de efluxo AcrAB-TolC. Esta afirmação deriva da comparação entre o controlo “estirpe+glucose”, curva azul, com a condição “estirpe+glucose+CPZ”,

curva verde. O CPZ consegue promover a acumulação/retenção de grande quantidade de EtBr nas células durante o período de acumulação (*vide* Figura 18 com Figura 28A), sendo depois capaz de inibir o efluxo do mesmo durante todo o período do ensaio de efluxo (30 minutos), mesmo na presença da glucose. Tal facto indica que actuará após as vias glicolíticas em particular junto das ATPases dependentes do cálcio que fornecem a FPM para a actividade do sistema AcrAB-TolC. Como é o caso das P-ATPases bacterianas, bombas iónicas que fazem a passagem de iões de cálcio, potássio e sódio por troca de protões e como tal contribuem significativamente para a manutenção da FPM. Uma vez mais se conclui que a inibição da extrusão do substrato EtBr é preferencial para o sistema AcrAB-TolC mas este não é o único pois, o CPZ apresentou capacidade de inibir outros sistemas que não o AcrAB-TolC, uma vez que este se encontra inactivo em AG100A e mesmo assim esta estirpe apresentou inibição de efluxo na presença de CPZ.

Quando se recorre à mesma análise para o inibidor TZ, representado em **(B)** não se conseguiu observar o mesmo grau de inibição do efluxo de EtBr obtido para CPZ. Comparando este resultado com o efeito da TZ na acumulação de EtBr (*vide* Figura 19 com Figura 28B), pode-se concluir que este composto não é um bom inibidor do efluxo de EtBr e aparenta ter um efeito inibitório muito rápido que, ao longo do tempo vai diminuindo. De notar que existe uma correspondência entre a baixa viabilidade celular detectada no fim do período de acumulação na ausência de glucose para AG100, (Figura 26 e 27) e a diminuta capacidade de efluxo demonstrada no ensaio de efluxo (Figura 28B).

Em relação ao inibidor de efluxo canónico do sistema AcrAB-TolC, o desacoplador da FPM, CCCP (Tu *et al.*, 2004), representado em **(C)** verifica-se que este inibidor apresenta um comportamento esperado de acordo com a literatura, demonstrando ser um bom inibidor dos sistemas de efluxo. Analisando o controlo “estirpe + glucose”, curva azul, e a condição “estirpe + glucose + CCCP”, curva verde, verifica-se que o CCCP inibe o sistema AcrAB-TolC com eficiência durante o período do ensaio e comparando ambas as estirpes, observa-se que este inibidor é altamente eficiente sobre o sistema AcrAB-TolC, uma vez que na estirpe que tem este sistema inactivo a inibição do efluxo é muito menor. Assim, mais uma vez se demonstra

experimentalmente a dependência do sistema AcrAB-TolC da sua principal fonte de energia, a FPM.

Recorrendo à análise do terceiro inibidor apresentado em **(D)**, Na₃VO₄ observa-se que este composto proporciona uma forte inibição no efluxo do substrato EtBr, seguindo o mesmo padrão de comparação já referenciado nos outros inibidores. É também evidente, a importância da glucose neste ensaio, tal como já tinha sido observado nos ensaios de acumulação; a glucose não apresenta um papel relevante sobre a acção deste inibidor, confirmando-se assim, que a sua actividade inibitória das vias glicolíticas, que abastecem as ATPases e garantem a FPM para a actividade do sistema AcrAB-TolC, não é transiente e não é superável pela presença da glucose (*cf.* o NMP e o verapamil, dois supostos inibidores das vias glicolíticas). Uma vez mais, com a comparação de ambas as estirpes, verifica-se que este inibidor apresenta um efeito mais significativo sobre o transporte de EtBr promovido pelo sistema AcrAB-TolC.

No que refere ao inibidor NMP, apresentado em **(E)** demonstra-se ser um inibidor de efluxo menos eficiente, comparando o controlo “estirpe + glucose”, curva azul, com a condição “estirpe + glucose + NMP”, curva verde, uma vez que não se verificam diferenças significativas entre eles. O mesmo se observou quando se recorreu à comparação das duas estirpes entre si, não se verificou inibição significativa na extrusão do EtBr. O resultado apresentado para este inibidor, é aparentemente discordante com o obtido e anteriormente exposto para os resultados da determinação da CMI dos antibióticos e EtBr na presença de inibidores de bombas de efluxo. Este composto mostrou ter elevada capacidade na diminuição da CMI dos antibióticos (Tabela 10). O que se justifica pelo facto deste composto ter uma actuação sinérgica com os antibióticos que provavelmente apenas tem um efeito indirecto sobre a efluxo, não sendo por isso um bom inibidor de efluxo uma vez que este não será o seu mecanismo de acção primordial.

Por último, o inibidor VP, em **(F)**, apresentou um efeito inibitório de extrusão de EtBr reduzido para o sistema AcrAB-TolC uma vez que, a ½ da CMI não promove a acumulação nem inibe significativamente o efluxo em AG100 (*cf.* Figura 23 com Figura 29F). O mesmo não se verifica para a estirpe AG100A, onde o VP se mostra um eficiente inibidor dos sistemas de efluxo que substituíram o sistema AcrAB-TolC em AG100A.

Dos cinco compostos testados, e apesar de todos terem demonstrado capacidade de actuação como inibidores de efluxo pelo sistema AcrAB-TolC de *E. coli* por despolarização da membrana sem comprometer a viabilidade celular (excepto TZ na ausência de glucose), dois demonstraram um superior poder redutor do efluxo de EtBr em tempo real, o CPZ e o Na_3VO_4 , com especial relevância para o Na_3VO_4 . Este poder inibitório foi mais evidente sobre o sistema AcrAB-TolC (mas não específico) tendo garantido altas taxas de retenção de substrato em tempo real, não comprometendo a viabilidade celular. Estes dois inibidores demonstraram ser excelentes candidatos para adjuvantes de quimioterapia para inibição de efluxo dos agentes antimicrobianos.

Tendo os resultados apresentados nos ensaios de acumulação e efluxo demonstrado que o melhor inibidor é o Na_3VO_4 , decidiu-se quantificar e comparar a capacidade de cada composto inibir o efluxo de EtBr num ensaio simultâneo, tendo-se realizado um ensaio de efluxo onde a incubação/acumulação foi feita com o inibidor mais eficiente (Na_3VO_4), garantindo a maior retenção de EtBr possível, e o efluxo inibido por cada um dos compostos testados (mais um controlo sem inibidor). Com base neste ensaio diferenciaram-se os inibidores em função da fluorescência final relativa (RFF) determinados ao fim de 30 minutos de efluxo na presença do inibidor (ver Métodos e Métodos 2.1.6.3). Os resultados encontram-se apresentados na Figura 29.

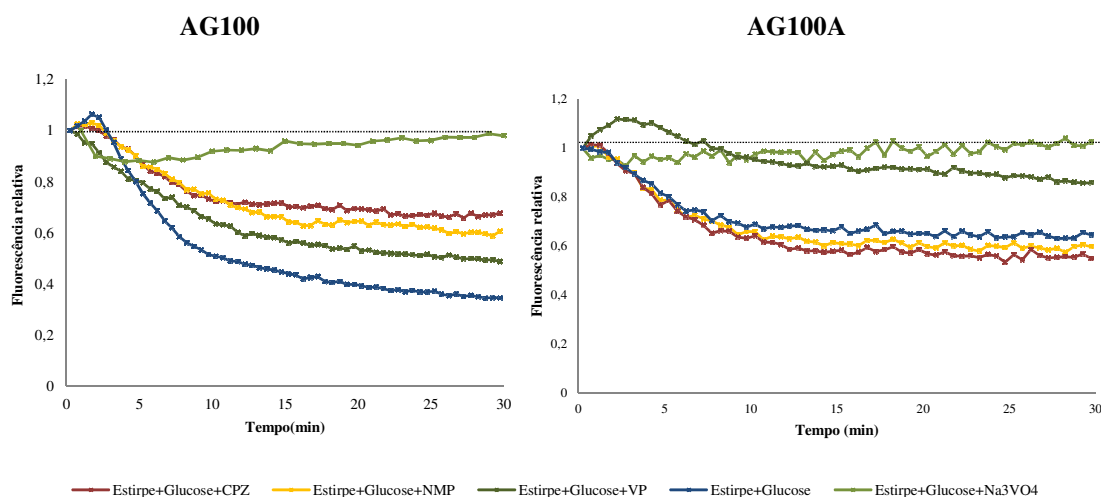


Figura 30 – Representação do ensaio de efluxo para as duas estirpes AG100 e AG100A. As células foram incubadas com o melhor inibidor Na_3VO_4 a $\frac{1}{2}$ da CMI e com concentração de EtBr (1mg/L-AG100 e 0,5 mg/L-AG100A). Os resultados foram normalizados por comparação de todas as condições em relação à condição mínima de efluxo (estirpe + inibidor). Os ensaios foram realizados em triplicado.

Tabela 11 – Valores obtidos de fluorescência final relativa para ambas as estirpes.

Estirpe	RFF				
	+ CPZ	+ Na ₃ VO ₄	+ VP	+ CCCP	+NMP
AG100	1,18	1,38	0,25	0,05	0,95
AG100A	-0,08	0,74	1,44	0,18	0,02

RFF: fluorescência final relativa.

Os valores determinados de RFF demonstram que o Na₃VO₄ e o CPZ são os inibidores de efluxo mais eficientes para o sistema AcrAB-TolC de *E. coli*, confirmando os ensaios de acumulação e efluxo. Para os sistemas de efluxo que substituíram o sistema AcrAB-TolC de *E. coli* em AG100A o inibidor mais eficiente do efluxo de EtBr foi o VP o que confirma os resultados anteriormente obtidos para a redução da CMI do EtBr, comprovando o facto de ser um inibidor inespecífico (Tabela 10).

3.3 Estudo de competição entre substratos do sistema de efluxo AcrAB-TolC

Pelos resultados anteriores infere-se que os inibidores estudados actuam inactivando a fonte de energia para o efluxo através do sistema AcrAB-TolC por despolarização da membrana de *E. coli*. Um segundo objectivo desta tese é compreender se este sistema de efluxo apresenta capacidade para reconhecer várias moléculas que sejam estruturalmente diferentes, pois um dos grandes objectivos da terapêutica clínica é a junção de adjuvantes terapêuticos com função de inibir o efluxo e em simultâneo permitirem a retenção do antimicrobiano no interior da célula para atingir o seu alvo. Estudos realizados sugerem a existência de substratos, incluindo antibióticos, corantes, detergentes, biocidas e alguns solventes que competem no efluxo por um determinado local de ligação em AcrAB, permitindo dessa forma o efluxo preferencial de um substrato e retenção do outro dos substratos, permitindo assim que o segundo atinja o seu alvo antes de ser efluxado, contribuindo para a diminuição dos fenómenos de MDR (Elkins, 2007). Para alcançar este objectivo realizaram-se estudos de competição entre diferentes substratos do sistema AcrAB-TolC. Como modelo celular experimental usou-se a estirpe padrão AG100 e os compostos utilizados no estudo de competição foram os antibióticos (tetracilina, ofloxacina e oxacilina), o EtBr (substrato marcador da actividade do AcrAB-TolC) e os inibidores de efluxo (CPZ e

Na₃VO₄), anteriormente descritos como os mais eficientes. Utilizaram-se concentrações crescentes dos antibióticos, variando entre ¼ e ½ da CMI, o EtBr foi utilizado na concentração 1 mg/L, para a estirpe AG100, e os inibidores de efluxo foram usados em concentrações fixas mínimas que permitissem uma inibição parcial do efluxo de EtBr das células (¼ da CMI dos inibidores) de modo a poder avaliar-se se a presença simultânea de concentrações variáveis de antibióticos promoviam a retenção de EtBr. Todos os ensaios foram realizados em condições óptimas de efluxo para as células, na presença de glucose (0,4%).

3.3.1 Estudo da competição entre os substratos na ausência de inibidores de efluxo

Começou-se por tentar estudar o efeito dos antibióticos sobre a acumulação do substrato EtBr, na ausência de inibidores, com o intuito de avaliar o efeito competitivo do antibiótico.

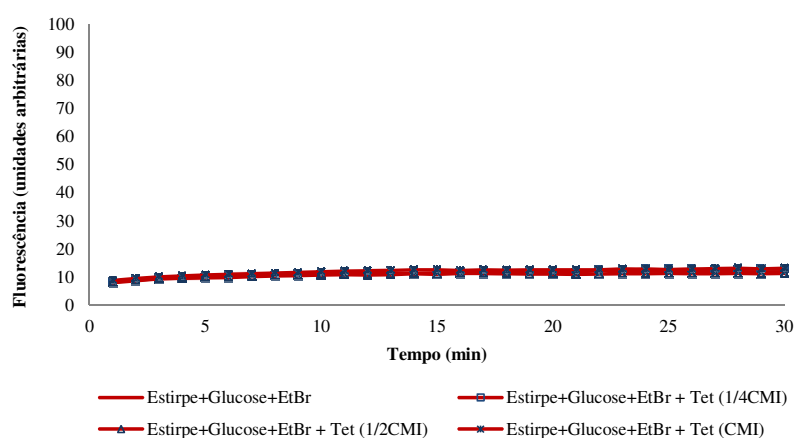


Figura 31 – Gráfico representativo da análise de competição de EtBr entre diferentes concentrações de tetraciclina na ausência de compostos inibidores de efluxo. Ensaio de acumulação com concentrações crescentes de tetraciclina, EtBr a 1mg/L, e glucose a 0,4%.

Após a análise dos gráficos da Figura 31, verifica-se que o antibiótico não permite um aumento da acumulação de EtBr. É necessária a utilização de um inibidor de efluxo de modo a se conseguir observar acumulação de EtBr no interior das células. A concentração de EtBr seleccionada por si só não promove acumulação, e com a

adição de concentrações crescentes do antibiótico, a acumulação de EtBr permanece no seu valor basal. Este ensaio foi realizado para as três famílias de antibióticos, por serem antibióticos com mecanismos de acção diferentes, no entanto, os resultados obtidos foram semelhantes, *p.e.*, o antibiótico por si só não promove a acumulação de EtBr.

3.3.2 Estudo da competição entre os substratos na presença de inibidores de efluxo

Tal como referido anteriormente, os inibidores seleccionados foram os que se mostraram em ensaios anteriores com maior capacidade para inibir o efluxo da bomba AcrAB-TolC, o CPZ e o Na_3VO_4 . Estes foram usados na menor concentração possível de forma a promover retenção basal de EtBr, $\frac{1}{2}$ da CMI para o CPZ e $\frac{1}{4}$ da CMI para o Na_3VO_4 , determinados nos ensaios anteriores.

3.3.2.1 Estudo da competição entre a tetraciclina e o substrato EtBr na presença de inibidores de efluxo

Na presença de CPZ

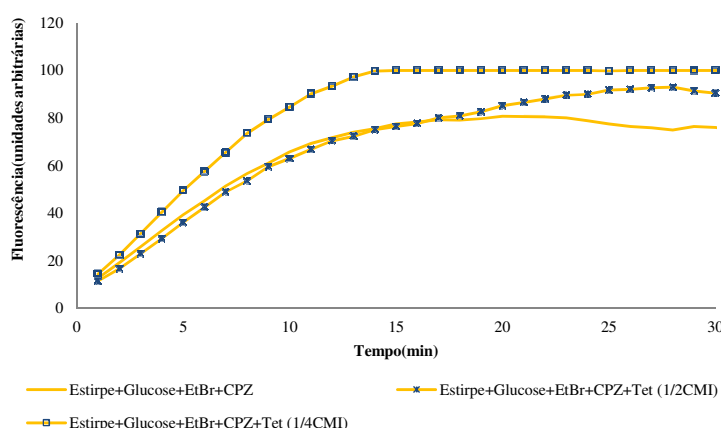


Figura 32- Gráfico representativo da análise de competição de EtBr entre diferentes concentrações de tetraciclina na presença de CPZ. Ensaio de acumulação para a estirpe AG100 na presença de CPZ ($\frac{1}{2}$ CMI); concentrações sub-inibitórias de tetraciclina $\frac{1}{2}$ CMI e $\frac{1}{4}$ CMI; EtBr a 1 mg/L e glucose a 0,4%.

Pela análise dos gráficos apresentados na Figura 32 verifica-se que na estirpe AG100, a presença de tetraciclina promove uma maior retenção de EtBr na célula, o que indica a existência de competição entre a tetraciclina e o EtBr, este resultado está de acordo com o publicado em Cerca *et al.* (2011). Isto porque, na presença de tetraciclina menos espaço é deixado livre para o efluxo das moléculas de EtBr, provocando uma maior retenção do mesmo nas células.

Presença de Na_3VO_4

O Na_3VO_4 demonstrou anteriormente ser o inibidor com maior efeito inibitório. Uma vez que para $\frac{1}{2}$ da CMI de Na_3VO_4 a acumulação de EtBr era muito elevada, o que dificultou a observação do efeito competitivo do antibiótico, o Na_3VO_4 foi utilizado a $\frac{1}{4}$ da CMI, de forma a obter uma acumulação de EtBr basal que permita interpretar o efeito da tetraciclina em competição com o EtBr.

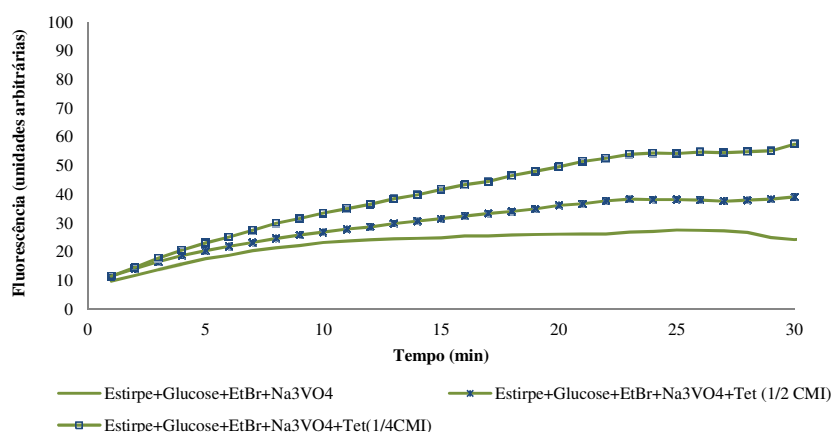


Figura 33- Gráfico representativo da análise de competição de EtBr entre diferentes concentrações de tetraciclina na presença de Na_3VO_4 . Ensaio de acumulação para a estirpe AG100 na presença de Na_3VO_4 ($\frac{1}{4}$ CMI); concentrações sub-inibitórias de tetraciclina $\frac{1}{2}$ CMI e $\frac{1}{4}$ CMI; EtBr a 1 mg/L e glucose a 0,4%.

Com a análise dos gráficos apresentados na Figura 33 verificou-se que a estirpe AG100, na presença de tetraciclina permite uma maior retenção de EtBr, indicando a existência de competição entre a tetraciclina e o EtBr.

3.3.2.2 Estudo da competição entre a oxacilina e o substrato EtBr na presença de inibidores de efluxo

O ensaio foi realizado com os inibidores CPZ e Na_3VO_4 a $\frac{1}{4}$ da CMI, com o EtBr e a glucose nas condições descritas anteriormente e oxacilina, que evidenciou sinais de efluxo pelo sistema AcrAB-TolC (*vide* Tabela 7). As concentrações seleccionadas para a utilização da oxacilina foram $\frac{1}{2}$ da CMI e $\frac{1}{4}$ da CMI. Os resultados encontram-se nos apresentados nas Figuras 34 e 35.

Na presença de CPZ

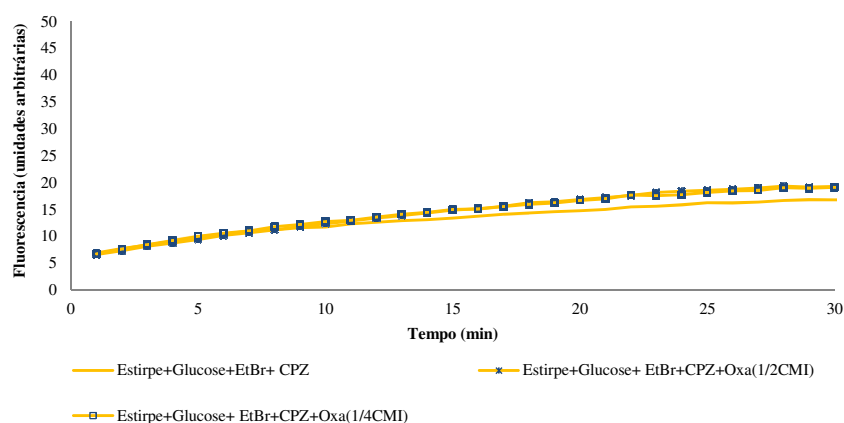


Figura 34 - Gráfico representativo da análise de competição de EtBr entre diferentes concentrações de oxacilina na presença de CPZ. Ensaio de acumulação para a estirpe AG100 na presença de CPZ ($\frac{1}{4}$ CMI); concentrações sub-inibitórias de oxacilina $\frac{1}{2}$ CMI e $\frac{1}{4}$ CMI; EtBr a 1mg/L e glucose a 0,4%.

Observando os gráficos da Figura 34, verificou-se que para a estirpe AG100, a adição de concentrações de oxacilina não varia de forma significativa a retenção de EtBr, não evidenciando sinais de competição entre oxacilina e EtBr.

Na presença de Na_3VO_4

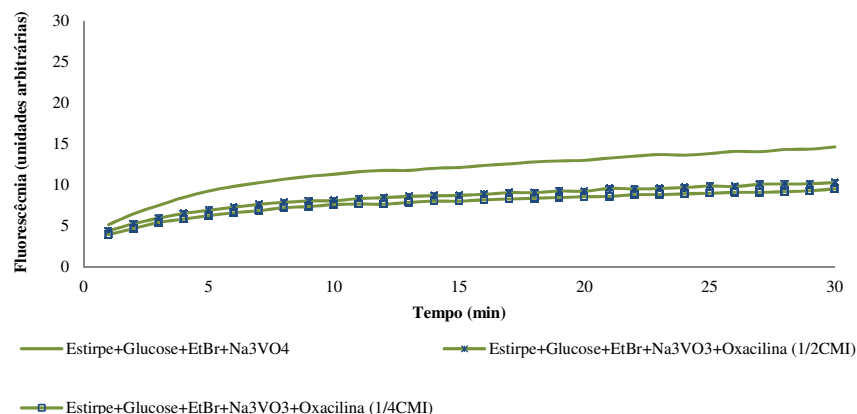


Figura 35 - Gráfico representativo da análise de competição de EtBr entre diferentes concentrações de oxacilina na presença de Na_3VO_4 . Ensaio de acumulação para a estirpe AG100 na presença de Na_3VO_4 (1/4 CMI); concentrações sub-inibitórias de oxacilina 1/2 CMI e 1/4 CMI; EtBr a 1mg/L e glucose a 0,4%.

Com a análise dos gráficos da Figura 35, verificou-se que para a estirpe AG100, não se observam variações significativas na retenção de EtBr. Com estes resultados não é possível concluir se este antibiótico é substrato da bomba AcrAB-TolC, tal como se poderia inferir dos resultados da diminuição da CMI da Oxacilina pela maioria dos inibidores de efluxo estudados. Possivelmente, a diminuição verificada na CMI é exclusivamente devida à acção sinérgica dos inibidores de efluxo com os antibióticos β -lactâmicos por via da diminuição da permeabilidade a quando da perda do potencial protónico provocado pelos inibidores de efluxo. Assim, a perda de diminuição da permeabilidade pelo desequilíbrio electrostático provocado pela despolarização permitirá que mais moléculas de antibiótico β -lactâmicos atinjam as “PBPs” e como tal, promovam uma actividade antimicrobiana mais eficiente pela inibição da síntese do peptidoglicano, tal como tem sido descrito na literatura (Cornaglia *et al.*, 1995). Esta questão só será explicada quando se monitorizar o possível efluxo de antibióticos β -lactâmicos marcados com fluoróforos.

3.3.2.3 Estudo da competição entre a ofloxacina e o substrato EtBr na presença de inibidores de efluxo

O ensaio foi realizado com os inibidores CPZ e Na_3VO_4 a $\frac{1}{4}$ CMI, com o EtBr e a glucose nas condições descritas anteriormente e ofloxacina. As concentrações seleccionadas para a ofloxacina foram $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ da CMI. Os resultados encontram-se nos apresentados nas Figuras 36 e 37.

Na presença de CPZ

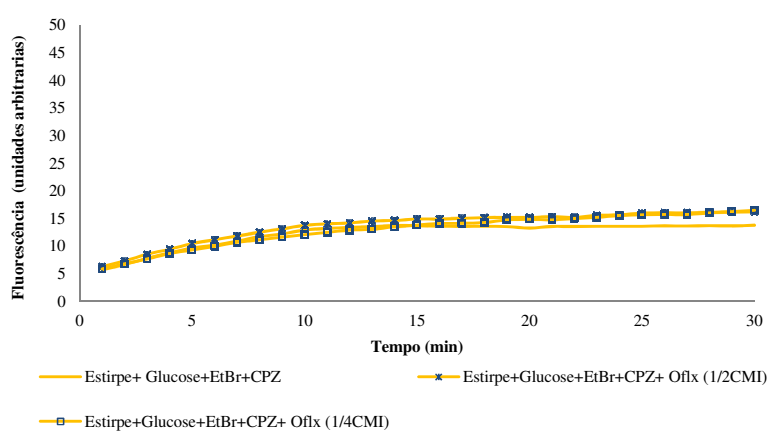


Figura 36 - Gráfico representativo da análise de competição de EtBr entre diferentes concentrações de ofloxacina na presença de CPZ. Ensaio de acumulação para a estirpe AG100 na presença de CPZ ($\frac{1}{4}$ CMI); concentrações sub-inibitórias de ofloxacina $\frac{1}{2}$ CMI e $\frac{1}{4}$ CMI; EtBr a 1mg/L e glucose a 0,4%.

Através da análise dos gráficos apresentados na Figura 36, para a estirpe AG100 observa-se uma alteração pouco significativa na retenção de EtBr, quando se adicionam moléculas de ofloxacina ao meio. Estes resultados não são suficientes para retirar conclusões sobre existência ou não de competição.

Na presença de Na_3VO_4

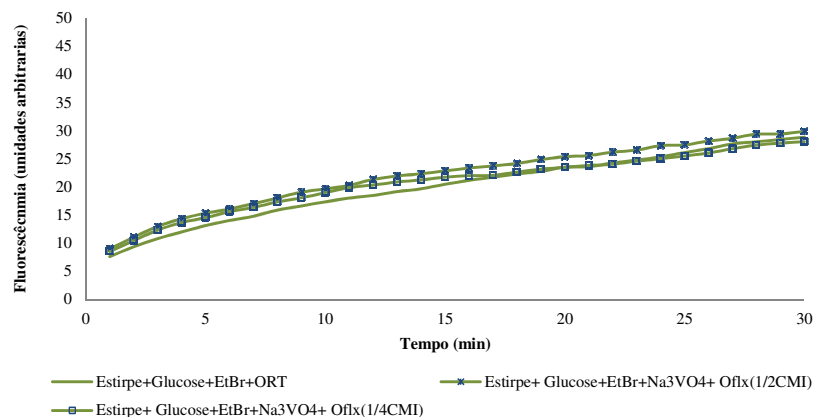


Figura 37 - Gráfico representativo da análise de competição de EtBr entre diferentes concentrações de ofloxacina na presença de Na_3VO_4 . Ensaio de acumulação para a estirpe AG100 na presença de Na_3VO_4 ($\frac{1}{4}$ CMI); concentrações sub-inibitórias de ofloxacina $\frac{1}{2}$ CMI e $\frac{1}{4}$ CMI; EtBr a 1mg/L e glucose a 0,4%.

Através da análise dos gráficos apresentados na Figura 37, para a estirpe AG100 não se observam alterações significativas na retenção de EtBr, quando se adicionam moléculas de ofloxacina.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho verificou-se qual a importância da resistência mediada por efluxo particularmente qual o papel do sistema AcrAB-TolC na susceptibilidade de *E. coli* aos antibióticos. De um modo geral podemos concluir:

- Os antibióticos estudados, tetraciclina, ofloxacina e oxacilina, são substratos do sistema de efluxo AcrAB-TolC de *E. coli*;
- O EtBr é um substrato preferencial do sistema de efluxo AcrAB-TolC de *E. coli*;
- Todos os inibidores de efluxo seleccionados promoveram a diminuição dos valores de CMI dos antibióticos e EtBr;
- As NMP são as mais eficientes na redução dos valores de CMI e o CCCP o menos eficiente. Deste modo, obtemos o seguinte gradiente de eficiência para a diminuição da CMI: NMP > Na₃VO₄ > VP > TZ > CPZ > CCCP;
- O Na₃VO₄ é o mais eficiente na inibição do efluxo e as NMP as menos eficientes obtendo-se o seguinte gradiente de eficiência para a inibição directa do efluxo: Na₃VO₄ > CPZ > CCCP > TZ > VP > NMP;
- A tetraciclina e o EtBr competem pelo mesmo local de ligação do sistema de efluxo AcrAB-TolC observado tanto na presença do CPZ como do Na₃VO₄, o que prova a importância destes dois inibidores de efluxo sobre o sistema AcrAB-TolC e que essa acumulação de EtBr não é dependente da concentração do antibiótico.

Para além disso, com este trabalho verificamos que os inibidores NMP e VP são afectados pela fonte de carbono utilizada, a glucose. Para os restantes inibidores a presença ou ausência de glucose não influencia a acumulação de EtBr no interior da célula. Este resultado permitiu-nos dividir os inibidores em dois grupos: (i) dependentes da acção da glucose – NMP e VP, e (ii) independentes da acção da glucose – CCCP, CPZ, Na₃VO₄. Estes resultados parecem evidenciar que as NMP e VP actuam por inibição das vias glicolíticas enquanto o CCCP, CPZ e o Na₃VO₄ parecem actuar por inibição directa das ATPases do gradiente protónico membranar. A TZ necessita de estudos mais aprofundados devido ao efeito exercido sobre a viabilidade celular.

Relativamente ao efeito dos inibidores no potencial de membrana concluímos que todos os inibidores provocam despolarização da membrana com quebra do potencial ao fim de 30 minutos de exposição e que é esta despolarização que leva à acumulação de EtBr no interior da célula. Infelizmente, não foi possível apresentar os resultados definitivos para o efeito do NMP sobre o potencial de membrana e viabilidade celular porque os resultados não foram validados a tempo útil para a inclusão neste manuscrito, com vista a esclarecer a razão pelo qual este composto é tão eficiente a diminuir a CMI dos antibióticos e tão pouco eficiente como inibidor do efluxo em tempo real de EtBr (trabalho em curso).

Contudo, os resultados globais já obtidos levam-nos a concluir que o modelo inicial para a actividade/mecanismo de acção do inibidor de efluxo (Figura 14) não está correcto, uma vez que se demonstrou neste trabalho que os inibidores de efluxo testados actuam no bloqueio do gradiente protónico necessário para o efluxo (ressalva para o NMP ainda em curso), e não pelo bloqueio directo do canal TolC, como anteriormente postulado. Deste modo, propomos o seguinte modelo revisto à luz dos resultados obtidos durante esta dissertação para os inibidores CPZ, TZ, CCCP, VP e Na_3VO_4

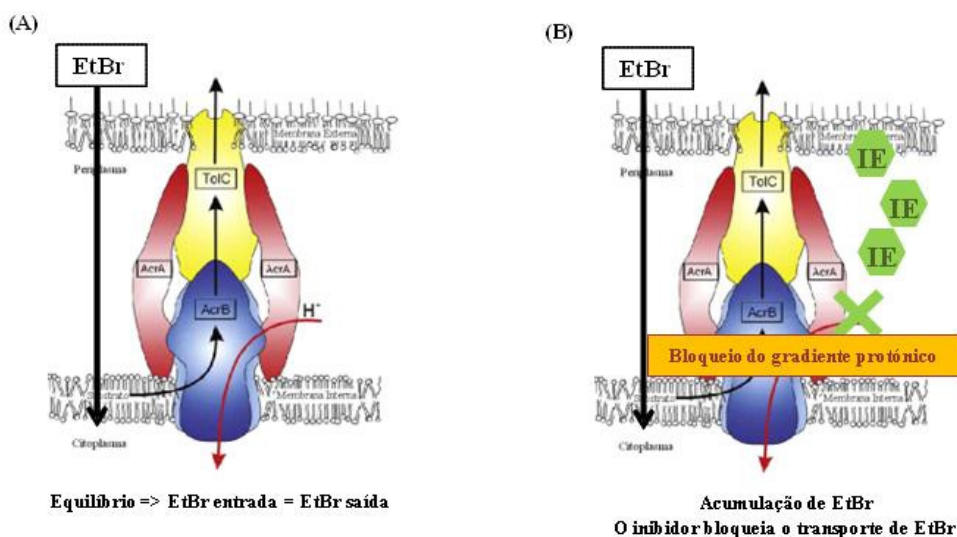


Figura 37 - Representação esquemática da entrada e saída de EtBr em *E. coli*. (A) Estado de equilíbrio: na presença da bomba AcrAB-TolC a entrada de EtBr é semelhante à saída de EtBr. (B) Presença do IE bloqueia o gradiente protónico inibindo a saída de EtBr aumentando a sua concentração intracelular: a taxa de entrada é superior à taxa de saída de EtBr.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho demonstrou qual o papel dos inibidores de efluxo sobre a actividade energética da bomba AcrAB-TolC. No entanto, e apesar da importante contribuição que os resultados trouxeram para o estudo dos mecanismos de acção dos inibidores de efluxo, contam-se ainda alguns aspectos a explorar no futuro.

Entre eles, inclui-se a determinação do potencial Zeta, para identificação da carga electroquímica presente na membrana celular na presença e ausência dos inibidores estudados.

Poder-se-á também otimizar técnicas para o estudo de competição antibiótico/EtBr, de modo a que se possa marcar o antibiótico, ou com radioactividade ou com outros fluoróforos, para melhor medir a concentração de antibiótico que fica retido na célula.

Também, o estudo de outras fontes de carbono de modo a aprofundar os possíveis mecanismos de acção de cada inibidor em estudo, particularmente, a sua dependência/independência da acção da fonte de carbono, bem como a influência desta sobre a susceptibilidade de *E. coli* aos antimicrobianos.

Por último, para melhor avaliar o desempenho do inibidor sobre a bomba de efluxo, poder-se-ia realizar estudos de cristalografia, de modo a identificar as estruturas e o local de ligação ou extrusão de cada substrato.

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARADO, F., VASSEUR, M. (1998). Direct inhibitory effect of CCCP on the ClH⁺ symporter of the guinea pig ileal brush-border membrane. *The American Journal Physiol Cell Physiol*, 274, pp.C481-C491.
- AMARAL, L., CERCA, P., SPENGLER, G., MACHADO, L., MARTINS, A., COUTO, I., VIVEIROS, M. (2011). Ethidium bromide efflux by Salmonella: Modulation by metabolic energy, pH, ions and phenothiazines. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38 (2), pp. 140-145.
- AMARAL, L., MARTINS, A., MOLNAR, J., KRISTIANSEN, J., MARTINS, M., VIVEIROS, M., RODRIGUES, L., SPENGLER, G., COUTO, I., RAMOS, J., DASTIDAR, S., FANNING, S., MCCUSKER, M., PAGES, J-M. (2010). Phenothiazines, Bacterial Efflux Pumps and Targueting the Macrophages for Enhanced Killing of Intracellular XDRTB. *In Vivo*, 24 (4), pp. 409-424
- AMARAL, L., VIVEIROS, M., MOLNAR, J. (2004). Antimicrobial Activity of Phenothiazines. *In Vivo*, 18 (6) pp. 725-731.
- BAMBEKE, F., PAGES, J.-M., LEE, V. J. (2006). Inhibitors of Bacterial Efflux Pumps as Adjuvants in Antibiotic Treatments and Diagnostic Tools for Detection of Resistance by Efflux. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 1(2), pp. 157-175.
- BAMBEKE, F.V., BALZI, E., TULKENS, P.M. (2000). Antibiotic efflux pumps. *Biochemical Pharmacology*, 60, pp. 466-470.
- BAMBEKE, F.V., GLUPCZYNSKI, Y., PLESIAI, P., PECHERE, J.C, TULKENS, P.M. (2003). Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, pp. 1055-1065.
- BENABE, J. E., ECHEGOYEN, L. A, PASTRANA, B., MARTÍNEZ-MALDONADO, M. (1987). Mechanism of Inhibition of Glycolysis by Vanadate. *The Journal of Biological Chemistry*, 262 (20), pp. 9556-9560.
- BERG, H. C. (2004). *E. coli in motion*. 1ª Edição. Nova York, E.U.A. Biological and Medical Physics Biomedical Engineering, Springer.
- BLAIR, J. M. A, PIDDOCK, L. J. V. (2009). Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Current Opinion in Microbiology*, 12 (5), pp. 512-519.

BOHNERT, J. A., KARAMIAN, B., NIKAIIDO, H. (2010). Optimized Nile Red Efflux Assay of AcrAB-TolC Multidrug Efflux System Shows Competition between Substrates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54 (9), pp. 3770-3775.

BOHNERT, J. A., KERN, W. (2005). Selected Arylpiperazines Are Capable of Reversing Multidrug Resistance in *Escherichia coli* Overexpressing RND Efflux Pumps. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (2), pp. 849-852.

BOHNERT, J. A., SCHUSTER, S., SEEGER, M. A., FÄHNRIKH, E., POS, K. M., KERN, W. V. (2008). Site-directed mutagenesis reveals putative substrate binding residues in the *Escherichia coli* RND efflux pump AcrB. *Journal of Bacteriology*, 190 (24), pp. 8225-8229.

BORGES-WALMSLEY, M. I., MCKEEGAN, K. S., WALMSLEY, A. R. (2003). Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *The Biochemical Journal*, 376 (2), pp. 313-318.

BOULOS, L., PREVOST, M., BARBEAU, B., COALLIER e J., DESJARDINS, R. (1999). LIVE/DEAD®BacLigth™ : application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water, *Journal of Microbiological Methods*, 37, 77-86.

CARLSON, R., SRIENC, F. (2004). Fundamental *Escherichia coli* Biochemical Pathways for Biomass and Energy Production: Identification of Reactions. *Biotechnology and Bioengineering*, 85 (1), pp. 1-19.

CARVALHO C. C.C.R. D. (2012). Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* cells for growth and bioremediation under extreme conditions. *Research in Microbiology*, pp. 1-12.

CARVALHO C. C.C.R. D., FONSECA M. M. R. D. (2003). A Simple Method to Observe Organic Solvent Drops with a Standard Optical Microscope. *Microscopy Research and Technique*, 60, pp. 465–466.

CAVARI, B.Z., AVI-DOR, Y., GROSSOWICZ, N. (1967). Effect of Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazone on Respiration and Respiration-Dependent Phosphorylation in *Escherichia coli*, *Biochemical Journal*, 103, pp. 601-608.

CERCA P., MARTINS A., COUTO I., VIVEIROS M., AMARAL L. (2011). Competition between Substrates of the Efflux Pump System of Salmonella Enteritidis. *In Vivo*, 25.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). (2007). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Seventeenth Informational Supplement. M100-S17. Wayne, Pa, USA.

- CONRAD R. S., WULF R. G, CLAY D. L. (1979). Effects of Carbon Sources on Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 15 (1), pp. 59-66.
- CORNAGLIA, G., RUSSELL K., SATTA G., FONTANA R. (1995). Relative Importances of Outer Membrane Permeability and Group 1 β -Lactamase as Determinants of Meropenem and Imipenem Activities against *Enterobacter cloacae*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39, pp.350-355.
- COSTA, S.C.N.S. (2010). *Caracterização Preliminar da Bionergética do Efluxo pelo Sistema AcrAB-TolC em E.coli*. Lisboa: Universidade Nova de Lisboa. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Médica.
- DAVIES D. R., HOL W. G.J. (2004). The power of vanadate in crystallographic investigations of phosphoryl transfer enzymes. *Febs Letters*, 577, pp.315–321.
- DE SOUSA J. C. F. (2000). *Microbiologia*. 1ª Edição. Lisboa: Lidel Edições Técnicas, pp. 99-109.
- DEMARCO C. E., CUSHING L. A., FREMPONG-MANSO E.L., SEO S. M., JARAVAZA T. A. A., KAATZ G. W. (2007). Efflux-Related Resistance to Norfloxacin, Dyes, and Biocides in Bloodstream Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 51(9), pp. 3235–3239.
- DIMROTH, P., KAIM, G., MATTHEY, U. (2000). Crucial role of the membrane potential for ATP synthesis by F₁ F₀ ATP Synthases. *The Journal of Experimental Biology*, 203 (1), pp. 51-59.
- DOEBLER, J. A. (2000). Effects of Protonophores on Membrane Electrical characteristics in NG108-15 cells. *Neurochemical Research*, 25 (2), pp. 263-268.
- ELKINS, C. A., MULLIS, L. B. (2007). Substrate Competition studies using whole-cell accumulation assays with the Major Tripartite Multidrug Efflux Pumps of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 (3), pp. 923-929.
- ELKINS, C. A., NIKAIDO, H. (2002). Substrate Specificity of the RND-Type Multidrug Efflux Pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* Is Determined Predominately by Two Large Periplasmic Loops. *Journal of Bacteriology*, 184 (23), pp. 6490-6498.
- FERREIRA, W.F., SOUSA, J.C. (2000). *Microbiologia*. 1º Edição. Volume 2. Lisboa. Lidel. pp. 99-109.
- FERREIRA, W.F.C., SOUSA, J.C.F., LIMA, N. (2010). *Microbiologia*, Lidel – Edições Técnicas, pp 61-76, 85, 197-221.

- FLUIT, AD. C., VISSER, M. R., SCHMITZ, F-J. (2001). Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), pp. 836-871.
- GE, Q., YAMADA, Y., ZGURSKAYA, H. (2009). The C-terminal domain of AcrA is essential for the assembly and function of the multidrug efflux pump AcrAB-TolC. *Journal of Bacteriology*, 191(13), pp. 4365-4371.
- GIEDRAITIENĖ, A., VITKAUSKIENĖ, A., NAGINIENĖ, R., PAVILONIS, A. (2011). Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria. *Medicina (Kaunas)*, 47(3), pp. 137-146.
- GRKOVIC, S., BROWN, M.H., SKURRAY, R. A. (2002). Regulation of Bacterial Drug Export Systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66 (4), pp. 671-701.
- HANCOCK, R. E.W. (1997). The Bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends in Microbiology*, 5 (1): pp. 37-42.
- HANCOCK, R. E.W. (2005). Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. *The Lancet Infectious Diseases*, 5(4), pp. 209-218.
- HOGG, R. C., TREQUATTRINI, C., CATACUZZENO, L., PETRIS, A, FRANCIOLINI, F., ADAMS, D. J. (1999). Mechanisms of Verapamil Inhibition of Action Potential Firing in rat Intracardiac Ganglion Neurons. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 289(3), pp. 1502-1508.
- IHMELS, H., OTTO, D. (2005). Intercalation of Organic Dye Molecules into Double-Stranded DNA – General Principles and Recent Developments. *Top Current Chemical*, 258, pp. 161-204.
- JANA, B., PANJA, S., SAHA, S., & BASU, T. (2009). Mechanism of protonophores-mediated induction of heat-shock response in *Escherichia coli*. *BMC microbiology*, 9 (20), pp. 1-9.
- JONES, H.E., HOLLAND, B., JACQ, A., WALL, T., CAMPBELL, A. (2003). *Escherichia coli* lacking the AcrAB multidrug efflux pump also lacks nonproteinaceous, PHB–polyphosphate Ca²⁺ channels in the membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 1612 (1), pp. 90-97.
- KAATZ G. W., MOUDGAL V. V., SEO S. M., KRISTIANSEN J. E. (2003). Phenothiazines and Thioxanthenes Inhibit Multidrug Efflux Pump Activity in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 47 (2) pp. 719–726.
- KERN, W. V., STEINKE, P., SCHUMACHER, A., SCHUSTER, S., VON BAUM, H., BOHNERT, J. A. (2006). Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative

efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of *Escherichia coli*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(2), pp. 339-343.

KHAN, S. Z., LONGLAND, C. L., MICHELANGELI, F. (2000). The effects of phenothiazines and other calmodulin antagonists on the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum Ca^{2+} pumps. *Biochemical Pharmacology*, 60(12), pp. 1797-1806.

KOWALSKI, P., JAŚKOWSKA, J., BOJARSKI, A. J., DUSZYŃSKA, B. (2008). The synthesis of cyclic and acyclic long-chain arylpiperazine derivatives of salicylamide as serotonin receptor ligands. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 45(1), pp. 209-214.

KUMAR, A., SCHWEIZER, H. P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), pp. 1486-1513.

LAMBERT, B., LE PECQ, J-B. (1984). Effect of mutation, electric membrane potential, and metabolic inhibitors on the accessibility of nucleic acids to ethidium bromide in *Escherichia coli* cells. *Biochemistry*, 23(1), pp. 166-176.

LANGTON, K. P., HENDERSON, P. J. F., HERBERT, R. B. (2005). Antibiotic resistance: multidrug efflux proteins, a common transport mechanism. *The Royal Society Chemistry*, 22(4), pp. 439-451.

LEE, E-W., HUDA, M. N., KURODA, T., MIZUSHIMA, T., TSUCHIYA, T. (2003). EfrAB, an ABC Multidrug Efflux Pump in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(12), pp. 3733-3738.

LEVY, S. B. (2002). Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. 92, pp. 65S-71S.

LI, X.-Z. e NIKAIDO, H. (2009). Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs*, 69(12), pp. 1555-1562.

LI, X.-Z., ZHANG, L.I., SRIKUMAR, R., POOLE, K. (1998). β -Lactamase Inhibitors Are Substrates for the Multidrug Efflux Pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 42(2), pp.399-403.

LIM, S. P., NIKAIDO, H. (2010). Kinetic parameters of efflux of penicillins by the multidrug efflux transporter AcrAB-TolC of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(5), pp. 1800-1806.

LOMOVSKAYA O., WATKINS W. (2001). Inhibition of Efflux Pumps as a Novel Approach to Combat Drug Resistance in Bacteria. *Molecular Microbiology Biotechnol*, 3(2), pp. 225-236.

LOPES da SILVA, T., REIS A., HEWITT C., ROSEIRO J. C. Citometria de fluxo - Funcionalidade celular on-line em Bioprocessos. Métodos em Biotecnologia - Citometria de Fluxo II, *Boletim de Biotecnologia*, pp. 32-40.

LORIAN, V.M.D. (2005). Antibiotic in laboratory medicine. 5ª edição. Philadelphia, Lippincott Williams e Wilkins. Capítulo 2, 8 pp 15-17, 365–290.

MADINGAN, M., MARTINKO, J., PARKER, J. (1997). *Brock Biology of Microorganisms*. 8ª Edição. Prentice-Hall International.

MAHAMOUD, A., CHEVALIER, J., ALIBERT-FRANCO, S., KERN, W. V., PAGÈS, J.-M. (2007). Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(6), pp. 1223-1229.

MARQUEZ, B. (2005). Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie*, 87(12), pp. 1137-1147.

MARTINS M., DASTIDAR S. G., FANNING S., KRISTIANSEN J. E., MOLNAR J., J.-M. PAGÈS, ZSUZSANNA S., SPENGLER G., VIVEIROS M., AMARAL L. (2008). Potential role of non-antibiotics (helper compounds) in the treatment of multidrug-resistant Gram negative infections: mechanisms for their direct and indirect activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31 (3), pp. 198-208.

MARTINS, A, SPENGLER, G., MARTINS, M., RODRIGUES, L., VIVEIROS, M., DAVIN-REGLI, A, CHEVALIER, J., COUTO I., PAGÈS J.M., AMARAL L. (2010). Physiological characterization of the efflux pumps system of antibiotic-susceptible and multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36 (4), pp. 313-318.

MARTINS, A., MACHADO, L., COSTA, S., CERCA, P., SPENGLER, G., VIVEIROS, M., AMARAL, L. (2011). Role of calcium in the efflux system of *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37(5), pp 410-414.

MARTINS, A., SPENGLER G., RODRIGUES, L., VIVEIROS, M., RAMOS, J., MARTINS M., COUTO, I., FANNING S., PAGÈS J.M, BOLLA J.M., MOLNAR J., AMARAL L. (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*, 4(8).

MOLLOY M. P., HERBERT B. R., SLADE M. B., RABILLOUD T., NOUWENS A. S., WILLIAMS K. L., GOOLEY A. A. (2000). Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane, *European Journal of Biochemical*. 267, pp. 2871-2881.

MOUSSATOVA, A., KANDT, C., O'MARA, M., L., TIELEMAN, D. P. (2008). ATP-binding cassette transporters in *Escherichia coli*, *Biochimic and Biophysica Acta*, 1778, pp. 1757-1771.

- MURAKAMI, S., YAMAGUCHI, A. (2003). Multidrug-exporting secondary transporters. *Current Opinion in Structural Biology*, 13(4), pp. 443-452.
- MURRAY, P.R., ROSENTHAL, K.S., PFALLER, M.A. (2005). *Bacterial metabolism and growth*. 5^a edição. In Medical Microbiology Mosbi.St.Louis, Estados Unidos da América, pp. 25-30.
- NAGANO, K., NIKAIDO, H. (2009). Kinetic behavior of the major multidrug efflux pumps AcrB of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(14), pp. 5854-5858.
- NATARO, J. P., KAPER, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 11(1), pp.142-201.
- NEBE-VON-CARON G., STEPHENS P.J., HEWITT C.J., POWELL J.R., BADLEY R.A. (2000). Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Microbiological Methods*, 42, pp. 97–114.
- NECHAY, B. R. (1984). Mechanisms of action of vanadium. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 24(10), pp. 501-524.
- NEIDHARDT, F. C., INGRAHAM, J. L., SCHAECHTER, M. (1990). Physiology of the bacterial cell – a molecular approach. *Sinauer Associates*.
- NIKAIDO, H. (1994). Porins and Specific Diffusion Channels in Bacterial Outer Membranes. *The Journal of Biological Chemistry*. 269(6), pp. 3905-3908.
- NIKAIDO, H. (1996). Multidrug Efflux Pumps of Gram-Negative Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 178(20), pp. 5853-5859.
- NIKAIDO, H. (2009). Multidrug resistance in bacteria. Update. *Annual review of Biochemistry*, 78, pp. 119-146.
- NIKAIDO, H., PAGÈS, J-M. (2011). Broad specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of gram negative bacteria “Accepted Article”. *FEMS Microbiology Reviews* pp. 1-57.
- NIKAIDO, H., ROSENBERG, E. Y., FOULDS, J. (1983). Porin channels in *Escherichia coli*: studies with beta-lactams in intact cells. *Journal of Bacteriology*, 153(1), pp. 232-240.
- NIKAIDO, H., SAIER M. H. (1992). Transport Proteins in Bacteria: Common Themes in Their Design, *Science*, 258 (5084), pp. 936-942.
- NORDMEIER, E. (1992). Absorption spectrometry and dynamic and static light-scattering studies of ethidium bromide binding to calf thymus DNA: Implications for outside binding and intercalation. *Journal of Physical Chemistry*, 96, pp. 6045-6055.

NORMARK, B. H., NORMARK, S. (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*, 252(2), pp. 91-106.

NOVO D., PERLMUTTER N. G., HUNT R. H., SHAPIRO H. M. (1999). Accurate Flow Cytometric Membrane Potential Measurement in Bacteria Using Diethyloxacarbocyanine and a Ratiometric Technique. *Cytometry*, 35, pp.55–63

NOVO D.V. J., PERLMUTTER N. G., HUNT R. H., SHAPIRO H. M. (2000). Multiparameter Flow Cytometric Analysis of Antibiotic Effects on Membrane Potential, Membrane Permeability, and Bacterial Counts of *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44 (4), pp. 827–834.

OKUSU, H., MA, D., NIKAIDO, H. (1996). AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *Journal of Bacteriology*, 178(1), pp. 306-308.

ORDWAY, D., VIVEIROS, M., LEANDRO, C., ALMEIDA, J., MARTINS, M., KRISTIANSEN, J. E., MOLNAR, AMARAL L. (2003). Clinical Concentrations of Thioridazine Kill Intracellular Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(3), pp. 917-922.

PAGÈS, J-M., AMARAL, L. (2009). Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: Challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochemical Biophys Acta*. 1794 (5), pp. 826-833.

PAGÈS, J-M., MASI, M., BARBE, J. (2005). Inhibitors of efflux in Gram-negative bacteria. *Trends Molecular Medicine*. 11 (8), pp. 382-389.

PAGÈS, M. G. P. (2000). β -Lactamase inhibitors. Drug resistance updates : *Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 3(2), pp. 109-125.

PAIXÃO, L., RODRIGUES, L., COUTO, I., MARTINS, M., FERNANDES, P., CARVALHO, CCR. C., MONTEIRO, G. A., SANSONETTY, F., AMARAL, L., VIVEIROS, M. (2009). Fluorimetric determination of ethidium bromide efflux kinetics in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Engineering* 3 (18).

PALLASCH, T. J. (2003). Antibiotic resistance. *The dental Clinics of North American*. 47, pp. 623-639.

PANNEK, S., HIGGINS, P. G., STEINKE, P., JONAS, D., AKOVA, M., BOHNERT, J. A, SEIFERT, H., KERN V. W. (2006). Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine- β -naphthylamide. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(5), pp. 970-974.

PAULSEN, I. T., BROWN, M. H., SKURRAY, R. A. (1996). Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiological Reviews*, 60(4), pp. 575-608.

- PIDDOCK, L. J. V. (2006). Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(2), pp. 382-402.
- POOLE, K. (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56 (1), pp. 20-51.
- POOLE, K. (2007). Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of Medicine*, 39, pp. 162-176.
- PUTMAN M., VEEN H.W. V., KONINGS W. N. (2000). Molecular Properties of Bacterial Multidrug Transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1092, pp. 672–693.
- RAMALHETE C., SPENGLER G., MARTINS A., MARTINS M., VIVEIROS M., MULHOVO S, FERREIRA M-J U., AMARAL L. (2011). Inhibition of efflux pumps in meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* resistant strains by triterpenoids from *Momordica balsamina*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37, pp. 70–74.
- RYAN, K.J., RAY C.G, ADMAD, N., JAMES, J.P. (2010). *Sherrie Medical Microbiology*, Fifth Edition, The McGraw-Hill Companies, pp.353.
- SHAPIRO, H.M. (2000). Membrane potential estimation by flow cytometry. *Methods*, 21, pp. 271-279.
- SONNET P., IZARD D., MULLIÉ C. 2011. Prevalence of efflux-mediated ciprofloxacin and levofloxacin resistance in recent clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and its reversal by the efflux pump inhibitors 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenylalanine-arginine- β -naphthylamide. *International Journal of Antimicrobial Agents*, pp. 3677 –3681.
- STRATTON, C. (2002). Emphasis on efflux. 42nd ICAAC- *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. San Diego, California, pp. 27-30.
- SYMMONS, M. F., BOKMA, E., KORONAKIS, E., HUGHES, C., KORONAKIS, V. (2009). The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump. *PNAS*, 106(17), pp.7173-7178.
- TENOVER, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119 (6), pp. S3-S10.
- THORARENSEN, A, PRESLEY-BODNAR, A L., MAROTTI, K. R., BOYLE, T. P., HECKAMAN, C. L., BOHANON, M. J., TOMICH, P. K., ET AL. (2001). 3-Arylpiperidines as potentiators of existing antibacterial agents. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 11(14), 1903-1906.

- TU, S.-I., WIJEY, C., PAOLI, G., IRWIN, P., & GEHRING, A. (2004). Detection of Viable Bacteria Cells by Bioluminescence: a Bioenergetics Approach. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 12(3), pp. 207-219.
- VIVEIROS, M., JESUS, A., BRITO, M., LEANDRO, C., MARTINS, M., ORDWAY, D., MOLNAR, A. M., MOLNAR J., AMARAL L. (2005). Inducement and Reversal of Tetracycline Resistance in *Escherichia coli* K-12 and Expression of Proton Gradient-Dependent Multidrug Efflux Pump Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (8), pp. 3578-3582.
- VIVEIROS, M., MARTINS, A., PAIXÃO, L., RODRIGUES, L., MARTINS, M., COUTO, I., FÄHNRIK, E., KERN W.V., AMARAL L. (2008). Demonstration of intrinsic efflux activity of *Escherichia coli* K-12 AG100 by an automated ethidium bromide method. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31(5), pp. 458-462.
- WALKER, T.S. (1998), *Microbiology*. 1ª Edição. Saunders Text and Review Series, W.B. Saunders Company pp. 36-47e 52-161.
- WEBBER, M. A., 2002. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(1), pp. 9-11.
- WILLEY, J.M., SHERWOOD, L.M., WOOLVERTON, C.J. (2011). *Prescott's Microbiology*, 8ª Edição, McGraw-Hill International Edition, pp. 209-249.
- YERUSHALMI, H., LEBENDIKER, M., SCHULDINER, S. (1995). Emr, an *Escherichia coli* 12-KDa multidrug transporter, exchanges toxic cations and H⁺ and is soluble in organic solvents. *Journal of Biological Chemistry*, 270, pp. 6856-6863.
- YU, E. W., AIRES, J. R., & NIKAIDO, H. (2003). MINIREVIEW AcrB Multidrug Efflux Pump of *Escherichia coli*: Composite Substrate-Binding Cavity of Exceptional Flexibility Generates Its Extremely Wide Substrate Specificity. *Journal of Bacteriology*, 185 (19), pp. 5657-5664.