



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

**Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**Estudo de competição entre substratos de bombas de efluxo
em isolados clínicos de *Escherichia coli* por fluorimetria em
tempo real usando Vermelho do Nilo**

Inês Lopes Pinheiro de Oliveira Maia

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS ESPECIALIDADE EM BIOLOGIA MOLECULAR EM MEDICINA
TROPICAL E INTERNACIONAL**

JUNHO, 2022



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Estudo de competição entre substratos de bombas de efluxo
em isolados clínicos de *Escherichia coli* por fluorimetria em
tempo real usando Vermelho do Nilo**

Autor: Inês Lopes Pinheiro de Oliveira Maia

Orientador: Doutora Diana Machado

Coorientador: Professor Doutor Miguel Viveiros

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

Os resultados apresentados foram objeto de apresentação em coautoria das seguintes comunicações em reuniões científicas:

Inês Maia, Diana Machado, Miguel Viveiros. 2019. “Evaluation of competition between substrates of the efflux pump system AcrAB-TolC of *Escherichia coli* using red Nile”. Congresso Nacional de Microbiologia e Biotecnologia (MicroBiotec). Coimbra, Portugal. 5-7 dezembro 2019. Comunicação em painel.

Inês Maia, Diana Machado, Miguel Viveiros. 2020. “Optimization of a red Nile-based real-time fluorometric assay for the study of competition between efflux pump substrates”. III International Conference NOVAhealth Chronic Disease and Infection “Infection, Cancer and Global Health”. (Online) 9 outubro 2020. Comunicação em painel.

Inês Maia, Diana Machado, Miguel Viveiros. 2021. “Optimized red Nile semi-automated fluorometric method shows competition between substrates of the AcrAB-TolC efflux pump of *Escherichia coli*”. Congresso Nacional de Microbiologia e Biotecnologia (MicroBiotec). Lisboa, Portugal. 23-26 novembro 2021. Comunicação em painel.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à Doutora Diana Machado, orientadora deste trabalho, pela oportunidade e pela confiança que depositou em mim, pela orientação e por todo o apoio dado.

Ao Professor Doutor Miguel Viveiros, pela coorientação deste trabalho, pelo apoio e confiança.

À Unidade de Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa pelas condições disponibilizadas e a todos os professores e colegas por todo o apoio e ensinamentos que me deram ao longo dos últimos dois anos.

À Bruna Pereira por todos os momentos, tanto de descontração como de trabalho, pela companhia, pela motivação quando faltava nos momentos mais frustrantes e desafiantes, mas acima de tudo pela amizade.

À Nádía Mourão e ao João Soares por todo o apoio, momentos de diversão e pela amizade.

Aos meus pais, irmãos e cunhadas pela força que me dão quando o tapete foge debaixo dos meus pés, por me guiarem um passo de cada vez e sem os quais nada disto seria possível.

E, por fim, um agradecimento ao Hugo também por todo o apoio, por nunca me deixar desistir, por me manter os pés no chão e me orientar quando começo a ser demasiado pessimista e por toda a motivação para seguir os meus sonhos.

Um enorme obrigada!

Resumo

As bombas de efluxo do tipo AcrAB-TolC são as que mais contribuem para a resistência aos antimicrobianos em *Escherichia coli* dada a grande variedade de substratos que conseguem efluxar. Existem vários métodos fluorométricos que permitem avaliar a atividade de bombas de efluxo, no entanto, nenhum consegue avaliar a possível existência de competição entre substratos.

Assim, neste trabalho pretendemos otimizar um método de avaliação da competição entre substratos de bombas de efluxo do tipo AcrAB-TolC de *E. coli*. Para tal, usámos o corante lipofílico vermelho do Nilo como fluoróforo/competidor, o condutor energético carbonil cyanide-*m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) para desenergizar as células bacterianas e a glucose como fornecedor de energia. Foram testados como possíveis competidores vários compostos conhecidos por serem substratos desta bomba de efluxo, assim como conhecidos inibidores das mesmas como a clorpromazina (CPZ) e phe-arg- β -naphthylamide (PA β N). A avaliação de competição de substratos foi realizada em nove estirpes de *E. coli*: três estirpes isogénicas que diferem entre si no sistema de efluxo AcrAB-TolC (AG100, que tem este sistema intacto e funcional; AG100A, com este sistema inativado; e AG100_{TET} com este sistema sobreexpresso); a estirpe de referência ATCC25922; e cinco estirpes clínicas com diferentes genótipos e fenótipos, provenientes de pacientes com infeção no trato urinário e recolhidas em três hospitais da região de Lisboa. Todos os compostos foram testados em quatro concentrações diferentes baseadas na sua concentração mínima inibitória (CMI) para cada estirpe, e esta foi determinada pelo método de microdiluição seriada em placas de 96 poços usando o meio Mueller-Hinton.

Quando um composto é capaz de interferir na acumulação de vermelho do Nilo, apresenta um nível de competição para a bomba de fluxo, assim, podemos por como hipóteses: (i) se a acumulação de vermelho do Nilo produzida for a mesma que a do substrato, então, provavelmente, estão a ser efluxados por diferentes bombas de efluxo; (ii) se os níveis de acumulação de vermelho do Nilo forem aumentados na presença de determinado substrato, provavelmente estão a competir pelo mesmo local de ligação na bomba; (iii) se os níveis de efluxo de vermelho do Nilo aumentarem, o substrato estará ligado noutra local na bomba, havendo a preferência para efluxar vermelho do Nilo.

Com este trabalho podemos concluir que o CCCP promove a acumulação de vermelho do Nilo e dos restantes compostos por inibição da força motriz protónica; a glucose reenergiza as células promovendo assim a ativação das bombas de efluxo; todos os compostos tiveram algum efeito (aumento ou diminuição do efluxo de vermelho do Nilo) dependendo da sua concentração e da estirpe em teste; vermelho do Nilo pode ser usado como fluoróforo na avaliação de competição de substratos de bombas de efluxo em *E. coli*; e o método utilizado consegue avaliar a competição entre substratos de bombas de efluxo. Este trabalho tem implicações no estudo e caracterização de bombas de efluxo, em geral, bem como na descoberta de novos antimicrobianos.

Palavras-chave: AcrAB-TolC; Bombas de efluxo; Competição de substratos; *Escherichia coli*; Resistência aos antimicrobianos; vermelho do Nilo

Abstract

The AcrAB-TolC efflux pump complex acts as the major contributor to the multidrug resistance in *Escherichia coli* given the variety of substrates that can export. There are several fluorometric methods that allow the study of its activity, however, none can assess the possible existence of competition between substrates.

Therefore, in this work we intend to optimize a competition assay for the evaluation of competition between *E. coli* AcrAB-TolC efflux pump substrates. For this, we used the lipophilic Nile red dye as a fluorophore/competitor, the energy conductor cyanide-m-chlorophenylhydrazone (CCCP) to deenergize the bacterial cells and glucose as the energy source. Several compounds known to be substrates of this efflux pump were tested as possible competitors, as well as known inhibitors such as chlorpromazine (CPZ) and phe-arg- β -naphthylamide (PABN). The evaluation of substrate competition was performed in nine *E. coli* strains: three isogenic strains that differ from each other in the AcrAB-TolC efflux system (AG100, which has this system intact and functional; AG100A, with this system inactivated; and AG100_{TET}, with this system over-expressed); the reference strain ATCC 25922 and five clinical strains with different genotypes and phenotypes, originating from patients with urinary tract infections and collected in three hospitals in the Lisbon area. All compounds were tested at four different concentrations based on their minimum inhibitory concentration (MIC) for each strain, and this was determined by serial microdilution method in 96-well plates using Mueller-Hinton medium.

When a compound is capable of interfering with the accumulation of Nile red, it presents a level of competition for the efflux pump, thus, we can assume as hypotheses: (i) if the Nile red accumulation produced is the same as that of the substrate, then probably are being effluxed by different efflux pumps; (ii) if Nile red accumulation levels are increased in the presence of a certain substrate, they are likely competing for the same binding site in the pump; (iii) if Nile red efflux levels increase, the substrate will be bound elsewhere in the pump, with a preference for Nile red efflux.

With this work we can conclude that CCCP promotes the accumulation of Nile red and the other compounds by inhibition of the proton motive force; glucose reenergizes cells thus promoting activation of efflux pumps; all compounds had some effect (increase or decrease in Nile red efflux) depending on their concentration and the tested strain; Nile red can be used as a fluorophore in the evaluation of substrate competition from efflux pumps in *E. coli*; and the method used is able to evaluate the competition between substrates of efflux pumps. This work has implications for the study and characterization of efflux pumps, in general, as well as for the discovery of new antimicrobials.

Keywords: AcrAB-TolC; Antimicrobial resistance; Efflux pumps; *Escherichia coli*; Nile red; Substrate competition

Índice Geral

Comunicações em reuniões científicas	i
Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Índice Geral	v
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas	ix
Lista de Unidades	xiii
1. Introdução	1
1.1 Antimicrobianos e seus mecanismos de ação	1
1.2 Mecanismos de resistência aos antibióticos	3
1.2.1 Resistência mediada por efluxo	5
1.2.1.1 AcrAB-TolC	8
1.2.1.2 Detecção e avaliação da atividade de efluxo em bactérias	10
1.3 Enterobacteriaceae e <i>Escherichia coli</i>	12
1.4 Objetivos	14
2. Material e Métodos	15
2.1 Material	15
2.1.1 Material Biológico	15
2.1.1.1 Estirpes de controlo e referência	15
2.1.1.2 Estirpes clínicas	15
2.1.2 Meios de cultura e soluções	16
2.2 Métodos	18
2.2.1 Crescimento e manutenção das estirpes em estudo	18
2.2.2 Determinação da CMI.....	19
2.2.3 Ensaios de Fluorimetria em Tempo Real	20
3. Resultados e Discussão	22
3.1 Determinação da CMI.....	24

3.2 Ensaio de Fluorimetria em Tempo Real	26
4. Considerações Finais	38
5. Referências Bibliográficas	40

Índice de Figuras

Figura 1	Esquema representativo dos diferentes alvos celulares dos antibióticos	3
Figura 2	Esquema representativo das diferentes famílias de sistemas de efluxo presentes nas membranas das células bacterianas	7
Figura 3	(a) representação esquemática do processo de acesso, ligação e extrusão de substratos pelo sistema de efluxo AcrAB-TolC; (b) esquema representativo do sistema de efluxo AcrAB-TolC presente numa célula bacteriana	9
Figura 4	Representação esquemática do método de microdiluição seriada em placa para determinação da CMI.....	20
Figura 5	Gráfico representativo do efluxo de vermelho do Nilo em <i>E. coli</i> ATCC25922	28
Figura 6	Gráfico representativo do efluxo de vermelho do Nilo em <i>E. coli</i> AG100 K-12, AG100A e AG100 _{TET}	28
Figura 7	Gráfico representativo do efluxo de vermelho do Nilo em EC 02-31, EC 08-14, EC 08-15, EC 18-5234 e EC 18-528084	29
Figura 8	Gráfico representativo do efluxo de vermelho do Nilo no isolado clínico EC 08-15 na presença de acriflavina	30
Figura 9	Gráfico representativo do efluxo de vermelho do Nilo no isolado clínico EC 02-31 na presença de tetraciclina	30
Figura 10	Gráfico representativo do efluxo de vermelho do Nilo no isolado clínico EC 08-14 na presença de doxiciclina	31

Índice de Tabelas

Tabela 1	Resumo das características principais e exemplos das diferentes famílias de sistemas de efluxo	6
Tabela 2	Composição e preparação dos meios de cultura utilizados	16
Tabela 3	Composição e preparação dos inibidores de efluxo utilizados	16
Tabela 4	Composição e preparação dos antibióticos utilizados	17
Tabela 5	Composição e preparação dos corantes e detergentes utilizados	17
Tabela 6	Composição e preparação das soluções e tampões utilizados	18
Tabela 7	Perfil de suscetibilidade aos antibióticos das estirpes de <i>E. coli</i> em estudo determinado pelo método de Kirby-Bauer (adaptado de Roseiro, 2020)	23
Tabela 8	Resultados da CMI das estirpes de controlo e referência	25
Tabela 9	Resultados da CMI das estirpes clínicas	26
Tabela 10	Resumo dos resultados obtidos nos ensaios de fluorimetria em tempo real das estirpes de referência e controlo	33
Tabela 11	Resumo dos resultados obtidos nos ensaios de fluorimetria em tempo real das estirpes clínicas	34

Lista de Abreviaturas

ABC	do inglês “ATP-binding cassette”
AbgT	do inglês “p-aminobenzoyl-glutamate transporter”
ACR	Acriflavina
AMC	Amoxicilina-ácido Clavulânico
AMP	Ampicilina
AMR	do inglês “antimicrobial resistance”
ATCC	do inglês “American Type Culture Collection”
ATM	Aztreonam
ATP	Adenosina trifosfato, do inglês “adenosine triphosphate”
C	Cloranfenicol
Ca²⁺	Ião cálcio
CAZ	Ceftazidima
CCCP	do inglês “carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone”
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	do inglês “Clinical Laboratory Standards Institute”
CMI	Concentração mínima inibitória
CPZ	Clorpromazina
CRO	Ceftriaxona
CTX	Cefotaxima
CXM	Cefuroxima
DA	Ácido deoxicólico
DAEC	<i>E. coli</i> difusamente aderente, do inglês “diffusely adherent <i>E. coli</i> ”
DHF	do inglês “dehydrofolate”
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade ótica
DOR	Doripenem
DOX	Doxorrubicina
DOXY	Doxiciclina

EAEC ou EA_{gg}EC	<i>E. coli</i> enteroadesiva ou enteroagregativa, do inglês “enteroaggregative <i>E. coli</i> ”
EC	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica, do inglês “enterohemorrhagic <i>E. coli</i> ”
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva, do inglês “enteroinvasive <i>E. coli</i> ”
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogénica, do inglês “enteropathogenic <i>E. coli</i> ”
ERY	Eritromicina
EtBr	Brometo de etídio, do inglês “ethidium bromide”
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica, do inglês “enterotoxic <i>E. coli</i> ”
FEP	Cefepima
FMP	Força motriz protónica
FOX	Cefoxitina
GEN	Gentamicina
Glu	Glucose
H⁺	Ião hidrogénio
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês “High performance liquid chromatography”
IE	Inibidor de efluxo
IM	do inglês “inner membrane”
IPM	Imipenem
K₂HPO₄	Hidrogenofosfato dipotássico
KAN	Canamicina
LA	do inglês “Luria Bertani agar”
LB	do inglês “Luria Bertani broth”
LEV	Levofloxacina
MALDI-TOF MS	Ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de massa por tempo de voo, do inglês “matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry”
MATE	do inglês “multidrug and toxic compound”
MDR	do inglês “multidrug resistance”

MEM	Meropenem
MFS	do inglês “major facilitator superfamily”
Mg²⁺	Ião magnésio
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MHB	do inglês “Mueller-Hinton broth”
MIN	Minociclina
mRNA	RNA mensageiro
NA	Ácido nalidíxico
Na⁺	Ião sódio
NOR	Nrfloxacin
NTEC	<i>E. coli</i> necrotóxica, do inglês “necrotoxic <i>E. coli</i> ”
OFX	Ofloxacina
OM	do inglês “outer membrane”
OMS	Organização Mundial de Saúde
OXA	Oxacilina
PA	Promove acumulação
PABA	do inglês “p-aminobenzoic acid”
PACE	do inglês “proteobacterial antimicrobial compound efflux”
PAβN	do inglês “phe-arg-β-naphthylamide”
PBP	do inglês “penicillin binding proteins”
PE	Promove o efluxo
PEN	Penicilina
PG	Peptidoglicano, do inglês “peptidoglycan”
PPB	Tampão fosfato de potássio, do inglês “potassium phosphate buffer”
PRL	Piperacilina
RND	do inglês “resistance nodulation-cell division”
rpm	Rotações por minuto
S	Substratos
SAF	Safranina
SE	Sem efeito
SePEC	<i>E. coli</i> associada à sepsis, do inglês “sepsis-associated <i>E. coli</i> ”

TEM	Temocilina
TET	Tetraciclina
THF	do inglês “tetrahidrofolate”
TMD	Domínio transmembranar, do inglês “transmembrane domain”
TP	Transportador primário
TPP	Brometo de tetrafenilfosfônio, do inglês “tetraphenylphosphonium bromide”
tRNA	RNA transferência
TS	Transportador secundário
TZP	Piperacilina-tazobactam
UPEC	<i>E. coli</i> uropatogénica, do inglês “uropathogenic <i>E. coli</i> ”
VTEC	<i>E. coli</i> verotoxigénica, do inglês “verotoxigenic <i>E. coli</i> ”

Lista de Unidades

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
g	Grama
h	Hora
M	Molar
mg	Miligramma
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
s	Segundos

1. Introdução

1.1 Antimicrobianos e seus mecanismos de ação

Antimicrobianos são químicos, de origem natural ou sintética, com capacidade de matar, ou inibir o crescimento de microorganismos sejam eles bactérias, fungos, vírus ou parasitas (WHO, 2021; Purssell, 2019).

Os antibióticos são os principais compostos usados no tratamento de infecções bacterianas, sendo que as fontes naturais da descoberta de antibióticos são essencialmente fungos e bactérias. Por outro lado, também podem ter origem sintética ou semi-sintética, o que significa que apesar de terem uma base natural, foram posteriormente alterados (Purssell, 2019; Hutchings *et al.*, 2019).

Para serem ativos, os antibióticos têm de penetrar nas células dos agentes infecciosos e atuar nos processos dinâmicos do metabolismo de todas as células, quer do microorganismo, quer do hospedeiro. Assim, esta terapia tem de ser feita sem causar qualquer dano ao hospedeiro, ao que se dá o nome de toxicidade seletiva, sendo o alvo da terapia as estruturas ou processos metabólicos diferentes ou ausentes no hospedeiro (Purssell, 2019). Existem diferentes classes de antibióticos, representadas no esquema da Figura 1, que são diferentes no seu mecanismo de ação e alvos celulares:

- i. A classe dos β -lactâmicos engloba 4 grupos de antibióticos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e monobactams. Todos eles têm em comum um anel β -lactâmico sendo que o resto da estrutura da molécula e o seu espectro de ação é que difere entre grupos. Têm como alvo as “Penicillin Binding Proteins” (PBPs), interferindo na síntese do peptidoglicano e provocando assim uma instabilidade osmótica levando à morte celular (Zhanel *et al.*, 2007; Papp-Wallace *et al.*, 2011; Freischem *et al.*, 2021);
- ii. Os glicopéptidos, tal como os anteriores, atuam ao nível da síntese da parede celular. No entanto, estes ligam-se aos precursores da parede celular, interferindo com a capacidade das PBPs incorporarem precursores na parede em crescimento, o que leva à interrupção da sua síntese. Um exemplo de antibióticos deste grupo é a Vancomicina, mas esta é ineficaz contra bactérias

Gram-negativas pois não consegue penetrar a sua membrana exterior para atingir os precursores de parede celular (Binda *et al.*, 2014);

- iii. As quinolonas e as rifampicinas são duas classes que atuam inibindo a síntese de ácidos nucleicos. As primeiras ligam-se e inibem as topoisomerases do DNA. Existem vários grupos, um dos quais são as fluorquinolonas que têm na sua constituição um átomo de fluor ligado ao ácido nalidíxico que, dependendo da sua posição, dá origem a diferentes antibióticos deste grupo (Minarini e Darini, 2012). Já as rifampicinas atuam ao nível da RNA polimerase impedindo o início do processo de transcrição do DNA (Kobylka *et al.*, 2019);
- iv. Outro alvo de antibióticos é a inibição da síntese proteica, o qual é dividido em 2 grandes grupos: os que atuam ao nível da subunidade 30S e os que atuam ao nível da subunidade 50S do ribossoma. Dos primeiros fazem parte os aminoglicosídeos, que se ligam a proteínas específicas da subunidade 30S provocando leituras incorretas do mRNA, e as tetraciclínas, que pela ligação à subunidade 30S do ribossoma bloqueiam a ligação do complexo tRNA-aminoácido ao mesmo (Markley e Wencewicz, 2018). Dos que inibem a síntese proteica ao nível da subunidade 50S fazem parte os macrólidos, lincosamidas e estreptograminas que são grupos quimicamente diferentes, mas que impedem a translocação do ribossoma; o cloranfenicol, que atua impedindo a ação da transpeptidase; e as oxazolidinonas, que inibem o passo de iniciação da síntese proteica impedindo a formação do complexo ribossomal (Kobylka *et al.*, 2019);
- v. Outro grupo é os que atuam ao nível da membrana: as polimixinas conseguem interagir com os fosfolípidos na membrana perturbando a integridade celular e levando à lise da célula e são muito ativas contra bactérias Gram-negativas. Os lipopéptidos têm uma estrutura semelhante à anterior, mas são direcionados sobretudo para bactérias Gram-positivas (Kobylka *et al.*, 2019);
- vi. Por fim, existem também antibióticos que atuam no metabolismo do ácido fólico do qual fazem parte as sulfonamidas, que atuam em diferentes passos da síntese de ácidos fólicos, e o trimetoprim, que atua na mesma via, mas por inibição da enzima dehidrofolato redutase (Kobylka *et al.*, 2019).

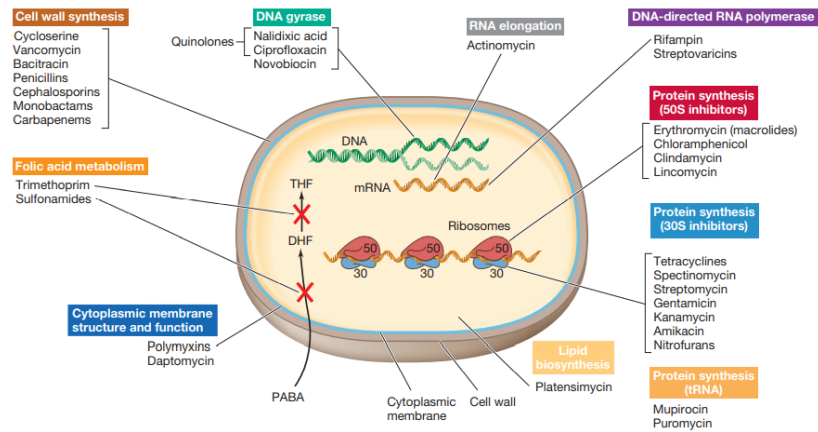


Figura 1 Esquema representativo dos diferentes alvos celulares dos antibióticos (retirado de Madigan *et al.*, 2012). Legenda: PABA, do inglês “p-aminobenzoic acid”; DHF, do inglês “dehydrofolate”; THF, do inglês “tetrahydrofolate”; mRNA, RNA mensageiro.

Os antibióticos podem ter relações antagônicas ou sinérgicas com outros agentes quimioterapêuticos. Recentemente, a investigação de novas terapêuticas contra infecções bacterianas tem envolvido também a exploração destas relações antagônicas/sinérgicas de outros agentes com os antibióticos (Coelho *et al.*, 2015; Deussenbery *et al.*, 2021).

1.2 Mecanismos de resistência aos antibióticos

As bactérias têm a potencialidade de desenvolver resistência a todo e qualquer antibiótico, antigo ou novo, por consequência da pressão seletiva exercida pelos próprios antibióticos e que podem ser codificadas em plasmídeos transferíveis entre si. (Murray *et al.*, 2016; Machado *et al.*, 2017; Paitan, 2018). Por outro lado, também o uso alargado e, por vezes, indiscriminado de antibióticos tanto em medicina humana como em medicina veterinária ou na agricultura, tem conduzido ao aparecimento de fenômenos de multirresistência (MDR), ou seja, a resistência a três ou mais classes de antibióticos diferentes entre si (Bélanger *et al.*, 2011; Lowy, 2003; Paitan, 2018). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), atualmente, a resistência a antimicrobianos (AMR) é uma das top 10 ameaças à saúde pública (WHO, 2021).

Esta resistência pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca, ou

inata, ocorre quando um microorganismo é naturalmente resistente e surge como consequência de processos adaptativos ao longo do tempo sem que seja necessária a aquisição de informação genética externa. Por outro lado, a resistência adquirida, implica alterações no genoma celular que conseqüentemente alteram o seu fenótipo, por exemplo, quando uma bactéria consegue crescer em concentrações de um antibiótico às quais era originalmente sensível (Viveiros *et al.*, 2005; Zechini e Versace, 2008).

Como anteriormente explicado, os antibióticos interagem de diferentes formas com o microrganismo, assim, de igual forma, pode haver diferentes mecanismos associados a estas resistências, e também associados entre si, e estes podem ser classificados de várias formas tendo em conta o(s) mecanismo(s) bioquímicos (Zhang *et al.*, 2018):

- i. Pode ocorrer modificação do antibiótico por degradação do mesmo ou por alterações químicas/enzimáticas – o exemplo de degradação do antibiótico mais comum é a produção de β -lactamases que provoca a hidrólise do anel β -lactâmico presente nas penicilinas. A alteração enzimática pode ocorrer, por exemplo, no antibiótico cloranfenicol por ação da enzima cloranfenicol acetiltransferase (Kumar, 2012);
- ii. Prevenção da interação antibiótico-alvo pela permeabilidade reduzida ou o efluxo do antibiótico – as porinas presentes na membrana externa podem estar alteradas e conseqüentemente não deixar entrar certas moléculas na célula. Também os sistemas de efluxo podem contribuir para fenótipos de resistência, expulsando os antibióticos que já entraram na célula (Viveiros *et al.*, 2007; Kumar, 2012);
- iii. Modificação do alvo, por proteção ou alteração do mesmo - podem ocorrer, por exemplo, alterações nas PBPs, alvo dos β -lactâmicos, prevenindo a ligação do antibiótico, ou alterações no RNA ribossomal, alvo dos macrólidos, que previnem que os antibióticos interfiram na sua função (Kumar, 2012).

Tendo em conta que o foco do trabalho desta dissertação é o sistema de efluxo AcrAB-TolC, passarei a abordar apenas este mecanismo de resistência bacteriano.

1.2.1 Resistência mediada por efluxo

As bombas de efluxo são sistemas proteicos presentes nas membranas celulares bacterianas com diferentes funções para a homeostasia celular como a manutenção do pH citoplasmático e a destoxificação celular por extrusão para o espaço extracelular de compostos que lhes são tóxicos (Martins *et al.*, 2013; Blair e Piddock, 2016). Estes compostos podem ser metabolitos secundários produzidos pela própria célula ou compostos antimicrobianos como antibióticos e biocidas, e, quando sobreexpressos, podem contribuir de forma significativa para a resistência a várias classes de antimicrobianos, outros agentes terapêuticos não antibióticos, antissépticos, biocidas e desinfetantes, podendo ser o mecanismo mais eficaz de resposta a pressões seletivas (Zechini e Versace, 2008; Costa *et al.*, 2013; Laudy *et al.*, 2015; Du *et al.*, 2018; Maillard, 2018; Teelucksingh *et al.*, 2020). Por outro lado, também há estudos que apontam um papel das bombas de efluxo na formação de biofilmes, na comunicação célula-célula (*quorum sensing*), patogenicidade e virulência (Martins *et al.*, 2011; Blair e Piddock, 2016; Hernando-Amado *et al.*, 2016; Alav *et al.*, 2020; Teelucksingh *et al.*, 2020).

Estes sistemas encontram-se divididos em 5 famílias principais e bem estudadas: “ATP-Binding cassette” (ABC), “Major Facilitator Superfamily” (MFS), “Resistance-Nodulation-Cell division” (RND), “Small Multidrug Resistance” (SMR) e “Multidrug and Toxic Compound Extrusion” (MATE). Estas encontram-se descritas na Tabela 1 e representadas na Figura 2, e podem ser classificadas segundo:

- i. a sua fonte de energia - como transportadores primários (TP), quando utilizam diretamente a hidrólise de ATP, ou secundários (TS), quando utilizam o gradiente de H⁺ (força motriz protónica (FMP)) ou de Na⁺;
- ii. a sua estrutura;
- iii. e especificidade de substratos, sendo que umas podem reconhecer uma grande variedade de substratos, podendo estar associadas a fenótipos MDR, enquanto outras apenas efluxam substratos específicos (Sun *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2018).

Nos últimos anos foram descobertas mais duas famílias de sistemas de efluxo,

também representadas na Figura 2: “Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux” (PACE) e a “p-aminobenzoyl-glutamate transporter” (AbgT), sendo que ambas parecem ser formadas por um único componente localizado na membrana interna da parede celular e utilizar a força motriz protônica como fonte de energia (Delmar e Yu, 2016; Teelucksingh *et al.*, 2020; Kornelsen e Kumar, 2021).

Tabela 1 Resumo das características principais e exemplos das diferentes famílias de sistemas de efluxo.

Família*	Fonte energética	Características	Especificidade de substratos (geral)	Exemplos	Referências
ABC	TP	Principal mecanismo de efluxo em eucariotas; pode ser um sistema tripartido	Não específico	EfrCD, LmrCD, BmrCD, MacAB, TmrAB	Bremner, 2007; Nishino <i>et al.</i> , 2009; Bhardwaj e Mohanty, 2012; Hernando- Amado <i>et al.</i> , 2016; Kobylka <i>et al.</i> , 2019; Pasqua <i>et al.</i> , 2019; Teelucksingh <i>et al.</i> , 2020
MFS	TS	Formados por uma única proteína de membrana; estão divididos em dois grupos: os que têm 12 TMDs e os que têm 14 TMDs	Não específico	EmrAB, FarAB, SetB, EmrKY, Fsr, MdfA, MdtG, MdtH, Bcr	
RND		Sistema tripartido; abundante em Gram-negativas; a saída de compostos é feita por um canal transmembranar	Não específico	AcrAB, MexAB, MdtABC, AcrD, AcrEF, MdtEF	
SMR		Sistema pequeno com 4 TMDs	Não específico	Smr, EmrE, SugE, MdtIJ	
MATE		Dividida em três subfamílias dependendo da sua estrutura: DinF, NorM e subfamílias eucariotas; também obtêm energia a partir do gradiente de Na ⁺	Não específico	YdhE, MdtK	

Legenda: ABC, “ATP-Binding cassette”; MFS, “Major Facilitator Superfamily”; RND, “Resistance-

Nodulation-Cell division”; SMR, “Small Multidrug Resistance”; MATE, “Multidrug and Toxic Compound Extrusion”; TP, transportadores primários; TS, transportadores secundários; TMD, domínios transmembranares.

*não estão mencionadas as famílias PACE e AbgT dada a pouca informação atualmente disponível

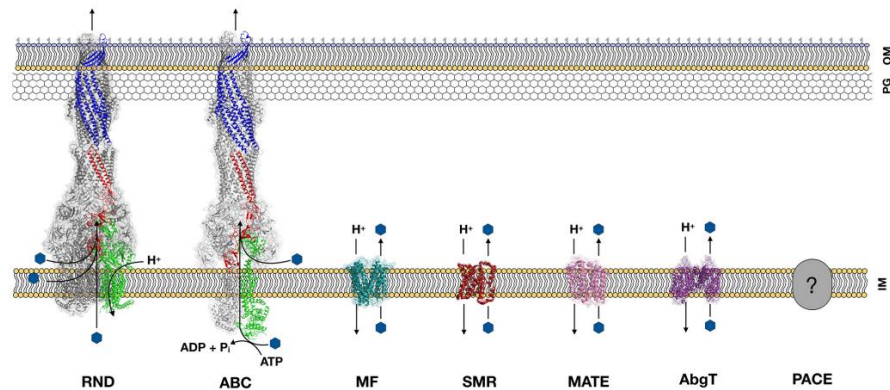


Figura 2 Esquema representativo das diferentes famílias de sistemas de efluxo presentes nas membranas das células bacterianas (adaptado de Teelucksingh *et al.*, 2020). Representadas no esquema estão as famílias: “Small Multidrug Resistance” (SMR), “Major Facilitator Superfamily” (MF ou MFS), “Multidrug and Toxic Compound Extrusion” (MATE), “ATP-Binding cassette” (ABC), “Resistance-Nodulation-Cell division” (RND), “p-aminobenzoyl-glutamate transporter” (AbgT) e “Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux” (PACE). Esta última encontra-se representada na figura como uma estrutura indefinida, pois até à data do artigo, não tinham sido encontradas estruturas de proteínas desta família. Legenda: IM, do inglês “inner membrane”; PG, do inglês “peptidoglycan”; OM, do inglês “outer membrane”.

Existem compostos, denominados de inibidores de efluxo, cujo potencial terapêutico é a inibição da atividade das bombas de efluxo por vários mecanismos: (i) inibição da fonte de energia da bomba; (ii) alteração da regulação da expressão da própria bomba; (iii) bloqueio do canal transmembranar (p.e. TolC); (iv) inibição competitiva ou não competitiva por outras moléculas não-antibióticas na afinidade de determinados locais na bomba; (v) alteração da estrutura química do próprio antibiótico de modo a reduzir a sua afinidade com a bomba; (vi) ou inibição da funcionalidade dos vários componentes dos sistemas de efluxo (Pagès e Amaral, 2009).

Exemplos destes compostos, que foram também utilizados no presente trabalho, são o “carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone” (CCCP), um

desacoplador energético que interfere com os níveis de energia membranares, levando à inibição da força motriz protônica; “phe-arg- β -naphthylamide” (PA β N), composto péptido-mimético, muito utilizado em ensaios de avaliação da atividade de efluxo, sendo considerado um inibidor de efluxo de largo espectro; e a clorpromazina (CPZ), que potencia a atividade de diversos antibióticos e promove a acumulação de substratos de AcrB (Grimsey *et al.*, 2020, Amaral *et al.*, 2007). No entanto, por consequência da sua citotoxicidade, este tipo de compostos não foi ainda aprovado clinicamente para o combate de infecções provocadas por isolados MDR (Hernando-Amado *et al.*, 2016; Machado *et al.*, 2017).

1.2.1.1 AcrAB-TolC

O sistema de efluxo AcrAB-TolC, representado na parte (b) do esquema da Figura 3, é o maior contribuidor para o fenótipo de resistência aos antibióticos em *Escherichia coli*, sendo, por isso, o sistema mais estudado e caracterizado (Bohnert *et al.*, 2010). Faz parte da família RND e é capaz de efluxar compostos com diferentes características e estruturas (Takatsuka *et al.*, 2010; Bohnert *et al.*, 2016). Como outros desta família, é um sistema tripartido, composto por uma proteína transportadora presente na membrana interna (AcrB), uma proteína de fusão situada no periplasma (AcrA) e um canal proteico transmembranar que facilita a passagem direta dos substratos pelas duas membranas e pelo periplasma (TolC) (Koronakis *et al.*, 2000; Elkins e Mullis, 2007; Viveiros *et al.*, 2008; Hernando-Amado *et al.*, 2016).

Este é um sistema de efluxo dependente da energia obtida através da força motriz protônica. Murakami *et al.* (2006) propôs que o transporte em AcrB, um homotrímico, era feito por um mecanismo rotativo funcional de 3 passos, representado na parte (a) do esquema da Figura 3:

- i. No estado de acesso (“access”) o vestíbulo do local de ligação é aberto para o periplasma, mas o local de ligação ainda é pequeno. Neste ponto, potenciais substratos têm de entrar no vestíbulo, sendo que este é um local de ligação múltiplo onde os substratos se podem ligar em diferentes regiões;

- ii. No estado de ligação (“binding”), o vestíbulo é mantido aberto e o local de ligação é expandido para acomodar o substrato. Nesta fase, a saída do local de ligação é bloqueada;
- iii. Por fim, no estado de extrusão (“extrusion”) o vestíbulo é fechado e a saída do potencial substrato é feita pelo encolhimento do local de ligação, forçando assim o substrato a sair em direção ao canal transmembranar (Murakami *et al.*, 2006; Hernando-Amado *et al.*, 2016).

Desta forma, pode-se afirmar que a proteína membranar AcrB será a principal responsável pela especificidade de substratos e que a principal rota de efluxo dos substratos, é feita através de uma série de canais no periplasma, seguido de alterações conformacionais em AcrB, saindo, posteriormente, pelo canal transmembranar TolC (Elkins e Mullis, 2007; Muramaki *et al.*, 2006; Bohnert *et al.*, 2010; Nikaido, 2011). Por outro lado, Marshall e Bavro (2020) identificaram fenótipos específicos para antibióticos associados a novas mutações no canal TolC sugerindo que a especificidade dos substratos poderá também ser influenciada por este canal.

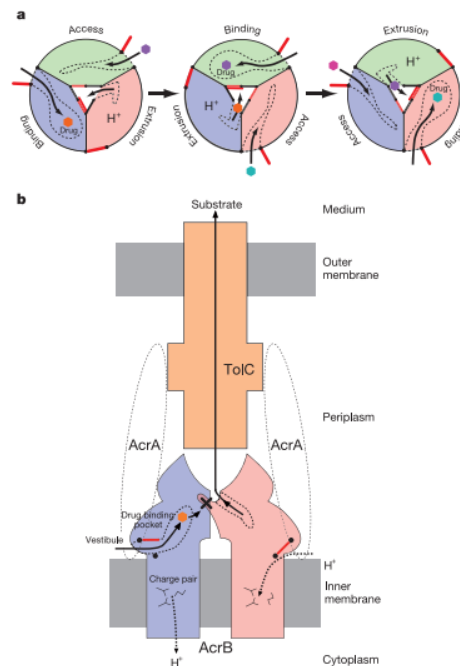


Figura 3 (a) representação esquemática do processo de acesso (“access”), ligação (“binding”) e extrusão

(“extrusion”) de substratos pelo sistema de efluxo AcrAB-TolC; (b) esquema representativo do sistema de efluxo AcrAB-TolC presente numa célula bacteriana (retirado de Muramaki *et al.*, 2006).

1.2.1.2 Detecção e avaliação da atividade de efluxo em bactérias

O estudo dos sistemas de efluxo é essencial para compreendermos a sua contribuição para o aumento de resistências aos antibióticos e consequente disseminação de isolados clínicos MDR; a sua associação a outros mecanismos de resistência bacteriana; e, também, validar possíveis terapêuticas como a utilização conjunta de inibidores de efluxo com antibióticos (Pagès e Amaral, 2009; Blair e Piddock, 2016; Hernando-Amado *et al.*, 2016).

Quando se pretende estudar a atividade de efluxo, podemos recorrer a variados métodos como a fluorimetria, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de massa por tempo de voo (MALDI-TOF MS) ou ensaios de suscetibilidade como a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) dos substratos com e sem inibidores de efluxo e posterior comparação entre estirpes selvagem e mutadas (Rodrigues *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2020; Bohnert *et al.*, 2010; Blair e Piddock, 2016).

A determinação da CMI na presença e ausência de inibidores de efluxo é um método indireto e apenas altas variações no efluxo podem ser detetadas desta forma quando comparados os isolados (Blair e Piddock, 2016). Por outro lado, este método permite quantificar o efeito dos inibidores de efluxo na CMI dos substratos de bombas de efluxo, ou seja, permite calcular a redução do valor da CMI determinando o fator de modulação, sendo que este é proporcional à capacidade inibitória do inibidor de efluxo (Coelho *et al.*, 2015).

O método “Cartwheel” e os ensaios fluorométricos em tempo real são exemplos da aferição direta da atividade de efluxo. O primeiro possibilita a deteção, em placa de agar, da atividade de efluxo aumentada de isolados MDR através da deteção de diferentes concentrações de Brometo de Etídio (EtBr), um conhecido substrato de bombas de efluxo, por fluorescência (Martins *et al.*, 2011). Este é um método rápido e foi desenvolvido na Unidade de Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e

Medicina Tropical. Cada placa de agar inclui uma concentração diferente de EtBr, duas estirpes de referência e o(s) isolado(s) clínico(s) em estudo, sendo que quando os isolados são expostos à luz ultravioleta, a sua fluorescência é detetada. Uma concentração baixa capaz de emitir fluorescência, representa uma menor atividade de efluxo em comparação com os isolados cuja fluorescência só é detetada em concentrações de EtBr mais elevadas (Martins *et al.*, 2011).

Os métodos fluorométricos têm sido os métodos de eleição na deteção e quantificação de transporte de substratos através da parede celular bacteriana, usando moléculas fluorescentes, como o EtBr ou o vermelho do Nilo que são também substratos de bombas de efluxo. O método fluorométrico semi-automático permite analisar a entrada e extrusão de EtBr em tempo real através da utilização do termociclador em tempo real Rotor-Gene 3000TM (Corbett Research, Sydney, Austrália), tendo este método sido também desenvolvido e implementado na Unidade de Microbiologia Molecular do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (Viveiros *et al.*, 2008). Para a sua realização são necessárias várias fases para cada isolado em estudo: (i) primeiramente faz-se a determinação da concentração de equilíbrio do EtBr, na qual o isolado apresenta um equilíbrio no influxo e efluxo deste fluorocromo; e (ii) a definição das concentrações de EtBr e inibidor de efluxo a testar de modo que estas não afetem a viabilidade celular (Machado *et al.*, 2017). No ensaio de acumulação, é observada a capacidade de a célula acumular EtBr na presença e ausência de um inibidor de efluxo. Assim, na ausência do inibidor, quanto maior for a acumulação, menor será a sua capacidade de efluxo. Por outro lado, a presença de um inibidor de efluxo resultará numa maior acumulação intracelular de EtBr, conseqüente da sua ação. A capacidade da ação do inibidor de efluxo pode, então, ser determinada por estes dois valores de fluorescência. Os ensaios de efluxo permitem, por outro lado, quantificar a atividade de efluxo por comparação dos valores de fluorescência obtidos em condições que permitem o efluxo, ou seja, na ausência do inibidor de efluxo e na presença de glucose, e os valores obtidos em condições que não permitem o efluxo (Machado *et al.*, 2017).

Os ensaios de efluxo por fluorometria são também úteis no estudo da competição de substratos. Neste caso, tem sido prática comum usar células pré-carregadas com um determinado substrato fluorescente na presença de um inibidor de

efluxo. Desta forma ocorre uma acumulação máxima do substrato em estudo devido à inibição da atividade das bombas de efluxo sendo de seguida reenergizadas pela adição de glucose, que permite que o efluxo recomece e cuja fluorescência pode ser medida ao longo do tempo. Esta alteração de fluorescência, consequente da taxa de efluxo, pode ser comparada entre estirpes “selvagem” e mutantes e, quando o fluorocromo é combinado com um outro substrato ou inibidor de efluxo, pode ser estudada e avaliada a competição pelo efluxo (Blair e Piddock, 2016). Este tipo de estudos permite, por isso, estudar a cinética do efluxo dos substratos e, quando complementada com outros métodos, permite perceber também quais serão os locais de ligação previsíveis dos diferentes compostos na bomba.

Takatsuka *et al.* (2010) percebeu através de estudos computacionais que há, presumivelmente, dois tipos de locais no protomero de ligação de AcrB, onde os substratos se ligam: ou numa estreita ranhura do local de ligação (substratos denominados de “groove-binders”) ou numa zona mais interior no local de ligação (substratos denominados de “cave-binders”) estando estes em locais opostos. Neste mesmo estudo, concluíram que os substratos “groove-binders” eram presumivelmente competidores, ao contrário dos substratos “cave-binders” (Takatsuka *et al.*, 2010).

Como já foi referido, os ensaios fluorométricos usam moléculas fluorescentes, como o EtBr, vermelho do Nilo, entre outros, que são também elas substratos de bombas de efluxo.

Vermelho do Nilo é um corante lipofílico que se liga à membrana fosfolipídica emitindo pouca fluorescência em soluções aquosas. É o corante ideal no estudo de bombas de efluxo da família RND dado encontrar-se no periplasma e tendo um efluxo mais rápido comparativamente com compostos citoplasmáticos, como o EtBr, e tem um rácio sinal-ruído e um comprimento de onda de emissão ótimo para a avaliação da competição de substratos, havendo por isso menor interferência entre substratos (Blair e Piddock, 2016).

1.3 Enterobacteriaceae e *Escherichia coli*

As *Enterobacteriaceae* são a família de bactérias Gram-negativas mais heterogênea e importante a nível clínico. Os seus membros são bacilos, aeróbios ou anaeróbios facultativos; são fermentadores de glucose com produção de ácido (com ou sem gás); a maioria é catalase positivo, oxidase negativo; a maioria reduz os nitratos a nitritos; e tipicamente colonizam o intestino de humanos e animais, no entanto também podem ser encontrados noutras partes do corpo, água e plantas (Murray *et al.*, 2016). Estas bactérias são a principal causa de várias doenças humanas, incluindo infeções no trato urinário.

A estirpe mais importante desta família a nível clínico é *Escherichia coli*. Descoberta em 1885 por Theodor Escherich nas fezes de uma criança com doença gastrointestinal, é uma bactéria Gram-negativa que apresenta uma forma de bastonete (Mainil, 2013; Murray *et al.*, 2016). A maioria das estirpes de *E. coli* não causa doença, no entanto, várias estão associadas a infeções no trato urinário, bacteremias e meningite neonatal (Anes *et al.*, 2015; Cadan e Aksöz, 2017).

Esta bactéria apresenta diferentes fatores de virulência que a capacitam no crescimento e disseminação no hospedeiro e nos quais se incluem variações estruturais como adesinas (*p.e.* fímbrias) de modo a ser possível a fixação a uma célula, secreção de toxinas (endotoxinas ou exotoxinas), entre outras. Assim, existem diferentes estirpes patogénicas de *E. coli* e que podem ser divididas em grupos, dependendo da síndrome que causam: *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* verotoxigénica (VTEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroadesiva ou enteroagregativa (EAEC ou EAggEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC), *E. coli* necrotóxica (NTEC), *E. coli* uropatogénica (UPEC), *E. coli* invasiva (SePEC) (Mailin, 2013).

Além da sua importância a nível clínico, esta espécie é um importante bioindicador de contaminação fecal, seja humano ou animal, na água e alimentos e é amplamente escolhida como organismo modelo para estudos nas várias áreas da biologia dado o tamanho reduzido do seu genoma e crescimento rápido com poucos requisitos nutricionais.

1.4 Objetivos

Neste trabalho pretendeu-se verificar e avaliar a existência de competição de substratos de bombas de efluxo, neste caso, especificamente do sistema AcrAB-TolC de *Escherichia coli*, utilizando um método fluorométrico que permite o screening alargado da atividade de efluxo na presença e ausência de vários compostos como inibidores de efluxo, antibióticos de diferentes classes, corantes e detergentes. Para tal, foram delineados 3 objetivos:

- i. A determinação do perfil de suscetibilidade a substratos de bombas de efluxo através da determinação de CMI, numa primeira fase, de estirpes de referência e controlo, e, numa segunda fase, de isolados clínicos escolhidos da coleção do nosso grupo;
- ii. A determinação do efluxo de vermelho do Nilo nas estirpes em estudo por ensaios de fluorimetria em tempo real;
- iii. A avaliação da existência de competição entre o vermelho do Nilo e outros substratos da bomba de efluxo AcrAB-TolC por ensaios de fluorimetria em tempo real.

2. Material e Métodos

2.1 Material

2.1.1 Material Biológico

2.1.1.1 Estirpes de controlo e referência

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas 3 estirpes de controlo e 1 estirpe de referência de *E. coli*:

A estirpe de referência, usada como controlo de qualidade, foi *E. coli* ATCC® 25922™ (*Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers | ATCC), cujo sistema de efluxo se encontra intato e funcional.

As estirpes de controlo utilizadas diferem no seu sistema de efluxo AcrAB-TolC: a estirpe selvagem, *E. coli* K-12 AG100, tem este sistema de efluxo intato e funcional; *E. coli* AG100A, derivada da anterior, tem este sistema de efluxo inativo devido à inserção do transposão Tn903 associado à resistência à canamicina (KAN); e *E. coli* AG100_{TET}, também derivada da primeira, tem este sistema de efluxo sobreexpresso por consequência da contínua exposição a concentrações aumentadas de tetraciclina (TET) (Viveiros *et al.*, 2005).

2.1.1.2 Estirpes clínicas

As estirpes clínicas foram usadas para validação dos resultados obtidos com as estirpes de controlo e referência. Estas foram obtidas de amostras de sangue, pus e urina provenientes de pacientes com infeções urinárias em 3 unidades hospitalares da região de Lisboa.

O seu perfil de suscetibilidade foi anteriormente estudado (Silva, 2018; Roseiro, 2020) e estão designadas com o acrónimo EC, de *Escherichia coli*, seguido de dois dígitos correspondentes ao ano em que a amostra foi obtida, e um número de identificação: EC 02-31; EC 08-14; EC 08-15; EC 18-5234; EC 18-528084.

2.1.2 Meios de cultura e soluções

Todas as estirpes foram inoculadas em meio sólido Luria Bertani (LA) e meio líquido Luria Bertani (LB) para crescimento e manutenção; e o meio líquido Mueller-Hinton (MHB) foi usado na determinação da CMI. Todos os meios de cultura foram preparados com água bidestilada e esterilizados em autoclave a 121°C, 1 bar, durante 15 min. A composição de cada um dos meios de cultura utilizados e restantes soluções encontra-se nas Tabelas 2-6.

Tabela 2 Composição e preparação dos meios de cultura utilizados.

Meio de cultura	Composição (por litro)
Luria Bertani Agar	10 g de cloreto de sódio ⁽¹⁾ ; 10 g de peptona de caseína ⁽¹⁾ ; 5 g de extrato de levedura ⁽¹⁾ ; 20 g agar ⁽²⁾
Luria Bertani (meio líquido)	10 g de cloreto de sódio ⁽¹⁾ ; 10 g de peptona de caseína ⁽¹⁾ ; 5 g de extrato de levedura ⁽¹⁾
Mueller-Hinton (meio líquido) ⁽²⁾	300 g de infusão desidratada de carne; 17,5 g de caseína hidrolisada; 1,5 g de amido; 4,683 mg Ca ²⁺ ; 5,019 mg Mg ²⁺ ; pH 7,3±0,1 a 25°C

⁽¹⁾ Merck; ⁽²⁾ Oxoid

Tabela 3 Composição e preparação dos inibidores de efluxo utilizados.

Compostos	Composição
Carbonil cyanide-m-chlorophenylhydrazone ⁽¹⁾	10 mg/mL em Dimetilsulfóxido (DMSO)
Clorpromazina ⁽¹⁾	10 mg/mL em água bidestilada estéril
Phe-arg-β-naphthylamide ⁽¹⁾	10 mg/mL em água bidestilada estéril

⁽¹⁾ Sigma

Tabela 4 Composição e preparação dos antibióticos utilizados.

Compostos	Composição
Cloranfenicol ⁽¹⁾	10 mg/mL em DMSO
Ciprofloxacina ⁽²⁾	10 mg/mL em água bidestilada estéril com 1% de Ácido Clorídrico (HCl)
Doxorrubicina ⁽³⁾	10 mg/mL em água bidestilada estéril
Doxiciclina ⁽³⁾	10 mg/mL em água bidestilada estéril
Eritromicina ⁽¹⁾	10 mg/mL em DMSO
Gentamicina ⁽¹⁾	10 mg/mL em água bidestilada estéril
Oxacilina ⁽¹⁾	10 mg/mL em água bidestilada estéril
Minociclina ⁽¹⁾	10 mg/mL em água bidestilada estéril
Tetraciclina ⁽¹⁾	10 mg/mL em DMSO

⁽¹⁾ Sigma; ⁽²⁾ Fluka BioChemika; ⁽³⁾ Fisher Bioreagents

Tabela 5 Composição e preparação dos corantes, biocidas e detergentes utilizados.

Compostos	Composição
Acriflavina ⁽¹⁾	10 mg/mL em água bidestilada estéril
Ácido Deoxicólico ⁽¹⁾	10 mg/mL em água bidestilada estéril
Vermelho do Nilo ⁽²⁾	5 mM em DMSO
Safranina ⁽¹⁾	10 mg/mL em água bidestilada estéril
Brometo de Tetrafenilfosfônio ⁽¹⁾	10 mg/mL em DMSO

⁽¹⁾ Sigma; ⁽²⁾ Acros Organics

Tabela 6 Composição e preparação das soluções e tampões utilizados.

Compostos	Composição
Glucose ⁽¹⁾ 1M	36,03 g dissolvidos em 200 mL de água bidestilada
Glicerol ⁽¹⁾ 50%	25 mL de Glicerol 100% em água bidestilada
Cloreto de Magnésio ⁽¹⁾ 1M	19,04 g de MgCl ₂ dissolvidos em 200 mL de água bidestilada
Fosfato de Potássio ⁽²⁾ 1M pH 7,0	34,83 g de K ₂ HPO ₄ dissolvidos em 200 mL de água bidestilada
Tampão Fosfato de Potássio	1mM de MgCl ₂ ; 20mM de K ₂ HPO ₄ em água bidestilada para um volume final de 200 mL

⁽¹⁾ Sigma; ⁽²⁾ Acros Organics

Todos os compostos da Tabela 5 foram esterilizados em autoclave a 121°C, 1 bar, durante 15 min, exceto o tampão fosfato de potássio (PPB).

Todos os compostos foram guardados a -20°C exceto a acriflavina, safranina, glucose e vermelho do Nilo que foram guardados a -4°C, e o cloreto de magnésio, fosfato de potássio e PPB que se mantiveram à temperatura ambiente.

2.2 Métodos

2.2.1 Crescimento e manutenção das estirpes em estudo

Todas as estirpes utilizadas neste trabalho foram inoculadas em placas de Petri com LA a 37°C durante 18h, exceto no caso da estirpe AG100_{TET}, que necessita de 48h para crescer em meio sólido dadas as suas características, e foram guardadas a 4°C durante, no máximo, 2 semanas.

Os “stocks” das estirpes foram feitos por inoculação em meio LB a 37°C e agitação a 180 rpm, durante 18h exceto no caso da estirpe AG100_{TET}, que necessita de 24h para crescer em meio líquido dadas as suas características, e 10% de glicerol a 50%.

Os “stocks” foram guardados a -20°C.

A estirpe AG100A foi sempre inoculada (quer em meio líquido, quer em meio sólido) na presença de canamicina a 100 µg/mL para manutenção do transposão, e a estirpe AG100_{TET} na presença de tetraciclina a 8 µg/mL para manutenção da sobreexpressão das bombas de efluxo.

2.2.2 Determinação da CMI

A CMI de todos os compostos descritos foi determinada para todas as estirpes anteriormente descritas. Esta determinação foi feita através do método de microdiluição seriada em placas de 96 poços, e os respectivos resultados foram interpretados de acordo com as normas recomendadas pelo “Clinical Laboratory Standards Institute” (CLSI).

Para a realização deste método, prepararam-se culturas primárias da estirpe em meio LA, que foram posteriormente incubadas em 5 mL de meio LB como descrito no ponto 2.2.1.

Prepararam-se as soluções de trabalho dos compostos a testar a partir das respetivas soluções “stock”, com uma concentração 4x superior à concentração mais alta desejada para teste.

A uma placa de 96 poços foram adicionados 100 µL de meio MHB a todos os poços, exceto os da primeira coluna onde foram adicionados 200 µL para o controlo negativo. Da coluna 3 à 12 tem-se as diluições seriadas dos compostos em estudo na razão de 1:2 entre colunas adjacentes. Foram então adicionados 100 µL dos compostos em teste na terceira coluna e transferidos entre as colunas 3 e 12 onde são descartados na última coluna, ficando assim toda a placa, exceto a primeira coluna, com um volume total de 100 µL como descreve a Figura 4.

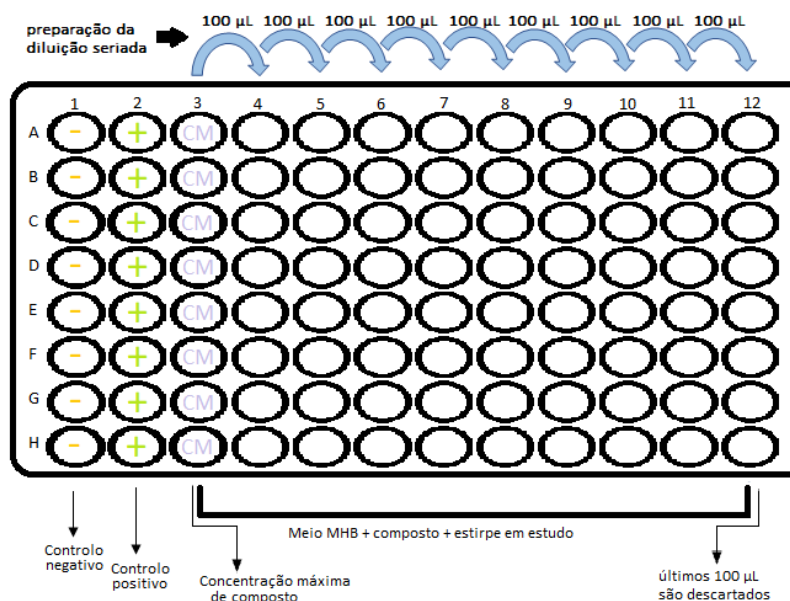


Figura 4 Representação esquemática do método de microdiluição seriada em placa para determinação da CMI. Legenda: (-), controlo negativo; (+), controlo positivo; CM, concentração máxima de composto; MHB, do inglês “Mueller-Hinton broth”.

A partir das culturas anteriormente descritas, foram transferidos 10 µL para um tubo de ensaio com 10 mL de meio MHB, homogeneizada a suspensão celular e depois transferido 1 mL para um tubo de ensaio com 9 mL de meio MHB, homogeneizando também após transferência.

Por fim, 100 µL da estirpe em estudo é adicionada a todos os poços, exceto os da primeira coluna, ficando a segunda coluna como controlo positivo, e a placa é incubada durante 18h (24h para a AG100_{TET}) a 37°C.

Todos os ensaios foram feitos pelo menos duas vezes para cada composto. A CMI é a concentração mais baixa onde não é observado crescimento bacteriano.

2.2.3 Ensaio de fluorimetria em tempo real

O protocolo que aqui vai ser descrito, foi adaptado do protocolo estudado e utilizado por *Bohnert et al.* (2010).

A um Erlenmeyer com 20 mL de meio LB foram adicionados 200 μ L de uma cultura primária da estirpe em estudo, que foi posteriormente crescida num agitador a 37°C e 180 rpm durante 16h.

Recolheram-se 10 mL desta última cultura e centrifugaram-se a 4400 rpm durante 10 min à temperatura ambiente. O “pellet” foi ressuscitado em 10 mL de PPB e após nova centrifugação e ressuspensão, ajustou-se a suspensão celular a uma OD_{660nm} de 1.0 com PPB, garantindo um volume final de pelo menos 8 mL. As células foram deixadas a repousar à temperatura ambiente durante 15 min e 2 mL foram transferidos para quatro tubos de ensaio pequenos onde foi adicionado CCCP a uma concentração final de 10 μ M para a estirpe AG100_{TET} e 5 μ M para as restantes.

No caso de ser um ensaio de competição, após 15 min, um potencial competidor foi adicionado em concentrações diferentes para cada um dos tubos (a CMI do composto, 1/2 CMI, 1/4 CMI e 1/8 CMI).

Após 15 min, foi adicionado vermelho do Nilo numa concentração final de 5 μ M, e os tubos foram incubados num agitador a 37°C e 180 rpm durante 3h.

Os tubos foram deixado à temperatura ambiente durante 1h e 1 mL de cada suspensão celular foi centrifugado a 4400 rpm durante 5 min. O “pellet” foi ressuscitado em 1 mL PPB.

Numa placa preta de 96 poços previamente preparada com 177 μ L de PPB com a mesma concentração do potencial competidor usada no ensaio, foram adicionados 23 μ L da respetiva suspensão celular. A placa foi então colocada no leitor de microplacas Synergy HT com as seguintes definições: temperatura a 37°C; excitação 530/25; emissão 590/35.

A fluorescência das suspensões celulares foi medida durante 90 s, sendo o efluxo estimulado pela adição de 10 μ L de 1 M glucose e medida por mais 180 s.

Todos os ensaios foram feitos pelo menos duas vezes para cada composto.

3. Resultados e Discussão

O sistema de efluxo AcrAB-TolC é uma das mais importantes causas de desenvolvimento de fenótipos MDR em *E. coli*, sendo o seu estudo e compreensão dos seus mecanismos essenciais no combate a este mecanismo de resistência, não só nesta espécie como também noutras. Para tal, os métodos fluorométricos têm sido os métodos de eleição na deteção e quantificação de transporte de substratos através da parede celular bacteriana usando moléculas fluorescentes, como é o caso de vermelho do Nilo, também ele substrato de bombas de efluxo.

O foco deste trabalho foi a avaliação de competição entre substratos deste sistema de efluxo. Para tal, foi otimizado um ensaio de acumulação em tempo real usando um formato de alto desempenho utilizando placas pretas de 96 poços para o leitor de microplacas Synergy HT, vermelho do Nilo como fluoróforo/competidor, o CCCP para retirar a energia das células e glucose como fonte de energia. Usando quatro concentrações diferentes (CMI, $\frac{1}{2}$ CMI, $\frac{1}{4}$ CMI e $\frac{1}{8}$ CMI), foram testados como possíveis competidores a gentamicina, oxacilina, doxorubicina, cloranfenicol, eritromicina, doxiciclina, tetraciclina, brometo de tetrafenilfosfónio, acriflavina e safranina, e os inibidores de efluxo clorpromazina e PA β N.

Primeiramente, o ensaio foi feito em quatro estirpes de *E. coli*: três isogénicas que diferem entre si na expressão do sistema de efluxo AcrAB-TolC e a estirpe de referência ATCC25922. Depois, foram escolhidos cinco isolados clínicos de *E. coli* da nossa coleção e também eles testados. Estes isolados clínicos foram obtidos de amostras de sangue, pus e urina provenientes de pacientes com infeções urinárias em 3 unidades hospitalares da região de Lisboa. O perfil suscetibilidade de todas as estirpes aqui usadas foi estudado previamente pelo nosso grupo, utilizando o método de Kirby-Bauer e uma diversidade de antibióticos da classe dos β -lactâmicos, Quinolonas, Aminoglicosídeos, Macrólidos, Tetraciclina, Fenicóis e Trimetropim (Silva, 2018; Roseiro, 2020).

Tabela 7 Perfil de suscetibilidade aos antibióticos das estirpes de *E. coli* em estudo determinado pelo método de Kirby-Bauer (adaptado de Roseiro, 2020)

Antibióticos		Perfil de susceptibilidade								
		<i>E. coli</i>								
		1	2	3	4	7	13	19	24	25
Penicilinas	PEN	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	AMP	S	S	S	R	R	R	S	R	R
	AMC	S	S	S	S	R	R	S	R	R
	PRL	S	S	S	R	R	R	S	S	S
	TZP	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	TEM	S	R	S	R	S	S	S	S	S
	OXA ⁽¹⁾	R	R	R	R*	R	R	R	R	R
Cefalosporinas	CXM	S	S	S	S	R	R	S	S	S
	FOX	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	CTX	S	S	S	S	S	R	S	S	S
	CAZ	S	S	S	S	S	I	S	S	S
	CRO	S	S	S	S	S	R	S	S	S
	FEP	S	S	S	S	S	R	S	S	S
	Carbapenems	MEM	S	S	S	S	S	S	S	S
IPM		S	S	S	S	S	S	S	S	S
DOR		S	S	S	S	S	S	S	S	S
Monobactams	ATM	S	S	S	S	S	R	S	S	S
Quinolonas	NA	S	S	S	R	R	R	S	S	R
	NOR	S	S	S	S	R	S	S	S	R
	CIP	S	S	S	S	R	R	S	S	R
	OFX	S	S	S	S	R	R	S	S	R
	LEV	S	S	S	S	R	I	S	S	R
Aminoglicosídeos	AK	S	S	S	S	S	S	S	R	S
	CN	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	NET	S	S	S	S	S	S	S	R	S
	TOB	S	S	S	S	S	S	S	R	S
Macrólidos	E ⁽¹⁾	R (10)	R (10)	R (20)	R (6)	R (-)	R (11)	R (12)	R (6)	R (10)
Tetraciclina	TE	S	S	S	R	R	R	S	R	R
	TE ¹	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Gliciliclinas	TGC	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Fenicolis	C	S	S	S	R	S	S	S	S	S
Outros	W	S	S	S	S	R	R	S	S	R
	SXT	S	S	S	S	R	R	S	R	S

NOTA: As estirpes MDR estão apresentadas a cor vermelha.

(1) – Não existem breakpoints para Enterobacteriaceae – apresenta-se o diâmetro do halo obtido.

* resistência menor à oxacilina comparativamente a outras estirpes.

Legenda: PEN, penicilina; AMP, ampicilina; AMC, amoxicilina-ácido clavulânico; PRL, piperacilina; TZP, piperacilina-tazobactam; TEM, temocilina; OXA, oxacilina; FOX, ceftaxima; CXM, cefuroxima; CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; CRO, ceftriaxona; FEP, cefepima; MEM, meropenem; IPM, imipenem; DOR, doripenem; ATM, aztreonam; NA, ácido nalidíxico; NOR, norfloxacina; CIP, ciprofloxacina; OFX, ofloxacina; LEV, levofloxacina. 1 – ATCC; 2 – AG100; 3 – AG100A; 4 – AG100_{TET}; 7 – EC02-31; 13 – EC18-5234; 19 – EC18-528084; 25 – EC08-14; 26 – EC08-15.

O sistema de efluxo AcrAB-TolC é conhecido por transportar uma série de diferentes compostos, com diferentes estruturas e modos de ação, como os acima mencionados e sabe-se que o efluxo tem um papel na resistência a quinolonas, fluoroquinolonas e tetraciclina (Takatsuka *et al.*, 2010; Nikaido, 2011; Poirel, 2018). Por outro lado, sabe-se que *E. coli* é intrinsecamente resistente a penicilinas como a penicilina G e a oxacilina e macrólidos (Nikaido, 2011). No entanto, outros mecanismos poderão estar associados às resistências anteriormente mencionadas, como é o caso da presença de diferentes tipos de β -lactamases, também verificado nos mesmos estudos (Silva, 2018; Roseiro, 2020).

3.1 Determinação da CMI

As CMI de cada composto para cada estirpe foram determinadas antes de se realizarem os ensaios de fluorimetria em tempo real para serem usadas nestes, sendo que alguns dos resultados foram obtidos por outros membros do nosso grupo no decorrer de outros trabalhos. Os resultados estão, então, representados nas Tabelas 7 e 8.

Estes ensaios permitiram também pressupor que os compostos testados eram todos, à exceção da gentamicina, substratos do sistema de efluxo AcrAB-TolC, dada a descida de CMI destes compostos na estirpe AG100A onde este sistema está inativo comparativamente com a estirpe AG100, onde o sistema se encontra intato e funcional (Elkins e Nikaido, 2002).

Tabela 8 Resultados da CMI das estirpes de controlo e referência

Compostos			CMI ($\mu\text{g/mL}$)				
			ATCC25922	AG100	AG100A	AG100 _{TET}	
Detergentes, biocidas e corantes			ACR	16*	16*	4	64
			DA	> 2048	> 2048	> 2048	> 2048
			SAF	128*	128*	4	256
			TPP	256*	128*	8	128
Antibióticos	Aminoglicosídeos	GEN	1*	0.5*	0.5	1	
	Antraciclinas	DOX	64	> 128	0.25	> 64	
	Fenicóis	CHL	4*	16*	2	16	
	Macrólidos	ERY	64*	32*	1	32	
	Penicilinas	OXA	512*	512*	1	1024	
	Quinolonas	CIP	0.0039*	0.0156*	0.0019	0.25	
	Tetraciclinas	DOXY	1	2	0.25	8	
		MIN	0.25	1	0.0625	0.125	
TET		0.5*	1*	0.25	1		
Inibidores de Efluxo			CPZ	32*	64*	16	128
			PA β N	256*	512*	64	256

*dados previamente obtidos por elementos do nosso grupo (não publicados)

Legenda: ACR, acriflavina; DA, ácido deoxicólico; SAF, safranina; TPP, brometo de tetrafenilfosfónio; CHL, cloranfenicol; CIP, ciprofloxacina; DOX, doxorubicina; DOXY, doxiciclina; ERY, eritromicina; GEN, gentamicina; MIN, minociclina; OXA, oxacilina; TET, tetraciclina; CPZ, clorpromazina; PA β N, “phe-arg- β -naphthylamide”

Tabela 9 Resultados da CMI das estirpes clínicas

Compostos		CMI ($\mu\text{g/mL}$)					
		EC 02-31	EC 08-14	EC 08-15	EC 18-5234	EC 18-528084	
Detergentes, biocidas e corantes	ACR	16*	32*	32*	16*	256*	
	DA	> 2048	> 2048	> 2048	> 2048	> 2048	
	SAF	256*	128*	128*	128*	16*	
	TPP	128*	256*	256*	256*	256*	
Antibióticos	Aminoglicosídeos	GEN	2*	8*	1*	2*	1*
	Antraciclinas	DOX	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64
	Fenicóis	CHL	32*	8*	8*	16*	8*
	Macrólidos	ERY	64*	256*	64*	32*	64*
	Penicilinas	OXA	512*	512*	256*	512*	256*
	Quinolonas	CIP	4*	4*	0.0078*	1*	0.0078*
	Tetraciclinas	DOXY	4	8	8	4	1
		MIN	2	2	8	1	0.25
TET		4*	4*	4*	4*	1*	
Inibidores de Efluxo	CPZ	128*	64*	64*	64*	64*	
	PA β N	256*	256*	256*	256*	256*	

*dados previamente obtidos por elementos do nosso grupo (não publicados)

Legenda: ACR, acriflavina; DA, ácido deoxicólico; SAF, safranina; TPP, brometo de tetrafenilfosfônio; CHL, cloranfenicol; CIP, ciprofloxacina; DOX, doxorrubicina; DOXY, doxiciclina; ERY, eritromicina; GEN, gentamicina; MIN, minociclina; OXA, oxacilina; TET, tetraciclina; CPZ, clorpromazina; PA β N, “phe-arg- β -naphthylamide”

3.2 Ensaios de fluorimetria em tempo real

De modo a avaliar os resultados obtidos pela leitura do fluorímetro, foi necessário fazer a sua normalização. Neste processo foi calculado o valor de fluorescência medida na presença de glucose, equivalente à fluorescência medida na ausência de glucose, sendo este resultado subtraído ao último valor de fluorescência

medida na ausência de glucose. Com a normalização dos resultados foi possível observar não só a acumulação de compostos proporcionada pela ação do CCCP até aos 90 s de leitura, como o efluxo dos mesmos, e consequente redução da fluorescência, depois de adicionada a glucose.

Dado o elevado número de resultados obtidos, foram escolhidos os gráficos relativos ao efluxo de vermelho do Nilo para as estirpes de controlo, referência e clínicas, e três gráficos representativos dos diferentes resultados obtidos em ensaios de competição.

Salienta-se que, para este estudo a ciprofloxacina e a minociclina não foram consideradas uma vez que apresentam valores de CMI muito reduzidos, sendo estes mais propensos a erros de diluição e, visto que o protocolo ainda estava em fase de otimização, optámos por excluí-los dos ensaios de fluorimetria. Também o ácido deoxicólico foi excluído, mas, neste caso, a razão foi por não se ter conseguido encontrar o valor de CMI dado que este valor é provavelmente muito alto.

Como pode ser observado na Figura 6, de entre as estirpes de controlo e referência, a estirpe AG100A mostrou menor capacidade de efluxar vermelho do Nilo. Já na estirpe AG100_{TET}, apesar da presença de glucose, a redução da fluorescência foi apenas momentânea, voltando com o tempo a níveis mais elevados. Já a estirpe ATCC25922, apresentada na Figura 5, segue um padrão semelhante à AG100 e AG100A, mas com maior capacidade de efluxo que as anteriores.

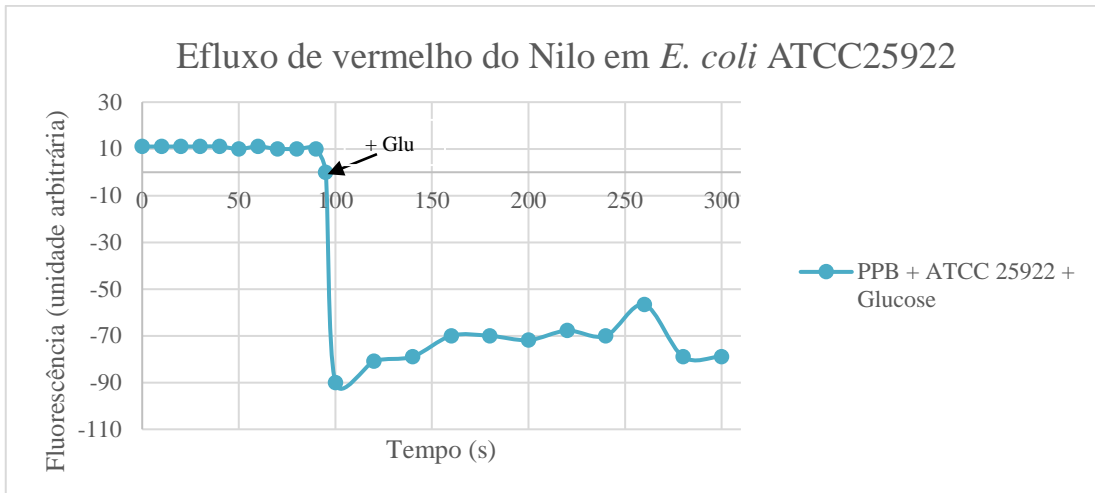


Figura 5 Gráfico representativo do efluxo de vermelho do Nilo em *E. coli* ATCC25922. Legenda: PPB, do inglês “Potassium Phosphate Buffer”

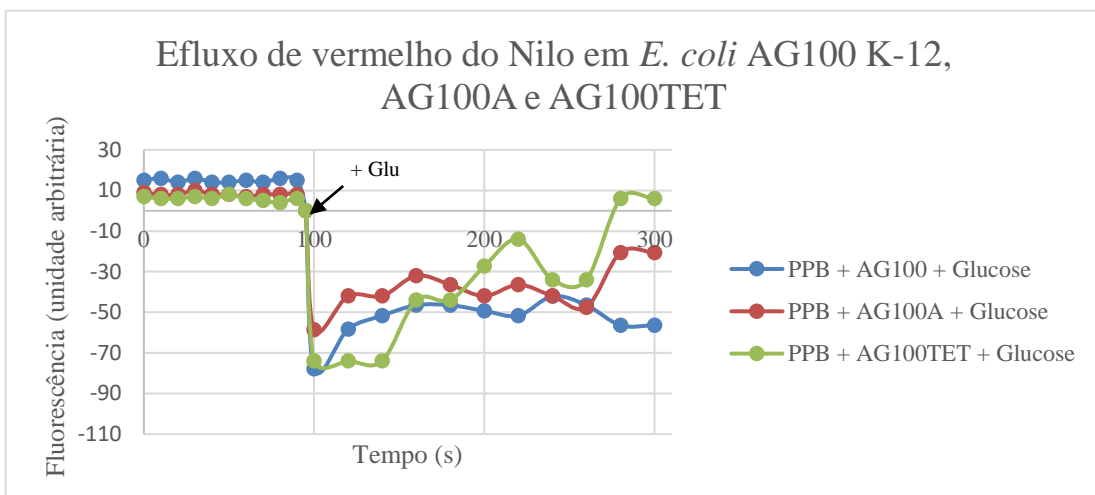


Figura 6 Gráfico representativo do efluxo de vermelho do Nilo em *E. coli* AG100 K-12, AG100A e AG100^{TET}. Legenda: PPB, do inglês “Potassium Phosphate Buffer”

Relativamente ao efluxo de vermelho do Nilo nos isolados clínicos, representado na Figura 7, podemos observar uma diferença do efluxo na estirpe EC 02-31, onde se verifica primeiramente um menor efluxo comparativamente com as restantes e depois retorno a maiores níveis de fluorescência. Este aumento nos níveis de fluorescência também pode ser observado nas estirpes EC08-14 e EC 18-5234, no entanto, não são subidas tão significativas como a anterior. Por outro lado, a estirpe que parece ter maior

atividade de efluxo é a EC 08-15, seguida da EC 18-528084, EC 08-14, EC 18-5234 e, por fim, a EC 02-31. Estes resultados relativos às estirpes EC 08-14 e EC 08-15 coincidem com o encontrado noutro trabalho realizado pelo nosso grupo, quando aplicado o método fluométrico semi-automático em termociclador em tempo real Rotor-Gene 3000, descrito no ponto 1.2.1.2 da presente dissertação (Roseiro, 2020).

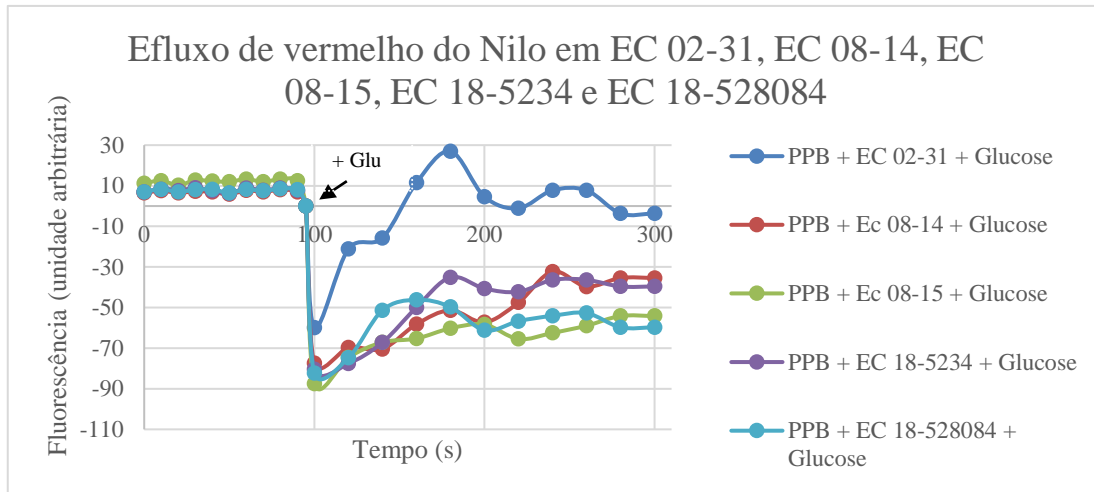


Figura 7 Gráfico representativo do efluxo de vermelho do Nilo em EC 02-31, EC 08-14, EC 08-15, EC 18-5234 e EC 18-528084. Legenda: PPB, do inglês “Potassium Phosphate Buffer”; EC, *Escherichia coli*

Nas Figuras 8, 9 e 10 estão representados gráficos representativos dos resultados obtidos para outros compostos e estirpes:

- i. No primeiro caso podemos observar que aparentemente a presença de acriflavina para a estirpe clínica EC 08-15 não teve qualquer efeito no efluxo de vermelho do Nilo, sendo os níveis de fluorescência nos 5 casos, semelhante;
- ii. No 2º caso observa-se um aumento significativo do efluxo de vermelho do Nilo (numa diferença de cerca de 20 a 30 unidades de fluorescência em algumas das concentrações) na presença de tetraciclina na estirpe EC 02-31. Nesta estirpe, é possível que haja uma maior afinidade pelos sistemas de efluxo para efluxar vermelho do Nilo, comparativamente com a tetraciclina;
- iii. Por fim, no 3º caso observa-se uma acumulação de vermelho do Nilo, ocorrida

na estirpe EC 08-14 na presença de doxiciclina. Aqui, é provável que haja competição entre os substratos, vermelho do Nilo e doxiciclina, pelo local de ligação na bomba.

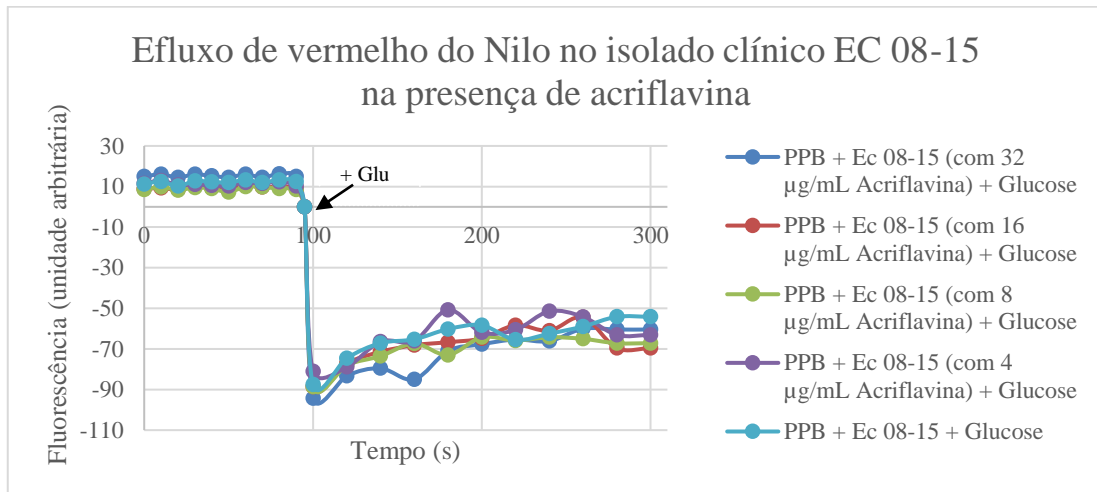


Figura 8 Gráfico representativo do efluxo de vermelho do Nilo no isolado clínico EC 08-15 na presença de acriflavina. Legenda: PPB, do inglês “Potassium Phosphate Buffer”; EC, *Escherichia coli*

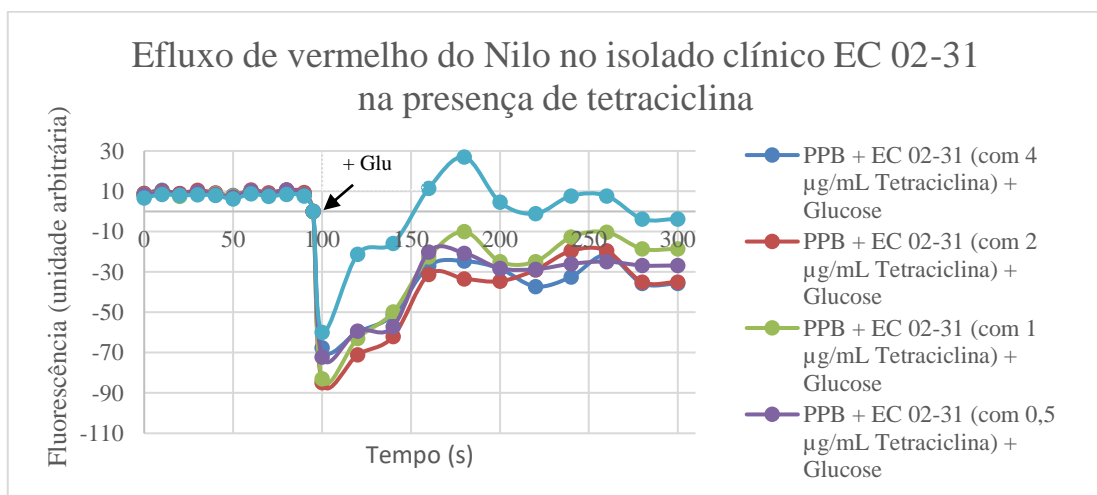


Figura 9 Gráfico representativo do efluxo de vermelho do Nilo no isolado clínico EC 02-31 na presença de tetraciclina. Legenda: PPB, do inglês “Potassium Phosphate Buffer”; EC, *Escherichia coli*

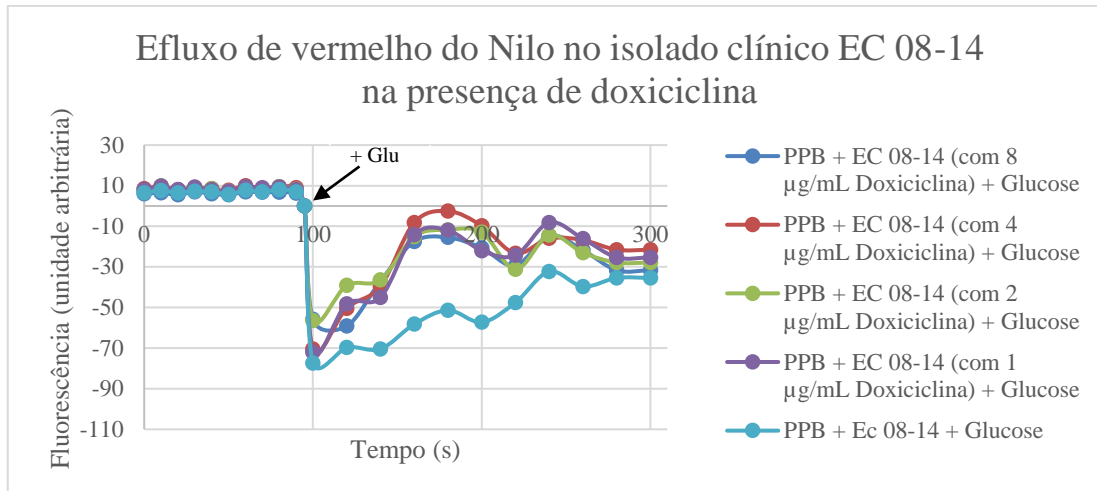


Figura 10 Gráfico representativo do efluxo de vermelho do Nilo no isolado clínico EC 08-14 na presença de doxiciclina. Legenda: PPB, do inglês “Potassium Phosphate Buffer”; EC, *Escherichia coli*

Como pode ser observado em todos os gráficos houve uma acumulação de compostos nos primeiros 90s de leitura, onde a ação CCCP inibiu a força motriz protônica, consequentemente desativando as bombas de efluxo, sendo esta acumulação semelhante em todas as estirpes. Após a adição da glicose, considerado nos gráficos aos 100s, o efluxo foi despoletado e, segundo a interação entre os substratos e vermelho do Nilo com os sistemas de efluxo ativos, a presença de determinado composto influenciou ou não o efluxo de vermelho do Nilo em determinada estirpe (por exemplo, como observado no gráfico anterior, a presença de doxiciclina no isolado clínico EC 08-14, promoveu a acumulação de vermelho do Nilo).

As tabelas 9 e 10 pretendem resumir os resultados dos vários ensaios de fluorimetria. Nesta tabela encontram-se descritas as diferentes formas de interação dos compostos no efluxo de vermelho do Nilo. Note-se que, em alguns casos, o efluxo de vermelho do Nilo pode ser afetado de várias formas dependendo da concentração do composto em causa, por exemplo a presença de tetraciclina na estirpe AG100 a concentração de 0,5 µg/mL promove o efluxo de vermelho do Nilo, a concentração 0,25 µg/mL não terá efeito neste efluxo e as restantes promovem a sua acumulação. Nestes casos, as concentrações relativas a cada variação encontram-se descritas no espaço inferior à linha. Assim, PA quer dizer que determinado composto em

determinada estirpe promoveu a acumulação de vermelho do Nilo, SE quer dizer que o composto não teve efeito no efluxo de vermelho do Nilo e PE quer dizer que determinado composto promoveu o efluxo de vermelho do Nilo.

É importante salientar que estas avaliações gerais foram feitas apenas por observação dos gráficos, sendo esta uma avaliação subjetiva que poderá diferir dependendo do observador. Dizer também que estas avaliações são relativas ao comportamento geral de cada reta relativamente à reta controle, ou seja, apesar de haver variações nos pontos do gráfico para determinada reta, considere apenas o seu padrão geral e não os pontos momentâneos onde ocorreu aumento ou diminuição do efluxo de vermelho do Nilo.

Os resultados da safranina e a doxorrubicina não se encontram nas tabelas seguintes, apesar de terem sido feitos os respectivos ensaios, pois os resultados obtidos tinham erros que não conseguimos resolver, mas que podem ser uma consequência da alta fluorescência emitida por ambos os compostos. Nestes casos, os ensaios para todas as estirpes estudadas com ambos os compostos terão de ser repetidos, o que não foi possível fazer para esta dissertação.

Tabela 10 Resumo dos resultados obtidos nos ensaios de fluorimetria em tempo real das estirpes de referência e controle

Compostos		Influência no efluxo de vermelho do Nilo				
		ATCC 25922	AG100	AG100A	AG100 _{TET}	
Detergentes, biocidas e corantes	ACR	PA ₂ SE	PE _{16,8} SE	PE	PA ₈ PE	
	TPP	SE ₃₂ PE	PE	PE	PE ₁₂₈ SE	
Antibióticos	Aminoglicosídeos	GEN	SE	SE	SE _{0,5} PE	PE
	Fenicóis	CHL	PA _{0,5} PE	SE	PE	SE
	Macrólidos	ERY	PA ₃₂ SE	PE	PE	PA
	Penicilinas	OXA	PA	PE	PE	PE
	Tetraciclinas	DOXY	SE	SE _{0,25} PE	PE	PE
TET		SE	PE _{0,5} SE _{0,25} PA	PE	PE _{0,25} SE	
Inibidores de Efluxo	CPZ	SE	PE	PE	PE	
	PAβN	PE	PE	PE	PE	

NOTA: as concentrações relativas a cada variação encontram-se descritas no espaço inferior à linha (em µg/mL).

Legenda: ACR, acriflavina; TPP, brometo de tetrafenilfosfônio; CHL, cloranfenicol; DOXY, doxiciclina; ERY, eritromicina; GEN, gentamicina; OXA, oxacilina; TET, tetraciclina; CPZ, clorpromazina; PAβN, “phe-arg-β-naphthylamide”; SE, sem efeito; PA, promove acumulação; PE, promove o efluxo

Tabela 11 Resumo dos resultados obtidos nos ensaios de fluorimetria em tempo real das estirpes clínicas

Compostos		Influência no efluxo de vermelho do Nilo					
		EC 02-31	EC 08-14	EC 08-15	EC 18-5234	EC 18-528084	
Detergentes, biocidas e corantes	ACR	PE	SE ₃₂ PA	PE ₃₂ SE	PA _{16;4} SE	PE	
	TPP	PA ₈ SE	PA _{64; 32} PE	PE ₂₅₆ PA ₁₂₈ SE	PA _{64; 32} SE	SE	
Antibióticos	Aminoglicosídeos	GEN	PE	SE ₈ PA	PA	PA	PA
	Fenicóis	CHL	PE	PE ₈ SE	PA	PA	PA
	Macrólidos	ERY	PE	PA _{64; 32} PE	PA	PA	PA
	Penicilinas	OXA	PE	PA	PA	PE	PE ₁₂₈ PA
	Tetraciclinas	DOXY	PE	PA	PE	PA	PA
TET		PE	PE ₁ PA	PA	PA ₄ SE _{0,5} PE	PA	
Inibidores de Efluxo	CPZ	PE	PE ₆₄ SE	PE ₆₄ PA ₈ SE	PA _{16; 8} PE	SE ₁₆ PE	
	PAβN	PE	PE ₂₅₆ SE ₁₂₈ PA	PE ₂₅₆ SE ₁₂₈ PA	PE	PE	

NOTA: as concentrações relativas a cada variação encontram-se descritas no espaço inferior à linha (em µg/mL).

Legenda: ACR, acriflavina; TPP, brometo de tetrafenilfosfônio; CHL, cloranfenicol; DOXY, doxiciclina; ERY, eritromicina; GEN, gentamicina; OXA, oxacilina; TET, tetraciclina; CPZ, clorpromazina; PAβN, “phe-arg-β-naphthylamide”; SE, sem efeito; PA, promove acumulação; PE, promove o efluxo

Analisando os resultados das duas tabelas anteriores, por estirpe, temos:

ATCC25922 – todas as concentrações de oxacilina em estudo e uma concentração de acriflavina (2 µg/mL), cloranfenicol (0,5 µg/mL) e eritromicina (32 µg/mL) promoveram a acumulação de vermelho do Nilo.

AG100 – apenas duas concentrações de tetraciclina (1 µg/mL e 0,125 µg/mL) promoveram a acumulação de vermelho do Nilo.

AG100A – em todos os compostos testados houve um aumento do efluxo de vermelho do Nilo o que mostra, novamente, que apesar de o sistema de efluxo AcrAB-TolC ser o principal em *E. coli*, na sua ausência, outras bombas de efluxo tendem a funcionar como mecanismo de efluxo compensatório, sendo os compostos testados também substratos de outras bombas de efluxo (Viveiros *et al.*, 2005).

AG100_{TET} – todas as concentrações em estudo de eritromicina, assim como uma concentração de acriflavina (8 µg/mL) promoveram a acumulação de vermelho do Nilo, sendo que a maioria dos compostos promoveu o efluxo. O aumento de efluxo poderá ser consequência do facto desta estirpe ter vários dos seus sistemas de efluxo sobreexpressos (Viveiros *et al.*, 2005).

EC 02-31 – apenas uma concentração estudada de TPP (8 µg/mL) promoveu a acumulação de vermelho do Nilo nesta estirpe, sendo que a maioria dos compostos promoveu o seu efluxo.

EC 08-14 – todas as concentrações estudadas de oxacilina e doxiciclina promoveram a acumulação de vermelho do Nilo, assim como três concentrações de acriflavina (16 µg/mL, 8 µg/mL e 4 µg/mL), gentamicina (4 µg/mL, 2 µg/mL e 1 µg/mL) e tetraciclina (4 µg/mL, 2 µg/mL e 0,5 µg/mL) e duas de TPP (64 µg/mL e 32 µg/mL), eritromicina (64 µg/mL e 32 µg/mL) e PAβN (64 µg/mL e 32 µg/mL).

EC 08-15 – todas as concentrações estudadas de gentamicina, cloranfenicol, eritromicina, oxacilina e tetraciclina promoveram a acumulação de vermelho do Nilo, assim como duas de PAβN (64 µg/mL e 32 µg/mL) e uma de TPP (128 µg/mL) e clorpromazina (8 µg/mL).

EC 18-5234 – todas as concentrações estudadas de gentamicina, cloranfenicol, eritromicina e doxiciclina promoveram a acumulação de vermelho do Nilo, assim como duas de acriflavina (16 µg/mL e 4 µg/mL), TPP (64 µg/mL e 32 µg/mL) e clorpromazina (16 µg/mL e 8 µg/mL), e uma de tetraciclina (4 µg/mL).

EC 18-528084 – todas as concentrações estudadas de gentamicina, cloranfenicol, eritromicina, doxiciclina e tetraciclina promoveram a acumulação de vermelho do Nilo, assim como três concentrações de oxacilina (256 µg/mL, 64 µg/mL e 32 µg/mL).

Curiosamente ambos os inibidores de efluxo utilizados no estudo foram os compostos que menos promoveram a acumulação de vermelho do Nilo. Sendo o PAβN um conhecido inibidor do sistema de efluxo estudado, este resultado poderá sugerir a existência de uma relação diferencial entre o PAβN e outros substratos que é dependente da bomba de efluxo em causa e do próprio local de ligação do substrato, podendo também a concentração usada ter influenciado o resultado obtido (Pagès e Amaral, 2009). Takatsuka *et al.* (2010) considerou este inibidor de efluxo como um “mixed binder” assim como vermelho do Nilo e a oxacilina; a tetraciclina, doxiciclina e eritromicina como “groove-binders”; e o cloranfenicol como “cave-binders”.

Os resultados obtidos nos isolados clínicos não podem ser explicados apenas pela variação observada no efluxo, não sendo possível a sua comparação com as estirpes de controlo e referência. Nestes casos, como foi mencionado anteriormente, outros mecanismos fisiológicos podem estar na base dos resultados obtidos como, por exemplo, a permeabilidade alterada da membrana.

Os resultados obtidos acima descritos propõem que quando um composto é capaz de interferir na acumulação de vermelho do Nilo, apresenta um nível de competição para a bomba de fluxo, assim, podemos admitir como hipóteses:

- i. Se a acumulação de vermelho do Nilo produzida for a mesma que a do substrato, então, provavelmente, estão a ser efluxados por diferentes bombas de efluxo;
- ii. Se os níveis de acumulação de vermelho do Nilo forem aumentados na

presença de determinado substrato, provavelmente estão a competir pelo mesmo local de ligação na bomba;

- iii. Se os níveis de efluxo de vermelho do Nilo aumentarem, o substrato estará ligado noutra local na bomba, havendo a preferência para efluxar vermelho do Nilo.

4. Considerações Finais

Com este trabalho podemos concluir que:

- (i) o CCCP promove a acumulação de vermelho do Nilo e dos restantes compostos, por inibição da força motriz protónica;
- (ii) a glucose reenergiza as células promovendo assim a ativação das bombas de efluxo;
- (iii) a grande maioria dos compostos teve algum efeito (aumento ou diminuição do efluxo de vermelho do Nilo) dependendo da sua concentração e da estirpe em teste;
- (iv) vermelho do Nilo pode ser usado como fluoróforo na avaliação de competição de substratos de bombas de efluxo em *E. coli*;
- (v) e o método utilizado consegue avaliar a competição entre substratos de bombas de efluxo.

Segundo os nossos resultados, todos os compostos promoveram alguma acumulação de vermelho do Nilo, ainda que dependendo da concentração do composto e da estirpe em estudo. No entanto, a eritromicina foi o composto que em mais estirpes promoveu a acumulação de vermelho do Nilo (6 em 9 estirpes) seguido da tetraciclina (5 e 9 estirpes) ainda que dependendo da sua concentração em ambos os casos. Por outro lado, a clorpromazina e o PA β N foram os compostos que menos promoveram a acumulação (2 em 9 estirpes).

Nikaido (2011) e Bohnert *et al.* (2010) ambos mencionaram a complexidade deste sistema dada a ação do CCCP que, poderá persistir ainda após a energização celular. Assim, apesar dos resultados obtidos por este método serem subjetivos na análise dos gráficos, este permite, pelo menos, dar uma noção da possível interação de substratos do sistema de efluxo AcrAB-TolC com vermelho do Nilo, percebendo desta forma se determinado substrato poderá ter maior ou menor afinidade para com a bomba e de que forma serão efluxados os compostos.

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram-nos perceber melhor como diferentes compostos interagem no sistema de efluxo AcrAB-TolC, dando uma ideia da afinidade dos compostos testados em relação à bomba e da alteração da taxa de efluxo nas várias estirpes estudadas, tendo, por isso, implicações no estudo e caracterização de bombas de efluxo em geral, bem como na descoberta de novos antimicrobianos.

5. Referências Bibliográficas

Abdi, S. N., Ghotaslou, R., Ganbarov, K., Mobed, A., Tanomand, A., Yousefi, M., Asgharzadeh, M., & Kafil, H. S. (2020). *Acinetobacter baumannii* Efflux Pumps and Antibiotic Resistance. *Infection and drug resistance*, 13, 423–434. <https://doi.org/10.2147/IDR.S228089>

Akinpelu, S., Ajayi, A., Smith, S. I., & Adeleye, A. I. (2020). Efflux pump activity, biofilm formation and antibiotic resistance profile of *Klebsiella* spp. isolated from clinical samples at Lagos University Teaching Hospital. *BMC research notes*, 13(1), 258. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-05105-2>

Alav, I., Sutton, J. M., & Rahman, K. M. (2018). Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 73(8), 2003–2020. <https://doi.org/10.1093/jac/dky042>

Amaral, L., Martins, M., & Viveiros, M. (2007). Enhanced killing of intracellular multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by compounds that affect the activity of efflux pumps. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 59(6), 1237–1246. <https://doi.org/10.1093/jac/dk1500>

American Type Culture Collection. (n.d.). *Escherichia coli* (ATCC 25922). Retrieved August 5, 2019, from <https://www.atcc.org/products/25922>

Anbazhagan, P. V., Thavitiki, P. R., Varra, M., Annamalai, L., Putturu, R., Lakkineni, V. R., & Pesingi, P. K. (2019). Evaluation of efflux pump activity of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium isolated from poultry wet markets in India. *Infection and drug resistance*, 12, 1081–1088. <https://doi.org/10.2147/IDR.S185081>

Anes, J., McCusker, M. P., Fanning, S., & Martins, M. (2015). The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology*, 6, 587. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00587>

Baiomy, A. A., Shaker, G. H., & Abbas, H. A. (2020). Sensitizing multi drug

resistant *Staphylococcus aureus* isolated from surgical site infections to antimicrobials by efflux pump inhibitors. *African health sciences*, 20(4), 1632–1645. <https://doi.org/10.4314/ahs.v20i4.16>

Behdad, R., Pargol, M., Mirzaie, A., Karizi, S. Z., Noorbazargan, H., & Akbarzadeh, I. (2020). Efflux pump inhibitory activity of biologically synthesized silver nanoparticles against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Journal of basic microbiology*, 60(6), 494–507. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900712>

Bélangier, L., Garenaux, A., Harel, J., Boulianne, M., Nadeau, E., & Dozois, C. M. (2011). *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS immunology and medical microbiology*, 62(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00797.x>

Bhardwaj, A. K., & Mohanty, P. (2012). Bacterial efflux pumps involved in multidrug resistance and their inhibitors: rejuvenating the antimicrobial chemotherapy. *Recent patents on anti-infective drug discovery*, 7(1), 73–89. <https://doi.org/10.2174/157489112799829710>

Binda, E., Marinelli, F., & Marcone, G. (2014). Old and New Glycopeptide Antibiotics: Action and Resistance. *Antibiotics*, 3(4), 572–594. <https://doi.org/10.3390/antibiotics3040572>

Blair, J. M., & Piddock, L. J. (2016). How to Measure Export via Bacterial Multidrug Resistance Efflux Pumps. *mBio*, 7(4), e00840-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00840-16>

Bohnert, J. A., Karamian, B., & Nikaido, H. (2010). Optimized Nile Red efflux assay of AcrAB-TolC multidrug efflux system shows competition between substrates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(9), 3770–3775. <https://doi.org/10.1128/AAC.00620-10>

Bohnert, J. A., Schuster, S., Kern, W. V., Karcz, T., Olejarz, A., Kaczor, A., Handzlik, J., & Kieć-Kononowicz, K. (2016). Novel Piperazine Arylideneimidazolones Inhibit the AcrAB-TolC Pump in *Escherichia coli* and Simultaneously Act as Fluorescent

Membrane Probes in a Combined Real-Time Influx and Efflux Assay. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(4), 1974–1983. <https://doi.org/10.1128/AAC.01995-15>

Bremner, J. B. (2007). Some approaches to new antibacterial agents. *Pure and Applied Chemistry*, 79 (12), 2143-2153.

Candan, E. D., & Aksöz, N. (2017). *Escherichia coli*: Characteristics of carbapenem resistance and virulence factors. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 60. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2017160416>

Coelho, T., Machado, D., Couto, I., Maschmann, R., Ramos, D., Groll, A. von, Rossetti, M. L., Silva, P. A., & Viveiros, M. (2015). Enhancement of antibiotic activity by efflux inhibitors against multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil. *Frontiers in Microbiology*, 6(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00330>

Costa, S. S., Falcão, C., Viveiros, M., Machado, D., Martins, M., Melo-Cristino, J., Amaral, L., & Couto, I. (2011). Exploring the contribution of efflux on the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *BMC microbiology*, 11, 241. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-241>

Costa, S. S., Junqueira, E., Palma, C., Viveiros, M., Melo-Cristino, J., Amaral, L., & Couto, I. (2013). Resistance to Antimicrobials Mediated by Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 2(1), 83–99. <https://doi.org/10.3390/antibiotics2010083>

Cunrath, O., Meinel, D. M., Maturana, P., Fanous, J., Buyck, J. M., saint Auguste, P., Seth-Smith, H. M. B., Körner, J., Dehio, C., Trebosc, V., Kemmer, C., Neher, R., Egli, A., & Bumann, D. (2019). Quantitative contribution of efflux to multi-drug resistance of clinical *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* strains. *EBioMedicine*, 41, 479–487. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.02.061>

Delmar, J. A., & Yu, E. W. (2016). The AbgT family: A novel class of antimetabolite transporters. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 25(2), 322–337. <https://doi.org/10.1002/pro.2820>

- Deusenbery, C., Wang, Y., & Shukla, A. (2021). Recent Innovations in Bacterial Infection Detection and Treatment. *ACS infectious diseases*, 7(4), 695–720. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00890>
- Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., van Veen, H. W., Pos, K. M., Piddock, L., & Luisi, B. F. (2018). Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nature reviews. Microbiology*, 16(9), 523–539. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0048-6>
- 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), 923–929. <https://doi.org/10.1128/AAC.01048-06>
- Elkins, C. A., & Nikaido, H. (2002). Substrate specificity of the RND-type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* is determined predominantly by two large periplasmic loops. *Journal of bacteriology*, 184(23), 6490–6498. <https://doi.org/10.1128/JB.184.23.6490-6499.2002>
- Freischem, S., Grimm, I., López-Pérez, A., Willbold, D., Klenke, B., Vuong, C., Dingley, A. J., & Weiergräber, O. H. (2021). Interaction Mode of the Novel Monobactam AIC499 Targeting Penicillin Binding Protein 3 of Gram-Negative Bacteria. *Biomolecules*, 11(7), 1057. <https://doi.org/10.3390/biom11071057>
- Grimsey, E. M., Fais, C., Marshall, R. L., Ricci, V., Ciusa, M. L., Stone, J. W., Ivens, A., Mallocci, G., Ruggerone, P., Vargiu, A. V., & Piddock, L. (2020). Chlorpromazine and Amitriptyline Are Substrates and Inhibitors of the AcrB Multidrug Efflux Pump. *mBio*, 11(3), e00465-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00465-20>
- Hernando-Amado, S., Blanco, P., Alcalde-Rico, M., Corona, F., Reales-Calderón, J. A., Sánchez, M. B., & Martínez, J. L. (2016). Multidrug efflux pumps as main players in intrinsic and acquired resistance to antimicrobials. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 28, 13–27. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.06.007>
- Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present

and future. *Current opinion in microbiology*, 51, 72–80.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>

Kobylka, J., Kuth, M. S., Müller, R. T., Geertsma, E. R., & Pos, K. M. (2020). AcrB: a mean, keen, drug efflux machine. In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1459, Issue 1, pp. 38–68). Blackwell Publishing Inc.
<https://doi.org/10.1111/nyas.14239>

Kornelsen, V., & Kumar, A. (2021). Update on Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 65(7), e0051421.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00514-21>

Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., & Hughes, C. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature*, 405(6789), 914–919. <https://doi.org/10.1038/35016007>

Krishan, A., & Hamelik, R. M. (2005). Flow cytometric monitoring of fluorescent drug retention and efflux. *Methods in molecular medicine*, 111, 149–166.
<https://doi.org/10.1385/1-59259-889-7:149>

Laudy, A. E., Mrowka, A., Krajewska, J., & Tyski, S. (2016). The Influence of Efflux Pump Inhibitors on the Activity of Non-Antibiotic NSAIDS against Gram-Negative Rods. *PloS one*, 11(1), e0147131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147131>

Li, W., Sharma, M., & Kaur, P. (2014). The DrrAB efflux system of *Streptomyces peucetius* is a multidrug transporter of broad substrate specificity. *The Journal of biological chemistry*, 289(18), 12633–12646. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.536136>

Lu, W. J., Lin, H. J., Hsu, P. H., & Lin, H. V. (2020). Determination of Drug Efflux Pump Efficiency in Drug-Resistant Bacteria Using MALDI-TOF MS. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 9(10), 639. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100639>

Maillard J. Y. (2018). Resistance of Bacteria to Biocides. *Microbiology spectrum*, 6(2), 10.1128/microbiolspec.ARBA-0006-2017.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0006-2017>

- Mainil J. (2013). *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary immunology and immunopathology*, 152(1-2), 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.09.032>
- Markley, J. L., & Wencewicz, T. A. (2018). Tetracycline-Inactivating Enzymes. *Frontiers in microbiology*, 9, 1058. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01058>
- Marshall, R. L., & Bavro, V. N. (2020). Mutations in the TolC Periplasmic Domain Affect Substrate Specificity of the AcrAB-TolC Pump. *Frontiers in molecular biosciences*, 7, 166. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00166>
- Martins, A., Hunyadi, A., & Amaral, L. (2013). Mechanisms of resistance in bacteria: an evolutionary approach. *The open microbiology journal*, 7, 53–58. <https://doi.org/10.2174/1874285801307010053>
- Martins, M., Viveiros, M., Couto, I., Costa, S. S., Pacheco, T., Fanning, S., Pagès, J. M., & Amaral, L. (2011). Identification of efflux pump-mediated multidrug-resistant bacteria by the ethidium bromide-agar cartwheel method. *In vivo (Athens, Greece)*, 25(2), 171–178.
- Minarini, L. A., & Darini, A. L. (2012). Mutations in the quinolone resistance-determining regions of *gyrA* and *parC* in Enterobacteriaceae isolates from Brazil. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 43(4), 1309–1314. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220120004000010>
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Matsumoto, T., & Yamaguchi, A. (2006). Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature*, 443(7108), 173–179. <https://doi.org/10.1038/nature05076>
- Nikaido H. (2011). Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, 77, 1–60. <https://doi.org/10.1002/9780470920541.ch1>
- Nishino, K., Nikaido, E., & Yamaguchi, A. (2009). Regulation and physiological function of multidrug efflux pumps in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Biochimica et*

biophysica acta, 1794(5), 834–843. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.02.002>

Pagès, J. M., & Amaral, L. (2009). Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochimica et biophysica acta*, 1794(5), 826–833. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.12.011>

Paitan, Y. (2018). Current trends in antimicrobial resistance of *Escherichia coli*. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 416, pp. 181–211). Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/82_2018_110

Pasqua, M., Grossi, M., Zennaro, A., Fanelli, G., Micheli, G., Barras, F., Colonna, B., & Prosseda, G. (2019). The Varied Role of Efflux Pumps of the MFS Family in the Interplay of Bacteria with Animal and Plant Cells. *Microorganisms*, 7(9), 285. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090285>

Poirel, L., Madec, J. Y., Lupo, A., Schink, A. K., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology spectrum*, 6(4), [10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017>

Purssell, E. (2020). Antimicrobials. In *Understanding Pharmacology in Nursing Practice* (pp. 147–165). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-32004-1_6

Roseiro I. (2020). Impacto da actividade de efluxo na resistência aos β -lactâmicos em estirpes clínicas de *Escherichia coli* produtoras e não produtoras de β -lactamases. Relatório de Projeto em Biologia. Escola de Psicologia e Ciências da Vida. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Silva M. (2018). A contribuição do efluxo na resistência aos β -lactâmicos em isolados clínicos de *Escherichia coli*. Tese de Mestrado em Microbiologia Médica. Unidade de Microbiologia Médica. Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Universidade Nova de Lisboa.

Sun, J., Deng, Z., & Yan, A. (2014). Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and biophysical research*

communications, 453(2), 254–267. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.090>

Takatsuka, Y., Chen, C., & Nikaido, H. (2010). Mechanism of recognition of compounds of diverse structures by the multidrug efflux pump AcrB of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(15), 6559–6565. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001460107>

Teelucksingh, T., Thompson, L. K., & Cox, G. (2020). The Evolutionary Conservation of *Escherichia coli* Drug Efflux Pumps Supports Physiological Functions. *Journal of bacteriology*, 202(22), e00367-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00367-20>

Viveiros, M., Dupont, M., Rodrigues, L., Couto, I., Davin-Regli, A., Martins, M., Pagès, J. M., & Amaral, L. (2007). Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of *E. coli*. *PloS one*, 2(4), e365. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000365>

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), 3578–3582. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3578-3582.2005>

Viveiros, M., Martins, A., Paixão, L., Rodrigues, L., Martins, M., Couto, I., Fähnrich, 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), 458–462. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.12.015>

World Health Organization. (2021). Antimicrobial resistance. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

Zechini, B., & Versace, I. (2009). Inhibitors of multidrug resistant efflux systems in bacteria. *Recent patents on anti-infective drug discovery*, 4(1), 37–50. <https://doi.org/10.2174/157489109787236256>

Zhanel, G. G., Wiebe, R., Dilay, L., Thomson, K., Rubinstein, E., Hoban, D. J.,

Noreddin, A. M., & Karlowky, J. A. (2007). Comparative review of the carbapenems. *Drugs*, 67(7), 1027–1052. <https://doi.org/10.2165/00003495-200767070-00006>

Zhang, C. Z., Chang, M. X., Yang, L., Liu, Y. Y., Chen, P. X., & Jiang, H. X. (2018). Upregulation of AcrEF in Quinolone Resistance Development in *Escherichia coli* When AcrAB-TolC Function Is Impaired. *Microbial drug resistance* (Larchmont, N.Y.), 24(1), 18–23. <https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0207>