



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

**Determinação da actividade de efluxo de Hoechst 33258  
em *Escherichia coli***

**Maria João de Resende Theron**

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

**OUTUBRO, 2018**



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

**Determinação da actividade de efluxo de Hoechst 33258 em**  
***Escherichia coli***

**Autor:** Maria João de Resende Theron

**Orientador:** Doutora Diana Machado

**Co-orientador:** Professor Doutor Miguel Viveiros

Laboratório onde o trabalho experimental foi desenvolvido:

**Unidade de Ensino e Investigação de Microbiologia Médica**

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

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



Trabalho parcialmente financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), Portugal, através do financiamento para o Centro de investigação Global Health and Tropical Medicine (GHTM) Ref<sup>o</sup> UID/Multi/04413/2013 e bolsa de Pós-Doutoramento Ref<sup>o</sup> SFRH/BPD/100688/2014 (DM).

**OUTUBRO, 2018**

**A presente Dissertação não foi redigida segundo o novo Acordo Ortográfico da  
Língua Portuguesa, por opção da autora**

## **AGRADECIMENTOS**

Queria aproveitar esta oportunidade para agradecer às pessoas que mais contribuíram e tornaram possível a concretização deste trabalho.

Agradeço ao meu Orientador, Professor Doutor Miguel Viveiros, Director do Grupo de Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, pela sua orientação e sabedoria demonstrada neste trabalho.

Agradeço ainda à Doutora Diana Machado, minha orientadora, pela orientação dada, por toda a energia despendida comigo, por toda a paciência, dedicação e apoio com que sempre me presenteou.

À Unidade de Microbiologia Médica, Grupo de Micobactérias, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, estou muito grata pelas condições que me foram oferecidas para a elaboração deste trabalho.

Agradeço à minha família, em especial à minha mãe e avó que sempre me apoiaram e sem elas toda a minha formação não seria possível.

Aos meus irmãos agradeço todo o apoio, paciência e carinho que mostraram ao longo deste trabalho.

A todos dedico este trabalho, pois sem eles não teria sido possível.

A todos,

Muito Obrigada!

## RESUMO

Para a detecção da actividade de efluxo em bactérias são normalmente usadas moléculas fluorescentes, que são substratos de bombas de efluxo e cuja concentração intracelular pode ser facilmente detectada por fluorescência. O brometo de etídio é o fluoróforo e substrato de efluxo de eleição para a caracterização da actividade de efluxo em bactérias e serviu de base para o desenvolvimento e optimização do método fluorométrico semiautomático na Unidade de Microbiologia Médica, IHMT/NOVA, para utilização no fluorímetro e termociclador em tempo-real Rotor-Gene 3000.

Neste trabalho, adaptamos o método fluorométrico semiautomático em placa de 96 poços para o uso com o fluoróforo Hoechst 33258, um corante menos tóxico que o brometo de etídio, de modo a avaliar a sua eventual aplicabilidade para a caracterização da actividade de efluxo em bactérias, usando duas estirpes de referência de *E. coli* que diferem entre si na actividade do seu principal sistema de efluxo, o AcrAB-TolC: a estirpe AG100, com o sistema de efluxo AcrAB-TolC funcional e a estirpe AG100A, com o sistema AcrAB-TolC inactivo. Concomitantemente foi avaliado o efeito sinérgico de compostos inibidores de efluxo na resistência intrínseca aos antibióticos, biocidas e corantes nestas duas estirpes.

Os resultados obtidos demonstram que (i) o Hoechst 33258 é um substrato da bomba de efluxo AcrAB-TolC; (ii) que a tioridazina e a clorpromazina potenciam a acumulação de Hoechst 33258 a níveis similares ao das células cuja a actividade de efluxo foi inactivada; (iii) é possível diferenciar estirpes de *E. coli* com diferentes níveis de acumulação de Hoechst 33258, nomeadamente, a estirpe AG100 com o sistema de efluxo AcrAB activo e funcional, da estirpe isogénica AG100A, que apresenta o sistema de efluxo AcrAB-TolC inactivado; (iv) o Hoechst 33258 pode ser usado para avaliar a actividade de efluxo em *E. coli*; (v) o Hoechst 33258 pode ser considerado uma alternativa ao brometo de etídio e (vi) o método fluorométrico semiautomático em placa de 96 poços usando fluorímetro Synergy HT pode ser usado para detectar do transporte de Hoechst 33258 em *E. coli*.

A aplicação do método a novas moléculas fluorescentes permitirá aprofundar o conhecimento sobre a actividade dos sistemas de efluxo bem como identificar novos substratos e novos inibidores numa diversidade de bactérias.

### Palavras-chave

Bombas de efluxo, *E. coli*, Hoechst 33258, Synergy HT, fluorometria

## ABSTRACT

For the detection of efflux activity in bacteria it is commonly used fluorescent molecules, which are efflux pump substrates and whose intracellular concentration can be easily detected by fluorescence. Ethidium bromide is the fluorophore and the substrate of choice for the characterization of efflux activity and was the basis for the development and optimization of the semiautomated fluorometric method at the Unit of Medical Microbiology, IHMT/NOVA, for use within the fluorimeter and real-time thermocycler Rotor-Gene 3000.

In this work, we adapted the semiautomated fluorometric method in a 96-well plate format for the testing of the fluorophore Hoechst 33258, a less toxic compound than ethidium bromide, to study its possible applicability for the characterization of efflux activity in bacteria. We used two reference strains of *E. coli* that differ from each other in the activity of its main efflux system, the AcrAB-TolC efflux system: the AG100 strain, with a functional AcrAB-TolC efflux system and the AG100A strain with an inactive AcrAB-TolC efflux system. Simultaneously, it was evaluated the synergistic effect of efflux inhibitors in the resistance to antibiotics, biocides and dyes in these two strains.

The results obtained demonstrate that (i) the Hoechst 33258 is a substrate of the AcrAB-TolC efflux pump; (ii) thioridazine and chlorpromazine can enhance the accumulation of Hoechst 33258 at levels similar to the cells whose efflux activity was inactivated; (iii) it is possible to differentiate *E. coli* strains with different levels of accumulation of Hoechst 33258, in particular, the strain AG100 with the AcrAB-TolC efflux system active and functional and the AG100A isogenic strain, with the AcrAB-TolC efflux system efflux inactivated; (iv) the Hoechst 33258 can be used to evaluate the efflux activity in *E. coli*; (v) the Hoechst 33258 can be considered an alternative to ethidium bromide; and (vi) the semiautomated fluorometric method in a 96-well plate format using the Synergy HT can be used to detect the transport of Hoechst 33258 in *E. coli*.

The application of the method to new fluorescent molecules will allow to increase the knowledge about the activity of efflux systems as well as identify new substrates and inhibitors in a variety of bacterial species.

### Keywords

Efflux pumps, *E. coli*, Hoechst 33258, Synergy HT, fluorometry

# ÍNDICE GERAL

**Agradecimentos**

**Resumo**

**Abstract**

**Índice Geral**

**Índice de Figuras**

**Índice de Tabelas**

**Lista de Abreviaturas**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1 Mecanismos de acção e resistência aos antibióticos em bactérias Gram-negativas | 1         |
| 1.2. Resistência intrínseca vs resistência adquirida                               | 1         |
| 1.3. Resistência mediada por efluxo em bactérias Gram-negativas                    | 2         |
| 1.3.1. Superfamília “ATP Binding Cassette” (ABC)                                   | 3         |
| 1.3.2. Superfamília “Major Facilitator Superfamily” (MFS)                          | 3         |
| 1.3.3. Família “Small Multidrug Resistance” (SMR)                                  | 4         |
| 1.3.4. Superfamília “Resistance Nodulation and Cell Division” (RND)                | 5         |
| 1.3.5. Família “Multidrug and Toxic Compound Extrusion” (MATE)                     | 5         |
| 1.4. Metodologias para detecção de actividade de efluxo em bactérias               | 6         |
| 1.5. Substratos usados para avaliação da actividade de efluxo em bactérias         | 8         |
| 1.6. <i>Escherichia coli</i>   | 11        |
| 1.6.1. Características gerais  | 11        |
| 1.6.2. <i>Escherichia coli</i> como modelo experimental                            | 12        |
| 1.7. Objectivos desta Dissertação  | 13        |
| <b>2. Material e Métodos</b>   | <b>14</b> |
| 2.1. Material  | 14        |
| 2.1.1. Estirpes bacterianas  | 14        |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.1.2. Meios de cultura e soluções  | 14        |
| 2.2. Métodos  | 16        |
| 2.2.1. Crescimento e manutenção das estirpes bacterianas  | 16        |
| 2.2.2. Determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMI) pelo método de diluição em microplaca de 96 poços para os antibióticos, detergentes, corantes e inibidores de efluxo | 16        |
| 2.2.3. Determinação de CMIs pelo método de diluição em microplaca de 96 poços para antibióticos, detergentes, corantes na presença de inibidores de efluxo                          | 19        |
| 2.2.4. Avaliação da viabilidade celular na presença de Hoechst 33258 através do método da rezasurina  | 20        |
| 2.2.5. Método fluorométrico semiautomático usando o fluorímetro Synergy HT Microplate Reader  | 21        |
| 2.2.5.1 Determinação da concentração de equilíbrio  | 21        |
| 2.2.5.2. Ensaio de acumulação de Hoechst 33258 na presença de inibidores de efluxo  | 24        |
| <b>3. Resultados e Discussão</b>  | <b>26</b> |
| 3.1. Caracterização fenotípica das estirpes utilizadas para a optimização do método para determinação e estudo da actividade de efluxo de Hoechst 33258                             | 27        |
| 3.2. Determinação das concentrações mínimas inibitórias de Hoechst 33258, antibióticos, biocidas e corantes na presença de inibidores de efluxo                                     | 29        |
| 3.3. Determinação de actividade de efluxo de Hoechst 33258 em <i>E. coli</i> por fluorometria em tempo-real   | 35        |
| 3.3.1. Determinação da concentração de equilíbrio de Hoechst 33258  | 36        |
| 3.3.2. Avaliação do efeito de Hoechst 33258 na viabilidade celular  | 39        |
| 3.3.3. Determinação dos níveis de acumulação de Hoechst 33258 na presença de inibidores de efluxo   | 40        |
| <b>4. Conclusões</b>  | <b>43</b> |
| <b>5. Referências bibliográficas</b>  | <b>44</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Representação esquemática de um ensaio de acumulação e efluxo de brometo de etídio em <i>E. coli</i> AG100.  | 8  |
| <b>Figura 2.</b> Fluoróforos frequentemente usados para avaliação da actividade de efluxo em bactérias.   | 9  |
| <b>Figura 3.</b> Esquema representativo de uma placa de 96 poços para a determinação das CMI's.   | 19 |
| <b>Figura 4.</b> Esquema representativo da preparação da placa de 96 poços para a avaliação da viabilidade celular na presença de Hoechst 33258.  | 20 |
| <b>Figura 5.</b> Esquema representativo da preparação da placa de fluorometria para os ensaios de determinação da concentração óptima de células a usar nos ensaios de acumulação de Hoechst 33258.   | 22 |
| <b>Figura 6.</b> Esquema representativo da preparação da de fluorometria para os ensaios de determinação de equilíbrio de Hoechst 33258.  | 23 |
| <b>Figura 7.</b> Esquema representativo da preparação da placa de fluorometria para os ensaios de acumulação de Hoechst 33258 na presença de inibidores de efluxo.  | 24 |
| <b>Figura 8.</b> Efeito de diferentes concentrações <i>E. coli</i> AG100 inactivada pelo calor na acumulação de Hoechst 33258 a 2,5 µM.   | 37 |
| <b>Figura 9.</b> Gráficos representativos dos ensaios de acumulação de Hoechst 33258 na presença de concentrações crescentes de Hoechst 33258, na ausência e na presença de glucose a 0,4%, para a estirpe <i>E. coli</i> AG100 (A) e AG100A (B) usando o Synergy HT Microplate Reader. | 38 |
| <b>Figura 10.</b> Determinação da viabilidade celular das estirpes <i>E. coli</i> AG100 e AG100A, na presença de Hoechst 33258, com o indicador de viabilidade resazurina.  | 39 |
| <b>Figura 11.</b> Gráficos representativos dos ensaios de acumulação de Hoechst 33258 na presença e ausência de inibidores de efluxo, sem e com glucose a 0,4%, para a estirpe <i>E. coli</i> AG100 (A) e AG100A (B), usando o Synergy HT Microplate Reader.                            | 41 |

## ÍNDICE DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1.</b> Composição dos meios de cultura.  | 14 |
| <b>Tabela 2.</b> Composição e modo de preparação de soluções utilizadas.   | 15 |
| <b>Tabela 3.</b> Composição e modo de preparação das soluções de inibidores de efluxo.   | 15 |
| <b>Tabela 4.</b> Composição e modo de preparação das soluções de corantes e biocidas utilizados.   | 15 |
| <b>Tabela 5.</b> Composição e modo de preparação das soluções de antibióticos utilizados.  | 16 |
| <b>Tabela 6.</b> Gama de concentrações dos compostos utilizados para determinação das CMIs.  | 17 |
| <b>Tabela 7.</b> Valores de CMIs de antibióticos, biocidas e corantes para as estirpes <i>E. coli</i> AG100 e AG100A.                            | 27 |
| <b>Tabela 8.</b> Valores obtidos de CMI de inibidores de efluxo para as estirpes de <i>E. coli</i> AG100 e AG100A.                               | 28 |
| <b>Tabela 9.</b> Valores de CMI obtidos de antibióticos na presença dos inibidores de sistemas de efluxo para as estirpes em estudo.             | 29 |
| <b>Tabela 10.</b> Valores de CMI obtidos de biocidas e corantes na presença dos inibidores de efluxo para as duas estirpes em estudo.            | 32 |
| <b>Tabela 11.</b> Valores de fluorescência final relativa para os inibidores de efluxo em estudo para as estirpes <i>E. coli</i> AG100 e AG100A. | 42 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|               |  |
|---------------|--|
| <b>ABC</b>    | Do inglês “(ATP)-Binding Cassette”                           |
| <b>ACR</b>    | Acriflavina  |
| <b>AMEs</b>   | Do inglês “Antibiotic Modifying Enzymes”                     |
| <b>AMP</b>    | Ampicilina   |
| <b>APEC</b>   | Do inglês “Avian pathogenic <i>E. coli</i> ”                 |
| <b>ATP</b>    | Adenosina trifosfato, do inglês “Adenosine 5'-triphosphate”  |
| <b>ATPase</b> | Adenosina trifosfatase                                       |
| <b>BAC</b>    | Cloreto de benzalcônio                                       |
| <b>CAN</b>    | Canamicina   |
| <b>CCCP</b>   | Carbonil cianeto <i>m</i> -clorofenilhidrazona               |
| <b>CHX</b>    | Clorexidina  |
| <b>CIP</b>    | Ciprofloxacina   |
| <b>CMI</b>    | Concentração mínima inibitória                               |
| <b>CPZ</b>    | Clorpromazina  |
| <b>CTAB</b>   | Brometo de hexadeciltrimetilamônio                           |
| <b>DAEC</b>   | Do inglês “Diffusely adherent <i>E. coli</i> ”               |
| <b>DMSO</b>   | Dimetilsulfóxido   |
| <b>DNA</b>    | Ácido desoxirribonucleico, do inglês “Deoxyribonucleic acid” |
| <b>EAEC</b>   | Do inglês “Enteroggregative <i>E. coli</i> ”                 |
| <b>EHEC</b>   | Do inglês “Enterohemorrhagic <i>E. coli</i> ”                |
| <b>EIEC</b>   | Do inglês “Enteroinvasive <i>E. coli</i> ”                   |
| <b>EPEC</b>   | Do inglês “Enteropathogenic <i>E. coli</i> ”                 |
| <b>ERI</b>    | Eritromicina   |
| <b>EtBr</b>   | Brometo de etídio, do inglês “Ethidium bromide”              |
| <b>ETEC</b>   | Do inglês “Enterotoxic <i>E. coli</i> ”                      |
| <b>ExPEC</b>  | Do inglês “Extraintestinal pathogenic <i>E. coli</i> ”       |
| <b>FM</b>     | Do inglês “Modulation factor”                                |
| <b>FMP</b>    | Força motriz protônica                                       |
| <b>GEN</b>    | Gentamicina  |
| <b>HCl</b>    | Ácido clorídrico   |

|              |   |
|--------------|---|
| <b>HPLC</b>  | Do inglês “High performance liquid chromatography”  |
| <b>LA</b>    | Do inglês “Luria Bertani agar”                      |
| <b>LB</b>    | Do inglês “Luria Bertani broth”                     |
| <b>LC-MS</b> | Do inglês “Liquid chromatography-mass spectrometry” |
| <b>MATE</b>  | Do inglês “Multidrug and toxic compound extrusion”  |
| <b>MDR</b>   | Do inglês “Multidrug resistance”                    |
| <b>MFS</b>   | Do inglês "Major facilitator superfamily"           |
| <b>MFP</b>   | Do inglês "Membrane fusion protein"                 |
| <b>MHB</b>   | Do inglês “Muller-Hinton broth”                     |
| <b>MNEC</b>  | Do inglês “Neonatal meningitis <i>E. coli</i> ”     |
| <b>NA</b>    | Ácido nalidíxico                                    |
| <b>NBD</b>   | Do inglês "Nucleotide-binding domains"              |
| <b>NMP</b>   | 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine                     |
| <b>OMP</b>   | Do inglês “Outer membrane protein”                  |
| <b>OXA</b>   | Oxacilina   |
| <b>PAβN</b>  | Phe-arg-β-naphthylamide                             |
| <b>PBS</b>   | Do inglês “Phosphate buffered saline”               |
| <b>RNA</b>   | Ácido ribonucleico, do inglês “Ribonucleic acid”    |
| <b>RND</b>   | Do inglês “Resistance-nodulation and cell division” |
| <b>SAF</b>   | Safranina   |
| <b>SMR</b>   | Do inglês “Small multidrug resistance”              |
| <b>TET</b>   | Tetraciclina  |
| <b>TMDs</b>  | Do inglês “Transmembrane domains”                   |
| <b>TMS</b>   | Do inglês “Transmembrane segments”                  |
| <b>TPP</b>   | Brometo de tetrafenilfosfônio                       |
| <b>TZ</b>    | Tioridazina   |
| <b>UPEC</b>  | Do inglês “Uropathogenic <i>E. coli</i> ”           |

## **1. Introdução**

### **1.1. Mecanismos de acção e resistência aos antibióticos em bactérias Gram-negativas**

Os antibióticos são substâncias que podem ser naturais, i.e, produzidos por um determinado organismo, ou podem ser produzidos através de síntese química (Walsh, 2000). São substâncias que interferem com processos ou estruturas essenciais ao crescimento e sobrevivência de outros organismos (Walsh, 2000). Os antibióticos podem ser bactericidas, quando eliminam as bactérias a uma determinada concentração e num determinado período de tempo, ou bacteriostáticos se apenas inibirem o seu crescimento sem alterar a sua viabilidade (Duarte, 2014). Relativamente ao seu espectro de acção, estes podem ser de largo espectro, apresentando actividade em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, ou de espectro reduzido, actuando apenas num dos grupos de bactérias (Duarte, 2014).

Os principais mecanismos de acção dos antibióticos são (i) inibição da síntese da parede celular (p.e.  $\beta$ -lactâmicos); (ii) inibição da síntese proteica (p.e. aminoglicosídeos e tetraciclínas); (iii) inibição da síntese de ácidos nucleicos (p.e. rifampicina e fluoroquinolonas) e biossíntese de nucleótidos (p.e. sulfonamidas e o trimetoprim); e (iv) inibição da membrana celular (p.e. polimixinas) (Duarte, 2014a).

### **1.2. Resistência intrínseca vs resistência adquirida**

A resistência aos antibióticos pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca ocorre como resultado de processos fenotípicos, sem que seja necessária a aquisição de informação genética complementar. A resistência intrínseca pode ocorrer em consequência da (i) incapacidade do antibiótico em atingir alvo, que pode ser devido tanto à reduzida impermeabilidade da parede celular inerente à espécie, quer devido a sobreexpressão de sistemas de efluxo; (ii) ausência do alvo do antimicrobiano; (iii) competição com outras moléculas; e (iv) presença de mecanismos capazes de destruir/inactivar o antibiótico (Cox e Wright, 2013; Olivares *et al.*, 2013). A resistência adquirida ocorre quando as bactérias adquirem resistência a um agente antimicrobiano em consequência de (i) aquisição de mutações nos genes alvo dos antibióticos (mutações pontuais, deleções, inversões, inserções, entre outros); (ii) aquisição de genes de resistência por transferência horizontal (p.e genes que codificam  $\beta$ -lactamases); (iii)

produção de enzimas modificadoras do antibiótico (AMEs, do inglês “antibiotic modifying enzymes”); (iv) inativação do antibiótico (p.e.  $\beta$ -lactamases); (v) alterações ao nível das vias metabólicas, (vi) alteração da regulação das porinas e (vii) sistemas de efluxo activos (Munita e Arias, 2016)

### **1.3. Resistência mediada por efluxo em bactérias Gram-negativas**

Actualmente está amplamente demonstrado que o efluxo de compostos antimicrobianos mediado por bombas de efluxo confere resistência clínica relevante, podendo promover o desenvolvimento de fenótipos de multirresistência (MDR, do inglês “multidrug resistance”) em diversas espécies bacterianas (Li *et al.*, 2016). É hoje aceite que a expressão constitutiva ou induzida de bombas de efluxo contribui de modo significativo tanto para a resistência intrínseca como para a resistência adquirida em bactérias, devido à diversidade de substratos que reconhecem (Munita e Arias, 2016). Por serem capazes de reconhecer e expelir diversos substratos, são responsáveis pelo estabelecimento de fenótipos MDR em isolados clínicos, tendo por isso uma elevada relevância clínica. Os sistemas de efluxo são responsáveis por um baixo a moderado nível de resistência contrastando com a resistência de alto nível causada pela presença de mutações nos genes que codificam os alvos dos antibióticos (Baquero, 2001). No entanto, a sobrepressão de sistemas de efluxo pode resultar numa diminuição dos níveis intracelulares de compostos antimicrobianos, permitindo a sobrevivência de uma subpopulação bacteriana até que sejam seleccionados mutantes com alterações nos genes responsáveis pela resistência e seu estabelecimento na população determinando assim níveis de resistência clinicamente significativos (Martinez e Baquero, 2000; Webber e Piddock, 2003). Por outro lado, apesar de não serem responsáveis pelos altos níveis de resistência, as bombas de efluxo podem também actuar de modo sinérgico com outros mecanismos de resistência, p.e., presença de mutações em genes de resistência, auxiliando na manutenção de níveis elevados de resistência (Machado *et al.*, 2017a).

As bombas de efluxo são proteínas de membrana que estão envolvidas no transporte de substâncias nocivas para a célula, encontrando-se tanto em células eucariotas como procariotas (Webber e Piddock, 2003). Podem-se agrupar em cinco superfamílias ou famílias, de acordo com a sua estrutura e fontes de energia: (i) superfamília “adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette” (ABC); (ii) família “small

multidrug resistance” (SMR); (iii) família “multidrug and toxic compound extrusion” (MATE); (iv) superfamília “resistance-nodulation and cell division” (RND); e (v) “major facilitator superfamily” (MFS) (Pidcock, 2006). As bombas de efluxo podem ser específicas para um substrato ou podem ainda transportar uma variedade de compostos de estruturas diferentes, na qual estão incluídos antibióticos de múltiplas classes (Webber e Pidcock, 2003; Pidcock, 2006).

Os transportadores primários (transportadores ABC) utilizam a energia proveniente da hidrólise do ATP para o transporte de substratos. Os transportadores secundários são dependentes do gradiente protónico ou força motriz protónica (FMP). Dentro deste grupo encontram-se os transportadores MFS, SMR, RND e MATE (Putman *et al.*, 2000; Pidcock, 2006; Li *et al.*, 2009).

### **1.3.1. Superfamília “ATP Binding Cassette” (ABC)**

Os transportadores da superfamília ABC existem tanto em células eucariotas como em procariotas (Linton e Higgins, 1998). São transportadores primários que utilizam a energia proveniente da hidrólise do ATP para o influxo e efluxo de vários substratos incluindo açúcares, aminoácidos, íões, antibióticos, proteínas e polissacarídeos, entre outros (Pidcock, 2006). Estruturalmente, são complexos multi-proteicos constituídos por proteínas integrais de membrana associadas a proteínas citoplasmáticas com actividade ATPase (Quentin e Fichant, 2000; Rees *et al.*, 2009). Possuem quatro domínios de ligação: dois domínios de ligação a nucleótidos (NBDs, do inglês “nucleotide-binding domains”) e dois domínios de ligação transmembranares (TMDs, “transmembrane domains”) (Wilkens, 2015).

Os exemplos mais bem estudados incluem a bomba de efluxo LmrA de *Lactococcus lactis*, Msr(A) de *Staphylococcus* spp., EfrAB de *Enterococcus faecalis*. Em *E. coli* existem aproximadamente 80 transportadores ABC (Linton e Higgins, 1998). Entre estes, o sistema de efluxo MacAB é o transportador mais bem estudado e tem sido associado à resistência aos macrólidos (Li e Nikaido, 2016).

### **1.3.2. Superfamília “Major Facilitator Superfamily” (MFS)**

Os transportadores MFS estão presentes de forma ubíqua em células eucariotas e procariotas e encontram-se envolvidos em processos de simporte, antiporte e uniporte de

diversos substratos (Putman *et al.*, 2000). Podem ser codificados no cromossoma ou em plasmídeos e estão envolvidos na resistência a diversos compostos antimicrobianos (Li e Nikaido, 2016). Estruturalmente, estas proteínas são constituídas por 400 a 600 resíduos de aminoácidos e encontram-se divididas em dois grupos consoante o número de segmentos transmembranares (TMS, do inglês “transmembrane segments”) que possuem: 12 ou 14 (Putman *et al.*, 2000; Saier e Paulsen, 2001). Possuem uma gama variada de substratos incluindo iões, açúcares, aminoácidos, nucleósidos, péptidos, metabolitos do ciclo de Krebs e compostos antimicrobianos, entre outros (Li e Nikaido, 2016). As bombas de efluxo MFS podem ser multicomponentes quando associadas a uma proteína de membrana externa como, p.e., a proteína de membrana externa (OMP, do inglês “outer membrane protein”) TolC, ou unicomponente. Estas últimas fazem a extrusão dos substratos para o periplasma sendo estes expulsos para o exterior da célula por intermédio de transportadores RND (Li e Nikaido, 2016).

Dentro desta família encontram-se a bomba de efluxo QacAB e NorA de *Staphylococcus aureus*, LfrA de *Mycobacterium smegmatis* e AmvA de *Acinetobacter baumannii* (da Silva *et al.*, 2016; Ling *et al.*, 2016; Sapula *et al.*, 2016). Em *E. coli*, os sistemas de efluxo TetA e MdfA são os transportadores mais bem estudados e têm sido associados à resistência de alto nível à tetraciclina, no caso da TetA, e fluoroquinolonas, biocidas, cloranfenicol e tetraciclina, no caso da MdfA (Li e Nikaido, 2016).

### **1.3.3. Família “Small Multidrug Resistance” (SMR)**

Os membros da família SMR encontram-se em procariotas e são compostos por 4  $\alpha$ -hélices transmembranares, com aproximadamente 100 a 140 aminoácidos hidrofóbicos sendo os transportadores de menor tamanho que existem (Putman *et al.*, 2000). Estão implicados no efluxo de catiões lipofílicos, detergentes e desinfetantes (Putman *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2009; Li e Nikaido 2016).

É exemplo desta família o transportador EmrE de *E. coli*, associado ao transporte de biocidas e corantes como o metil viologénio, brometo de etídio e acriflavina (Putman *et al.*, 2000; Li e Nikaido 2016) e Smr de *S. aureus* (Sapula *et al.*, 2016).

#### **1.3.4. Superfamília “Resistance Nodulation and Cell Division” (RND)**

Os transportadores da superfamília RND são dos mais importantes em bactérias Gram-negativas. São sistemas tripartidos constituídos por uma proteína transportadora de membrana interna com 12 TMS (p.e. AcrB), uma proteína acessória periplasmática ou proteína de fusão membranar (MFP) (p.e. AcrA) que determina a especificidade de substratos e funciona como uma estrutura adaptadora entre as proteínas das membranas interna e externa, e uma OMP (p.e. TolC) (Piddock, 2006; Nikaido e Takatsuka, 2009). São exemplos desta família, o sistema de efluxo AcrAB-TolC em *E. coli* e o sistema MexAB-OprM de *Pseudomonas aeruginosa* sendo responsáveis pela extrusão de uma variedade de substratos, incluindo corantes, detergentes, solventes, metais pesados, e antibióticos, sendo importante no desenvolvimento de fenótipos MDR.

Em *E. coli*, a bomba de efluxo AcrAB-TolC encontra-se associada ao efluxo de um grande número de antibióticos lipofílicos (p.e. a penicilina G, oxacilina, cloxacilina, nafcilina e outros  $\beta$ -lactâmicos, macrólidos, novobiocina, linezolida e ácido fusídico), e moléculas catiónicas como o brometo de etídio e sais biliares. A sua inativação confere um aumento da susceptibilidade a antibióticos e a corantes, desinfetantes, detergentes e solventes orgânicos, demonstrando assim a sua importância no estabelecimento da MDR em *Enterobacteriaceas* (Piddock, 2006; Li e Nikaido, 2016).

#### **1.3.5. Família “Multidrug and Toxic Compound Extrusion” (MATE)**

As bombas de efluxo da família MATE foram inicialmente classificadas como pertencentes a superfamília MF devido à semelhança das suas topologias membranares (Putman *et al.*, 2000). As proteínas da família MATE são compostas por aproximadamente 400-450 resíduos de aminoácidos e possuem 12 TMS (Mousa e Bruner, 2016). As bombas de efluxo da família MATE utilizam principalmente o gradiente de iões sódio, podendo também utilizar a energia proveniente da FMP para o transporte de substratos (Piddock, 2006). Estão envolvidas na manutenção da homeostase celular e extrusão de desperdícios provenientes do metabolismo celular (Li e Nikaido, 2016).

São exemplos desta família, a bomba de efluxo NorM de *Vibrio parahaemolyticus*, MepA de *S. aureus* e YdhE (aka MdtK ou NorE) em *E. coli* (Li e

Nikaido, 2016). A sua sobreexpressão está associada à resistência às fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e corantes (Putman *et al.*, 2000; Li e Nikaido, 2016).

#### **1.4. Metodologias para detecção de actividade de efluxo em bactérias**

Com a demonstração da contribuição do efluxo para a emergência de resistência em isolados clínicos MDR tornou-se necessário o desenvolvimento de metodologias para a sua detecção e caracterização (Viveiros *et al.*, 2010). Actualmente existem vários métodos para a detecção da actividade de efluxo em bactérias (Blair e Piddock, 2016). Esta pode ser determinada por fluorometria (Viveiros *et al.*, 2010; Coldham *et al.*, 2010), citometria de fluxo (Krishan e Hamelik, 2005), cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS, do inglês “liquid chromatography-mass spectrometry”) (Brown *et al.*, 2015; Cai *et al.*, 2009) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês “high performance liquid chromatography”) (HPLC) (Sakhtah *et al.*, 2016).

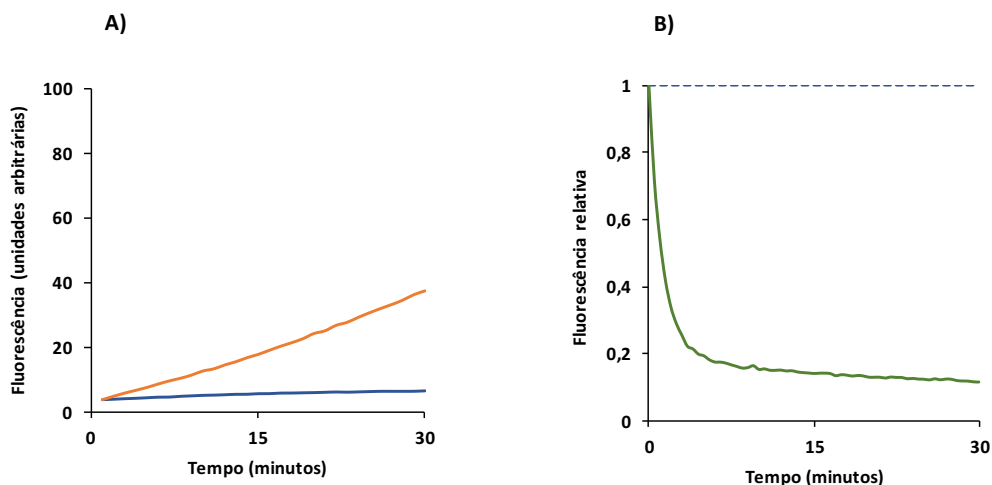
A actividade de efluxo pode ser inferida indirectamente através da determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI) de substratos de bombas de efluxo na presença e ausência de compostos inibidores de efluxo (Blair e Piddock, 2016; Viveiros *et al.*, 2010). O efeito dos inibidores de efluxo na CMI de compostos antimicrobianos/substratos de bombas de efluxo pode ser avaliado através da determinação do factor de modulação (Gröblacher *et al.*, 2012). O factor de modulação reflecte a redução do valor da CMI de um dado composto na presença de um inibidor de efluxo e é proporcional à capacidade inibitória do inibidor em estudo. Estes compostos inibidores de efluxo podem ser inibidores competitivos, ligando-se directamente ao local activo na bomba de efluxo impedindo a ligação dos substratos evitando que sejam efluxados, ou inibidores energéticos se inibirem a energia necessária para o funcionamento das bombas de efluxo, seja por depleção de ATP ou disrupção da FMP (Machado *et al.*, 2017b). Alguns dos compostos descritos na literatura como inibidores de efluxo incluem a reserpina, um alcalóide (Marquez, 2005); as fenotiazinas tioridazina e clorpromazina (agentes neurolépticos e antieméticos) e o verapamil (antiarrítmico), que actuam por depleção de energia e/ou inibição dos canais de cálcio (Kristiansen *et al.*, 2006; Marquez, 2005; Machado *et al.*, 2017b); o carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona (CCCP), um protonóforo (Jana *et al.*, 2009); as arilpiperazinas (NMP, 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine) que, similarmente ao PA $\beta$ N (phe-arg- $\beta$ -naphthylamide)

actua por competição e alterações na permeabilidade da membrana (Sonnet *et al.*, 2012; Lamers *et al.*, 2013).

O método de “Cartwheel” em placa de agar (Martins *et al.*, 2013) e os métodos fluorométricos em tempo real (Paixão *et al.*, 2009; Viveiros *et al.*, 2008; Coldham *et al.*, 2010; Viveiros *et al.*, 2010) são utilizados para avaliação directa da actividade de efluxo em bactérias. O método de “Cartwheel” é um método qualitativo para a avaliação da actividade de efluxo em que é utilizado um gradiente de concentrações de brometo de etídio. Este fluoróforo é um substrato comum à maioria das bombas de efluxo (Blair e Piddock, 2016), através das quais é efluxado eficazmente até atingir a concentração de equilíbrio (Paixão *et al.*, 2009). A partir desta concentração, passa a ser acumulado no interior da célula, traduzindo-se num aumento de fluorescência que pode ser detectada sob luz UV (Martins *et al.*, 2011). Deste modo, os isolados que apresentem fluorescência a baixas concentrações de brometo de etídio irão ter menor actividade de efluxo do que isolados cuja fluorescência só é detectada a concentrações mais elevadas.

Os métodos fluorométricos permitem analisar a entrada e extrusão de compostos fluorescentes em tempo real. O método fluorométrico semiautomático foi inicialmente desenvolvido, optimizado e implementado na Unidade de Microbiologia Médica do IHMT usando o brometo de etídio como fluoróforo para utilização no termociclador em tempo-real Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Sydney, Austrália) (Viveiros *et al.*, 2008; Paixão *et al.*, 2009). Este método foi posteriormente adaptado para um formato em microplaca de 96 poços usando o fluoróforo Hoechst 33342 (Coldham *et al.*, 2010). Usando como exemplo o brometo de etídio, nestes ensaios, a actividade de efluxo pode ser inferida indirectamente, através da determinação da quantidade de brometo de etídio, que é acumulado no interior da célula, ou directamente, através da determinação da quantidade de brometo de etídio que é efluxado. Num ensaio de acumulação quanto maior for o nível de acumulação intracelular de brometo de etídio, menor será a capacidade de efluxo do isolado em estudo. Na presença de um inibidor de efluxo verificar-se-á uma maior acumulação de brometo de etídio no interior da célula devido à inibição da actividade de efluxo. A diferença entre os valores de fluorescência de brometo de etídio na presença e na ausência de um inibidor de efluxo corresponde à capacidade do inibidor em inibir o efluxo de brometo de etídio (Figura 1A). Num ensaio de efluxo analisa-se a capacidade do isolado em estudo em efluxar brometo de etídio. Quando mais acentuada

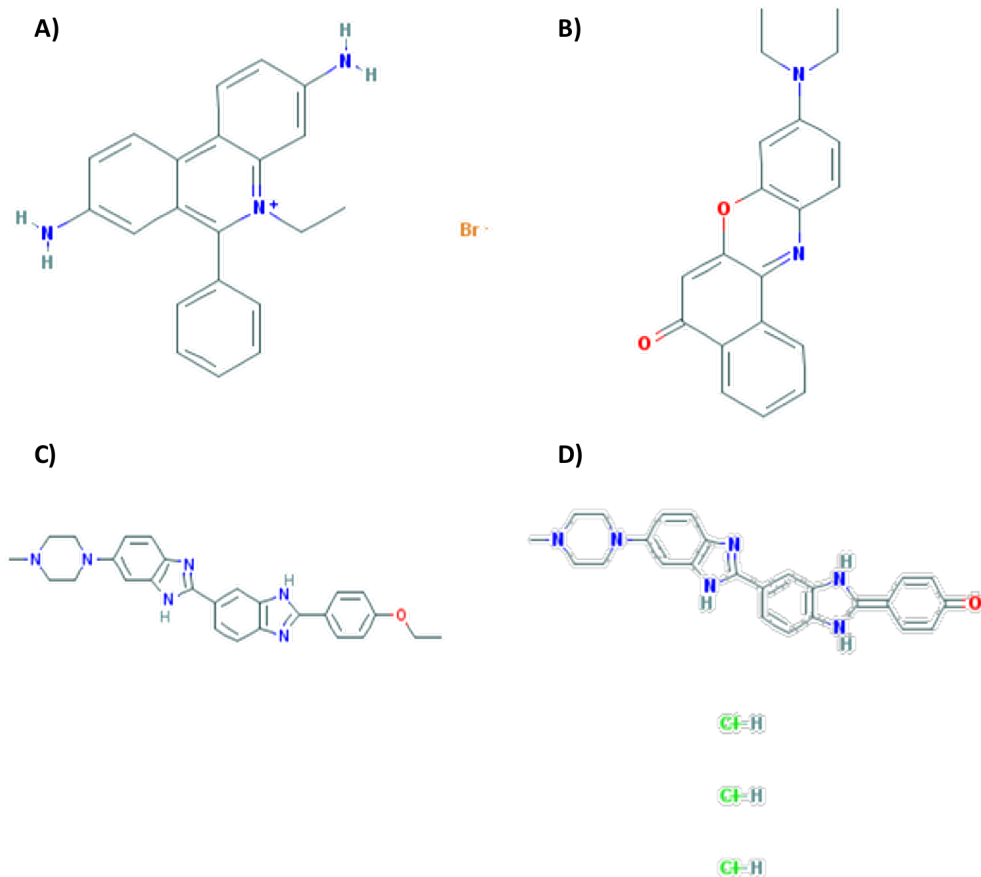
for a curva a verde (isolado na ausência de inibidor de efluxo) maior será a capacidade da célula para efluxar brometo de etídio, e maior será a capacidade do inibidor de efluxo em proporcionar a retenção intracelular deste composto, i.e, maior será o seu efeito inibitório (Figura 1B).



**Figura 1. Representação esquemática de um ensaio de acumulação e efluxo de brometo de etídio em *E. coli* AG100.** A) Ensaio de acumulação de brometo de etídio: a diferença de fluorescência entre as duas curvas determina o grau de inibição da actividade de efluxo devido à acção do inibidor de efluxo resultando na acumulação de brometo de etídio na célula. Curva laranja: *E. coli* + brometo de etídio + inibidor de efluxo; curva azul: *E. coli* + brometo de etídio. B) Ensaio de efluxo de brometo de etídio: a capacidade de efluxo da estirpe em estudo é determinada através do declive da curva a verde (*E. coli* na ausência de inibidor de efluxo), i.e., quanto maior for a curvatura maior será a capacidade da célula em efluxar brometo de etídio, comparativamente com a condição em que as células estão na presença do inibidor de efluxo (recta pontilhada) (Imagem adaptada de Costa, 2018).

### 1.5. Substratos usados para avaliação da actividade de efluxo em bactérias

Para a detecção da actividade de efluxo são usadas moléculas fluorescentes, ou fluoróforos, que são substratos das bombas de efluxo em estudo e cuja concentração intracelular pode ser facilmente detectada por fluorescência. Estes compostos apresentam níveis de acumulação diferencial quando se encontram em meio intra- vs meio extracelular. Os corantes mais utilizados e descritos na literatura são o brometo de etídio, Hoechst 33342, e o vermelho do Nilo (Figura 2) (Viveiros *et al.*, 2008; Bohnert *et al.*, 2010; Coldham *et al.*, 2010; Viveiros *et al.*, 2010; Ohene- Agyei *et al.*, 2014; Iyer *et al.*, 2015a,b).



**Figura 2. Fluoróforos frequentemente usados para avaliação da actividade de efluxo em bactérias.** (A) Brometo de etídeo (PubChem, 2018a); (B) Vermelho do Nilo (PubChem, 2018b); (C) Hoechst 33342 (PubChem, 2018c); (D) Hoechst 33258 (PubChem, 2018d). Apresenta-se o Hoechst 33258 uma vez que é o foco deste trabalho apesar de não haver estudos sobre a sua actividade de efluxo em bactérias.

O **brometo de etídeo** é um composto aromático heterocíclico com actividade antiviral, antimicrobiana e antiparasitária (Tomchick e Mandel, 1964; LePecq e Paoletti, 1967; Olmsted e Kearns, 1977). É um corante intercalador capaz de se ligar reversivelmente a várias estruturas celulares, como p.e., RNA, DNA, oligonucleótidos e proteínas quando usado em concentrações baixas e de equilíbrio (Mergny *et al.*, 1991; Jernaes e Steen, 1994). A ligação/dissociação ao DNA de cadeia dupla pode ser medida a 546 nm (excitação) e 595 nm (emissão) (Ihmels e Otto, 2005) O brometo de etídeo entra na célula por difusão passiva a favor do gradiente de concentração e é expelido por efluxo uma vez que é substrato de vários sistemas de efluxo (Viveiros *et al.*, 2008; Paixão *et al.*, 2009; Viveiros *et al.*, 2010). A acumulação intracelular de brometo de etídeo e o consequente aumento de fluorescência resulta do equilíbrio dinâmico entre a sua entrada por difusão

passiva e a sua saída por transporte activo mediado por bombas de efluxo (Paixão *et al.*, 2009). Este equilíbrio é dependente de vários factores, como p.e., a permeabilidade da parede celular, a capacidade de efluxo e de energia da célula, entre outros factores. É um dos corantes preferenciais para a avaliação da actividade de efluxo em bactérias (Viveiros *et al.*, 2010; Blair e Pidcock, 2016).

O **vermelho do Nilo** é uma benzofenoxazona catiónica de estrutura heterocíclica, planar e rígida (Chen *et al.*, 1999). É um corante vital conhecido como sonda de lípidos intracelulares e de domínios hidrofóbicos de proteínas e é altamente lipossolúvel (Greenspan *et al.*, 1985; Verstrepen *et al.*, 2004). Apresenta dois tipos de interacção com o DNA: é um agente intercalador de DNA e liga-se à “minor-groove” do DNA (Gattuso *et al.*, 2016). O vermelho de Nilo emite fluorescência forte apenas em ambiente altamente hidrofóbico (Greenspan *et al.*, 1985). A ligação do vermelho do Nilo ao DNA, proteínas e lípidos pode ser detectada a 488 nm (excitação) e 530-550 nm (emissão) (Greenspan *et al.*, 1985; Chen *et al.*, 1999). Possui um comprimento de onda de emissão máxima a 636 nm o que significa que há menos problema com interferência ao medir a concorrência com outros substratos (Greenspan *et al.*, 1985; Chen *et al.*, 1999; Blair e Pidcock, 2016). Tem sido usado para o estudo da actividade de efluxo em bactérias e é o composto de eleição para estudos de competição entre substratos de bombas de efluxo (Bohnert *et al.*, 2010; Bohnert *et al.*, 2011a; Bohnert *et al.*, 2013; Iyer *et al.*, 2015b). A sua aplicação encontra-se optimizada para o estudo do sistema de efluxo AcrAB-TolC usando células em fase estacionária (Bohnert *et al.*, 2010). Quando testado em bactérias não fermentadoras, como p.e. *Pseudomonas*, requer uma concentração mais elevada de glucose, como fonte de energia, para activação das bombas de efluxo (Bohnert *et al.*, 2011b; Iyer e Erwin, 2015a).

O **Hoechst 33258** (“pibenzimol hydrochloride”) e o **Hoechst 33342** (“bisbenzimidide ethoxide”) são compostos fluorescentes derivados do bis-benzimidazole que se ligam especificamente às regiões ricas em adenina-timina da “minor-groove” do DNA (Portugal e Waring, 1988; Chazotte, 2011). Ambos os corantes conseguem penetrar através das membranas celulares e por isso conseguem corar células vivas (Olive *et al.*, 1985). O Hoechst 33258 tem sido reportado como menos permeável à célula em comparação com o Hoechst 33342 (Zhang e Kiechle 1998) e ambos são menos permeáveis

comparativamente com brometo de etídio (Walberg *et al.*, 1999). Estes corantes são excitados por radiação ultravioleta a 350 nm e emitem fluorescência azul-ciano a 461 nm (Crowley *et al.*, 2016). São corantes fáceis e rápidos de usar, baratos e podem ser facilmente adaptados para alto rendimento (Blair e Piddock, 2016). O Hoechst 33342 tem sido usado para avaliação da actividade de efluxo em bactérias Gram-negativas tais como *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Coldham *et al.*, 2010), *Acinetobacter baumannii* (Richmond *et al.*, 2013) e *Vibrio cholerae* (Huda *et al.*, 2003). Até à data, não existem estudos sobre o efluxo de Hoechst 33258 em bactérias embora alguns estudos indiquem que, tal como o Hoechst 33342, o Hoechst 33258 é também um substrato de bombas de efluxo (Walberg *et al.*, 1999; Sincock e Robinson, 2001).

## **1.6. *Escherichia coli***

### **1.6.1. Características gerais**

*Escherichia coli* é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, pertencente à família das *Enterobacteriaceae* (Sousa, 2000). Apresenta forma de bastonete com aproximadamente 1 µm de diâmetro e 2 µm de comprimento (Gu *et al.*, 2016). É uma bactéria móvel, com flagelos peritricos e fimbrias ou adesinas que permitem a sua adesão. Trata-se de uma bactéria fermentadora de glucose e lactose, não formadora de esporos, catalase positiva, citocromo-oxidase negativa e redutora de nitratos a nitritos (Sousa, 2000; Duarte, 2014). Possui uma molécula de DNA circular (nucleóide) podendo conter plasmídeos (Duarte, 2014b).

*E. coli* possui uma parede celular constituída por uma membrana plasmática que regula o transporte de metabolitos para o exterior do citoplasma. Acima da membrana plasmática localiza-se o periplasma, que é constituído por uma camada de peptidoglicano que confere rigidez e dá forma à célula. Acima desta encontra-se a membrana externa, que contém fosfolípidos, lipoproteínas, proteínas e lipopolissacarídeos (Blount, 2015).

O habitat natural e preferencial de *E. coli* é o lúmen intestinal de mamíferos, no entanto, quando existe um desequilíbrio da flora comensal gastrointestinal, pode ocorrer doença entérica ou diarreica, infecções do sistema urinário e septicémias (Sousa *et al.*, 2000).

As estirpes de *E. coli* podem ser classificadas em três grupos: comensais, intestinais patogénicas e extraintestinais (ExPEC, do inglês “Extraintestinal Pathogenic *E. coli*”). As estirpes comensais possuem como habitat o tracto gastrointestinal, podendo causar infecções oportunistas em hospedeiros imunocomprometidos (Duarte, 2014b).

As estirpes intestinais patogénicas podem ser agrupadas consoante os seus factores de virulência e gravidade da doença que causam em: *E. coli* enteropatogénica (“EPEC, do inglês “enteropathogenic *E. coli*”); *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC, do inglês “enterohemorrhagic *E. coli*”); *E. coli* enterotoxinogénica (ETEC, do inglês “enterotoxic *E. coli*”); *E. coli* enteroagregativa (EAEC, do inglês “enteroaggregative *E. coli*”); *E. coli* enteroinvasiva (EIEC, do inglês “enteroinvasive *E. coli*”); e *E. coli* difusamente aderente (DAEC, do inglês “diffusely adherent *E. coli*”). As estirpes extraintestinais são responsáveis principalmente por dois tipos de infecções: (i) infecções do tracto urinário que são as infecções mais comuns, quer na comunidade quer em meio hospitalar, sendo estas causadas por *E. coli* uropatogénica (UPEC, do inglês “uropathogenic *E. coli*”), (ii) as meningites do recém-nascido causada por *E. coli* da meningite neonatal (MNEC, do inglês “neonatal meningitis *E. coli*”) e (iii) intoxicações alimentares causadas por *E. coli* patogénica aviária (APEC, do inglês “avian pathogenic *E. coli*”) (Duarte, 2014b). As infecções causadas por *E. coli* apresentam uma elevada morbidade e mortalidade, constituindo um problema de saúde pública devido à emergência de estirpes resistentes aos antibióticos, quer na comunidade quer em meio hospitalar (Allocati *et al.*, 2013).

### **1.6.2. *Escherichia coli* como modelo experimental**

Para além sua relevância como microrganismo patogénico causador de doença em humanos e animais, devido à sua simplicidade, *E. coli* é amplamente usada como modelo experimental para estudos em microbiologia, biologia molecular, bioquímica e genómica. Em particular, o tamanho reduzido do seu genoma (*E. coli* K-12 MG1655 - 4,639,221 pb, Blattner *et al.*, 1997) e crescimento rápido (tempo de geração entre 20 a 30 min.), associado ao facto de possuir requisitos nutricionais simples e crescer facilmente em meios de cultura sólidos e líquidos geralmente usados em rotina laboratorial (Sousa, 2000) faz com que seja um bom modelo experimental.

## 1.7. Objectivos desta Dissertação

Para a detecção da actividade de efluxo são normalmente usadas moléculas fluorescentes, que são substratos das bombas de efluxo em estudo e cuja concentração intracelular pode ser facilmente detectada por fluorescência. O brometo de etídio tem sido o fluoróforo e substrato de efluxo de eleição para a caracterização da actividade de efluxo em bactérias e serviu de base para o desenvolvimento e optimização do método fluorométrico semiautomático na Unidade de Microbiologia Médica do IHMT, para utilização no termociclador em tempo-real Rotor-Gene 3000 (Viveiros *et al.*, 2008; Paixão *et al.*, 2009; Viveiros *et al.*, 2010). Este método foi posteriormente adaptado para um formato em microplaca de 96 poços usando o fluoróforo Hoechst 33342 (Coldham *et al.*, 2010) e mais recentemente, utilizando o brometo de etídio (Antunes, 2018). Neste trabalho, adaptamos o método fluorométrico semiautomático em placa de 96 poços para o uso com o fluoróforo Hoechst 33258, um corante menos tóxico que o brometo de etídio, de modo a avaliar a sua eventual aplicabilidade para a caracterização da actividade de efluxo em bactérias, usando *E. coli* como modelo. Usando duas estirpes isogénicas com diferentes níveis de expressão de bombas de efluxo, a estirpe *E. coli* AG100, com o sistema de efluxo AcrAB-TolC funcional e *E. coli* AG100A, com o sistema AcrAB-TolC inactivado, neste trabalho propusemo-nos a:

- Estudar a influência dos inibidores de efluxo na susceptibilidade aos antibióticos, biocidas e corantes, incluindo o Hoechst 33258, através da determinação das CMIs na presença e ausência de inibidores de efluxo;
- Investigar o contributo do sistema AcrAB-TolC para o transporte de Hoechst 33258 em *E. coli* por fluorimetria em tempo-real;
- Avaliar a capacidade do método fluorométrico semiautomático em placa de 96 poços na detecção do transporte de Hoechst 33258.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Estirpes bacterianas

Foram utilizadas duas estirpes de *E. coli* para a realização deste trabalho:

- Estirpe selvagem *E. coli* K-12 AG100 [*argE3 thi-1 rpsL xyl mtl*  $\Delta$ (*gal-uvrB*) *supE44*] que possui o sistema de efluxo AcrAB-TolC funcional (Lederberg, 1951; Okuso *et al.*, 1996);
- Estirpe *E. coli* K-12 AG100A (Kan<sup>r</sup>::*acrAB*), que deriva da estirpe selvagem AG100 e que possui o sistema de efluxo AcrAB inativado por inserção do transposição Tn903 (Okuso *et al.*, 1996).

As estirpes *E. coli* AG100 e AG100A foram caracterizadas e gentilmente cedidas pelo Dr. Hiroshi Nikaido (Departamento de Química e Biologia Celular e Molecular, Universidade da Califórnia, Berkeley, CA, E.U.A.).

#### 2.1.2. Meios de cultura e soluções

O modo de preparação dos meios de cultura, soluções e compostos utilizados estão descritos nas Tabelas 1 a 5. Os meios de cultura e soluções foram preparados em água destilada e de seguida esterilizados por autoclavagem, 121°C durante 15 minutos a 1 bar, quando necessário.

**Tabela 1. Composição dos meios de cultura.**

| Meio de Cultura                          | Composição (por litro)  |
|--|---|
| Luria Bertani Agar (LA)                  | 5 g de extracto de levedura <sup>(1)</sup> ; 10 g de peptona de caseína <sup>(1)</sup> ; 10 g de cloreto de sódio <sup>(2)</sup> ; 20 g de agar <sup>(3)</sup>    |
| Luria Bertani Broth (LB)                 | 5 g de extracto de levedura <sup>(1)</sup> ; 10 g de peptona de caseína <sup>(1)</sup> ; 10 g de cloreto de sódio <sup>(2)</sup>                                  |
| Muller-Hinton Broth (MHB) <sup>(3)</sup> | 300 g de infusão desidratada de carne; 17,5 g de caseína hidrolisada; 1,5 g de amido; 4,347 mg Ca <sup>2+</sup> ; 6,206 mg Mg <sup>2+</sup> ; pH 7,3 ± 0,1 a 25°C |

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

**Tabela 2. Composição e modo de preparação de soluções utilizadas.**

| <b>Solução</b> <sup>(1)</sup>                                       | <b>Composição</b>   |
|---|---|
| Glicerol 50%  | 10 ml de glicerol em 10 ml de água Milli-Q para um volume final de 20 ml                                      |
| Tampão fosfato salino (PBS, “Phosphate Buffered Saline”) 1X, pH 7.4 | 1 pastilha dissolvida em 200 ml de água destilada corresponde a 10 mM tampão fosfato; 2,7 mM KCl; 137 mM NaCl |
| Glucose 20%   | 0,2 g/ml em PBS estéril*  |

<sup>(1)</sup> Sigma Aldrich, Missouri, EUA. \* solução filtrada com filtros de seringa estéreis de PVDF com 0,22 µm de diâmetro de poro, Rotilabo, Spritzenfilter Steril, Karlshure, Alemanha.

**Tabela 3. Composição e modo de preparação das soluções de inibidores de efluxo.**

| <b>Solução</b> <sup>(1)</sup>                         | <b>Composição e preparação da solução “stock”</b> |
|---|---|
| Phe-arg-β-naphthylamide (PAβN)                        | 10 mg/ml em água Milli-Q<br>Mantida a -20°C       |
| Carbonil cianeto <i>m</i> -clorofenilhidrazona (CCCP) | 10 mg/ml em DMSO<br>Mantida a -20°C               |
| Clorpromazina (CPZ)                                   | 10 mg/ml em água Milli-Q<br>Mantida a -20°C       |
| 1 – (1- Naphthylmethyl) piperazine (NMP)              | 10 mg/ml em DMSO<br>Mantida a -20°C               |
| Tioridazina (TZ)                                      | 10 mg/ml em água Milli-Q<br>Mantida a -20°C       |

<sup>(1)</sup> Sigma-Aldrich. DMSO, dimetilsulfóxido.

**Tabela 4. Composição e modo de preparação das soluções de corantes e biocidas utilizados.**

| <b>Solução</b> <sup>(1)</sup>                            | <b>Composição e preparação</b> |
|--|--------------------------------|
| Hoechst 33258  | 2 mg/ml em água Milli-Q        |
| Safranina (SAF)  | 10 mg/ml em água Milli-Q       |
| Acriflavina (ACR)  | 10 mg/ml em água Milli-Q       |
| Resazurina   | 10 mg/ml em água Milli-Q       |
| Brometo de tetrafenilfosfônio (TPP)                      | 10 mg/ml em DMSO               |
| Clorexidina (CHX)  | 10 mg/ml em DMSO               |
| Brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) <sup>(2)</sup> | 10 mg/ml em DMSO               |
| Cloreto de benzalcônio (BAC)                             | 10 mg/ml em DMSO               |

<sup>(1)</sup> Sigma-Aldrich; <sup>(2)</sup> Fluka, Chemie GmbH, Buchs, Suíça.

**Tabela 5. Composição e modo de preparação das soluções de antibióticos utilizados.**

| <b>Solução <sup>(1)</sup></b>       | <b>Composição e Preparação</b>    |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| Ampicilina (AMP)                    | 10 mg/ml em água Milli-Q          |
| Cloranfenicol (CHL)                 | 10 mg/ml em DMSO                  |
| Oxacilina (OXA)                     | 10 mg/ml em água Milli-Q          |
| Ácido nalidíxico (NA)               | 10 mg/ml em DMSO                  |
| Tetraciclina (TET)                  | 10 mg/ml em DMSO                  |
| Eritromicina (ERI)                  | 10 mg/ml em DMSO                  |
| Gentamicina (GEN)                   | 10 mg/ml em água Milli-Q          |
| Ciprofloxacina (CIP) <sup>(2)</sup> | 10 mg/ml em 1% HCl <sup>(1)</sup> |
| Canamicina (CAN)                    | 10 mg/ml em água Milli-Q          |

<sup>(1)</sup> Sigma-Aldrich; <sup>(2)</sup> ICN Biomedicals, Irvine, California. HCl, ácido clorídrico.

## **2.2. Métodos**

### **2.2.1. Crescimento e manutenção das estirpes bacterianas**

Para o crescimento das estirpes em estudo foi usado meio LB ou LA. Estas foram crescidas a 37°C, durante 18h. Os crescimentos em meio líquido LB foi realizado a 180 rpm (Thermo Scientific MaxQ 4000 Benchtop Orbital Shakers, Waltham, MA, E.U.A).

Os meios de cultura para a estirpe *E. coli* AG100A foram suplementados com 100 µg/ml de CAN de modo a manter o transposição Tn903.

A determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI) foi realizada em meio MHB.

Os “stocks” das estirpes foram mantidos a -20°C, suplementado com 10% (v/v) de glicerol.

### **2.2.2. Determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMI) pelo método de diluição em microplaca de 96 poços para os antibióticos, detergentes, corantes e inibidores de efluxo**

De forma a determinar as CMI dos antibióticos, biocidas, corantes e inibidores de efluxo de efluxo, recorreu-se ao método de microdiluição seriada em placa de 96 poços. A determinação das CMI para cada estirpe em estudo foi realizada de acordo com as recomendações do CLSI (CLSI, 2016). A CMI é definida como a concentração mínima

de um composto antimicrobiano capaz de inibir o visível crescimento de um determinado microrganismo.

Prepararam-se culturas primárias das estirpes de *E. coli* em meio LA. As placas foram incubadas a 37°C, durante 18h. De seguida, foram preparadas culturas em 10 ml de meio LB, inoculando 3 a 4 colónias a partir das culturas primárias. As estirpes foram incubadas a 37°C, 180 rpm, durante 18h. A densidade do inóculo das estirpes foi ajustada em meio MHB, de forma a obter uma turbidez de 0,5 McFarland. A escala de concentrações para cada um dos compostos antimicrobianos em estudo encontra-se descrita na Tabela 6.

**Tabela 6. Gama de concentrações dos compostos utilizados para determinação das CMI.**

| Composto                    | Gama de concentrações (µg/ml) |                       |
|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------|
|                             | <i>E. coli</i> AG100          | <i>E. coli</i> AG100A |
| <b>Inibidores de efluxo</b> |                               |                       |
| PAβN                        | 0,5 - 256                     | 0,5 - 256             |
| CCCP                        | 0,25 - 128                    | 0,25 - 128            |
| NMP                         | 1 - 512                       | 1 - 512               |
| CPZ                         | 0,5 - 256                     | 0,5 - 256             |
| <b>Biocidas e corantes</b>  |                               |                       |
| TPP                         | 1 - 512                       | 1 - 512               |
| CHX                         | 0,0078 - 4                    | 0,0078 - 4            |
| CTAB                        | 0,5 - 256                     | 0,5 - 256             |
| SAF                         | 1 - 512                       | 0,25 - 128            |
| ACR                         | 1 - 512                       | 0,0625 - 32           |
| BAC                         | 0,5 - 256                     | 0,0312 - 16           |
| <b>Antibióticos</b>         |                               |                       |
| AMP                         | 0,125 - 64                    | 0,125 - 64            |
| CHL                         | 0,125 - 64                    | 0,0312 - 16           |
| OXA                         | 1 - 512                       | 0,0312 - 16           |
| NA                          | 0,125 - 64                    | 0,125 - 64            |
| TET                         | 0,0156 - 8                    | 0,0156 - 8            |
| ERI                         | 1 - 512                       | 0,0625 - 32           |
| GEN                         | 0,0156 - 8                    | 0,0019 - 1            |
| CIP                         | 0,0078 - 4                    | 0,00097 - 0,5         |

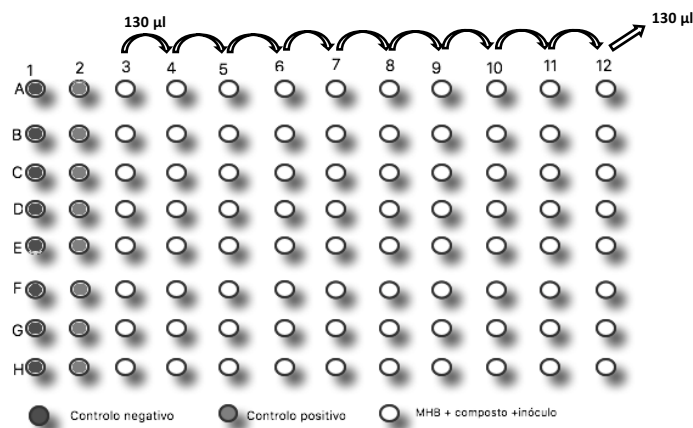
**Tabela 6 (cont.). Gama de concentrações dos compostos utilizados para determinação das CMI's.**

| Composto      | Gama de concentrações (µM) |                       |
|---------------|----------------------------|-----------------------|
|               | <i>E. coli</i> AG100       | <i>E. coli</i> AG100A |
| Hoechst 33258 | 0,625 - 320                | 0,625 - 320           |

CMI - Concentração mínima inibitória; PAβN - Phe-arg-β-naphthylamide; CCCP - Carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona; NMP - Arilpiperazina; CPZ - Clorpromazina; TPP - Brometo de tetrafenilfosfônio; CHX - Clorexidina; CTAB - Brometo de hexadeciltrimetilamônio; SAF - Safranina; ACR - Acriflavina; BAC - Cloreto de benzalcônio; AMP - Ampicilina; CHL - Cloranfenicol; OXA - Oxacilina; NA - Ácido nalidíxico; TET - Tetraciclina; ERI - Eritromicina; GEN - Gentamicina; CIP - Ciprofloxacina.

Depois de preparadas as soluções de trabalho dos compostos a testar preparou-se as placas de 96 poços como demonstrado na Figura 3. Começou-se por colocar 130 µl de meio MHB em todos os poços da placa, de seguida pipetou-se 110 µl de meio MHB nos poços da coluna 3. Acrescentou-se 20 µl de meio MHB nos poços da coluna 1 correspondente ao controlo negativo (controlo de esterilidade), e pipetou-se 20 µl dos compostos em estudo nos poços correspondentes da coluna 3. Esta coluna corresponde à concentração mais elevada de composto. De seguida efectuaram-se diluições seriadas de 1:2, retirando-se 130 µl dos poços da coluna 3 para os poços da coluna 4 e assim sucessivamente até à coluna 12, descartando-se os 130 µl restantes desta última coluna. Por último, adicionou-se 20 µl de inóculo previamente ajustado a 0,5 McFarland a todas as colunas excepto à coluna 1. A coluna 2 corresponde ao controlo positivo (controlo de crescimento). No final, cada poço apresentava um volume final de 150 µl. As placas foram incubadas durante 18h a 37°C.

A leitura dos resultados foi efectuada visualmente após as 18h de incubação. Foram considerados válidos os ensaios que apresentavam crescimento no poço correspondente ao controlo positivo, e ausência de crescimento no poço correspondente ao controlo negativo. Os ensaios de determinação de CMI's foram realizados em triplicado.



**Figura 3. Esquema representativo de uma placa de 96 poços para a determinação das CMIs.**

### **2.2.3. Determinação de CMIs pelo método de diluição em microplaca de 96 poços para antibióticos, detergentes, corantes na presença de inibidores de efluxo**

De modo a avaliar a capacidade de um inibidor de efluxo em reduzir o valor da CMI foi realizada a determinação de CMIs pelo método de diluição em microplaca de 96 poços para antibióticos, biocidas e corantes na presença de inibidores de efluxo. Os ensaios foram realizados de acordo com o procedimento apresentado no ponto 2.2.2, com a exceção de que foi adicionado 10 µl do inibidor de efluxo a testar desde a coluna 3 à coluna 12. Os inibidores de efluxo foram utilizados a 80 µM para a AG100 e a 20 µM para a AG100A, de modo a não comprometer a viabilidade celular (Machado *et al.*, 2017b).

De forma a avaliar o efeito do inibidor de efluxo nas CMIs dos antibióticos, biocidas e corantes determinou-se o factor de modulação (FM) (Gröblacher *et al.*, 2012), através da seguinte fórmula:

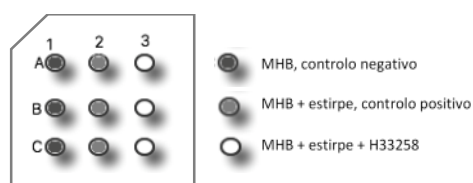
$$FM = \frac{CMI \text{ antibiótico}}{CMI \text{ em combinação}}$$

Considerou-se significativo o decréscimo de pelo menos  $\frac{1}{4}$  do valor da CMI dos compostos na presença do inibidor em estudo (DeMarco *et al.*, 2007).

#### 2.2.4. Avaliação da viabilidade celular na presença de Hoechst 33258 através do método da rezasurina

Para a realização deste ensaio começou-se por preparar as culturas primárias como descrito no ponto 2.2.2. Ao fim das 18h de incubação, ajustou-se a densidade do inóculo a 0,5 McFarland.

As placas foram preparadas do seguinte modo (Figura 4): adicionou-se 150 µl de meio MHB aos poços da coluna 1 que corresponde ao controlo negativo. Aos poços da coluna 2, que corresponde ao controlo positivo, foi adicionado 130 µl de meio MHB. Na coluna 3, foi adicionado 115 µl de meio MHB e 15 µl do composto Hoechst 33258 para uma concentração final de 2,5 µM para a estirpe AG100 e 0,625 µM para a estirpe AG100A. De seguida, foi colocado 20 µl do inóculo da estirpe nos poços da coluna 2 e 3. A placa foi incubada a 37°C durante 18h.



**Figura 4. Esquema representativo da preparação da placa de 96 poços para a avaliação da viabilidade celular na presença de Hoechst 33258.**

Após as 18h de incubação, adicionou-se 10 µl de rezasurina a 100 µg/ml a todos os poços. De seguida, incubou-se à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, durante 4h (Vidal-Aroca *et al.*, 2009). O ensaio foi considerado válido apenas quando ocorreu mudança de cor azul para rosa no controlo positivo, indicativo de células viáveis, e ausência de crescimento no controlo negativo (cor azul). A fluorescência nos poços foi quantificada a 530/25 nm (excitação) e 590/35 nm (emissão) recorrendo ao uso do fluorímetro Synergy HT Microplate Reader (BioTek Instruments Inc, Vermont, E.U.A). O nível de fluorescência emitida é directamente proporcional ao número de células bacterianas viáveis presentes em cada poço. Os resultados foram normalizados em relação controlo que consiste na estirpe sem composto. Os ensaios foram realizados em triplicado.

### **2.2.5. Método fluorométrico semiautomático usando o fluorímetro Synergy HT Microplate Reader**

O método fluorométrico semiautomático permite analisar a entrada e a extrusão de compostos fluorescentes que sejam substratos de bombas de efluxo, p.e. o brometo de etídio (Viveiros *et al.*, 2008; Paixão *et al.*, 2009; Viveiros *et al.*, 2010). O método utilizado neste trabalho baseia-se nos mesmos princípios utilizados para a realização do método fluorométrico semiautomático usando o termociclador em tempo real Rotor-Gene 3000 (Corbett, Sidney, Austrália), agora adaptado para um formato em microplaca de 96 poços usando um leitor de placas como descrito por Richmond *et al.* (2013). Neste trabalho foi utilizado o fluorímetro Synergy HT Microplate Reader para a avaliação da actividade de efluxo de Hoechst 33258 nas estirpes em estudo.

Começou-se por preparar as culturas primárias das estirpes *E. coli* AG100 e AG100A como descrito no ponto 2.2.2. De seguida foram preparadas culturas em meio líquido, através da inoculação de 3 a 4 colónias da estirpe em estudo em 10 ml de LB. As estirpes foram incubadas a 37°C, durante 18h, a 180 rpm.

O crescimento das estirpes foi acompanhado através da medição da densidade óptica (DO) a 600 nm num espectrofotómetro de tubos (Spectronic 20D+, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, E.U.A), até atingir uma  $DO_{600nm}$  de 0,6.

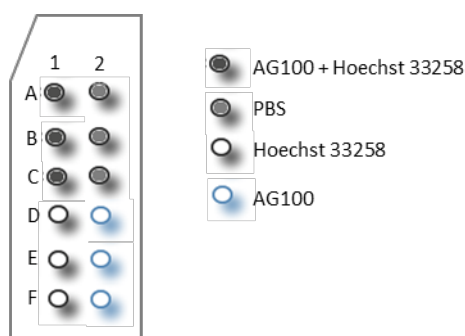
Assim que o crescimento da estirpe atingiu a  $DO_{600nm}$  pretendida, as células foram recolhidas por centrifugação a 7300 rpm (Sigma 2-16 PK), durante 3 min à temperatura ambiente. De seguida eliminou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 10 ml de PBS. Repetiu-se o processo de lavagem mais uma vez e ajustou-se  $DO_{600nm}$  a 0,6 com PBS.

#### **2.2.5.1 Determinação da concentração de equilíbrio**

Inicialmente foram realizados ensaios para a determinação da concentração de células a usar nos ensaios de acumulação de Hoechst 33258. Para tal foram testadas diferentes suspensões de *E. coli* AG100, medidas em unidades de densidade óptica a 600 nm. Foram testadas as seguintes DOs: 0.1, 0.3, 0.4, 0.5 e 0.6. Para estes ensaios utilizaram-se células bacterianas inactivadas por acção do calor. Para tal, as estirpes foram preparadas conforme descrito no ponto 2.2.5. Após ter sido ajustada a  $DO_{600nm}$  pretendida, as células foram incubadas a 100°C em banho seco durante 20 min. Após este

período de incubação, seguiu-se um passo de incubação à temperatura ambiente durante 15 min.

O ensaio de acumulação de Hoechst 33258 realizou-se em placas de 96 poços pretas de fundo plano, próprias para ensaios de fluorometria (ThermoFisher Scientific), A concentração de Hoechst 33258 usada nestes ensaios foi de 2,5  $\mu\text{M}$ , que corresponde a concentração de equilíbrio para esta estirpe determinada como descrito abaixo. As placas foram preparadas para um volume final de 200  $\mu\text{l}$  como se descreve de seguida (Figura 5): (i) adicionou-se 100  $\mu\text{l}$  de suspensão de células ajustada ao dobro da concentração pretendida + 80  $\mu\text{l}$  de PBS + 20  $\mu\text{l}$  Hoechst 33258 para uma concentração final de 2,5  $\mu\text{M}$  aos poços A a C da fila 1; (ii) 180  $\mu\text{l}$  de PBS + 20  $\mu\text{l}$  Hoechst 33258 para uma concentração final de 2,5  $\mu\text{M}$  aos poços D a F da fila 1; (iii) 200  $\mu\text{l}$  de PBS aos poços A a C da fila 2; e (i) 100  $\mu\text{l}$  de suspensão de células ajustada ao dobro da concentração pretendida + 100  $\mu\text{l}$  de PBS aos poços D a F da fila 2.

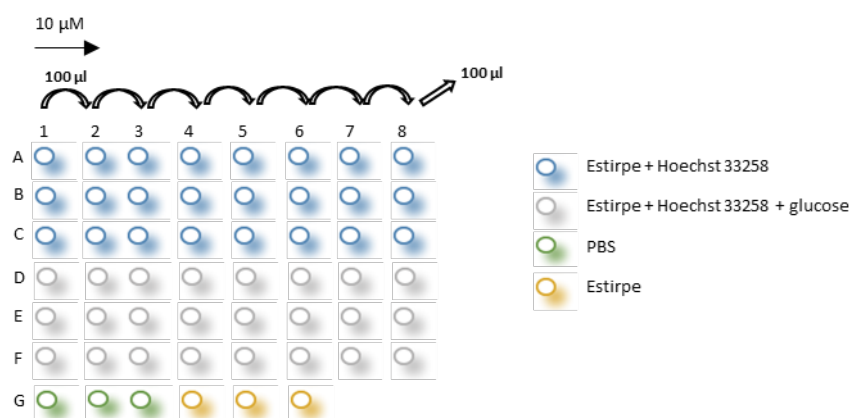


**Figura 5. Esquema representativo da preparação da placa de fluorometria para os ensaios de determinação da concentração óptima de células a usar nos ensaios de acumulação de Hoechst 33258.**

A microplaca de 96 poços foi colocada no aparelho Synergy HT Microplate Reader. Os ensaios de acumulação realizaram-se a uma temperatura de 37°C e a leitura da fluorescência de Hoechst 33258 adquirida a 360/40 nm (excitação) e 460/40 nm (emissão), após cada ciclo de 60 s, durante 30 min. Os ensaios foram realizados em triplicado. Cada placa de teste incluiu três replicados experimentais.

Para a determinação da concentração de Hoechst 33258 a partir da qual se começa a detectar acumulação nas células, i.e., a concentração de equilíbrio entre influxo e efluxo, foram realizados ensaios de acumulação com diferentes concentrações de Hoechst 33258. O ensaio de acumulação de Hoechst 33258 realizou-se em placas de 96 poços pretas de fundo plano.

As placas foram preparadas como se descreve de seguida (Figura 6): adicionou-se 100  $\mu$ l de PBS a cada poço da placa, com excepção dos poços da coluna 1. Na coluna 1, adicionou-se 180  $\mu$ l de PBS aos poços das filas A a C (ensaio sem glucose) e 176  $\mu$ l de PBS aos poços das filas D a F (ensaio com glucose). De seguida, adicionou-se 20  $\mu$ l de uma solução de Hoechst 33258 preparada a 2x a concentração final a testar no ensaio. Esta coluna possui a concentração mais elevada de Hoechst 33258, a partir da qual foram efectuadas as diluições seriadas por um factor de 2 até à coluna 8, inclusive. Na coluna 8, os restantes 100  $\mu$ l foram descartados. No final, obteve-se uma escala de concentrações de Hoechst 33258 entre 10  $\mu$ M e 0,078  $\mu$ M. De seguida, adicionou-se aos poços das filas D a F, da coluna 1 à coluna 8, 4  $\mu$ l de uma solução de glucose a 20% para uma concentração final no ensaio de 0,4%. Foram incluídos controlos com apenas PBS (200  $\mu$ l) nos poços 1 a 3 da fila G e apenas a suspensão de células nos poços 4 a 6 da fila G (100  $\mu$ l de células e 100  $\mu$ l PBS). Por fim, adicionou-se 100  $\mu$ l da suspensão de células com  $DO_{600nm}$  0.6. A concentração final de células no ensaio foi de 0.3.

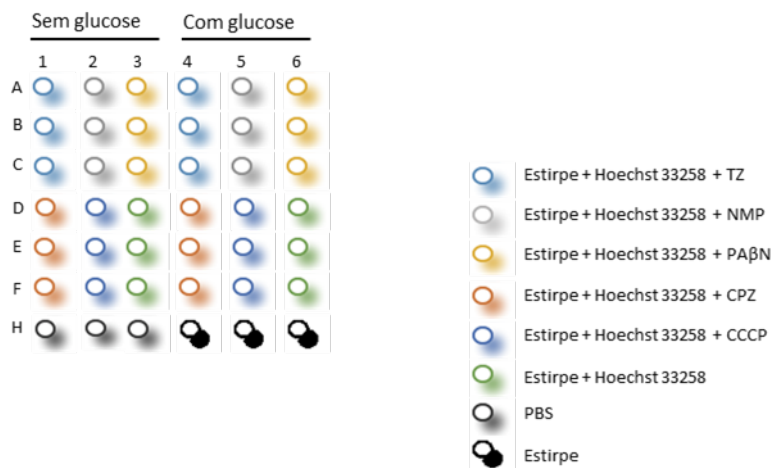


**Figura 6. Esquema representativo da preparação da placa de fluorometria para os ensaios de determinação de equilíbrio de Hoechst 33258.**

A microplaca de 96 poços foi depois colocada no aparelho Synergy HT Microplate Reader. Os ensaios de acumulação realizaram-se a uma temperatura de 37°C e a leitura da fluorescência de Hoechst 33258 adquirida a 360/40 nm (excitação) e 460/40 nm (emissão), após cada ciclo de 60 s, durante 30 min. Os ensaios foram realizados em triplicado. Cada placa de teste incluiu três replicados experimentais.

### 2.2.5.2. Ensaio de acumulação de Hoechst 33258 na presença de inibidores de efluxo

Para avaliar o efeito dos inibidores na actividade de efluxo de Hoechst 33258, o inóculo foi preparado como descrito no ponto 2.2.5. A placa de teste foi preparada como se segue (Figura 7): começou-se por colocar 20 µl de Hoechst 33258 para uma concentração final de 2,5 µM. De seguida colocou-se 10 µl do inibidor em estudo para uma concentração final de 80 µM para a AG100 ou 20 µM para a AG100A na presença ou ausência de glucose para uma concentração final de 0,4% (4 µl). Adicionou-se 80 µl de PBS aos poços que continham apenas Hoechst 33258 e inibidor de efluxo e 72 µl de PBS os poços que continham Hoechst 33258, inibidor de efluxo e glucose. Foram incluídos controlos com apenas a suspensão celular (100 µl de células com DO<sub>600nm</sub> a 0.6 e 100 µl de PBS) e apenas PBS (200 µl).



**Figura 7. Esquema representativo da preparação da placa de fluorometria para os ensaios de acumulação de Hoechst 33258 na presença de inibidores de efluxo.**

A placa de 96 poços foi colocada no aparelho Synergy HT Microplate Reader e

os ensaios de acumulação foram realizados a uma temperatura de 37°C. A leitura da fluorescência de Hoechst 33258 foi adquirida a 530/25 nm (excitação) e 590/35 nm (emissão), após cada ciclo de 60 s, durante 30 min. Os ensaios foram realizados em triplicado.

De modo a avaliar a capacidade dos inibidores de efluxo em inibir o efluxo de Hoechst 33258, foi calculada a fluorescência final relativa (FFR) para cada estirpe e inibidor de efluxo (Machado *et al.*, 2011), com base nos valores de fluorescência obtidos no final dos 30 min de ensaio, de acordo com a seguinte fórmula:

$$FFR = \frac{FR_{30 \text{ min (tratado)}} - FR_{30 \text{ min (não tratado)}}}{FR_{30 \text{ min (não tratado)}}$$

Nesta fórmula, a FR (tratado) corresponde à fluorescência relativa de Hoechst 33258 no último ponto da curva de acumulação (30 min) na presença do inibidor e a FR (não tratado) corresponde à fluorescência relativa de Hoechst 33258 no último ponto da curva de acumulação (30 min) na ausência do inibidor. A FFR mede a capacidade do inibidor de efluxo em proporcionar a retenção de Hoechst 33258 no interior da célula (Machado *et al.*, 2011). Para cada inibidor foi calculada a média  $\pm$  desvio padrão. Considerou-se efeito inibitório significativo, valores de FFR iguais ou superiores a 1.

### 3. Resultados e Discussão

A fluorimetria em tempo-real tem sido um dos métodos de eleição para detectar e quantificar o transporte de substratos fluorescentes através da parede celular de bactérias e membranas de células eucariotas (Viveiros *et al.*, 2008; Paixão *et al.*, 2009; Viveiros *et al.*, 2010; Blair e Piddock, 2016). Na sua grande maioria, estas metodologias usam moléculas fluorescentes que são substratos das bombas de efluxo que se pretende estudar e cuja concentração pode ser facilmente detectada por fluorescência. Este é o caso do método fluorométrico semiautomático para monitorização do transporte de brometo de etídio utilizando o termociclador em tempo real Rotor-Gene 3000, desenvolvido e implementado na Unidade de Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (Viveiros *et al.*, 2008; Paixão *et al.*, 2009; Viveiros *et al.*, 2010). Neste trabalho, usamos o método fluorométrico em tempo real adaptado para microplacas de 96 poços para uso no fluorímetro Synergy HT Microplate Reader utilizando o Hoechst 33258 como substrato de bombas de efluxo.

Usando duas estirpes de referência de *E. coli* que diferem entre si na actividade do seu principal sistema de efluxo, o AcrAB-TolC – a estirpe AG100, com o sistema de efluxo AcrAB-TolC funcional e a estirpe AG100A, com o sistema AcrAB-TolC inactivo – neste trabalho pretendemos estudar qual a contribuição do sistema AcrAB-TolC para o efluxo de Hoechst 33258 em *E. coli* e se este fluoróforo poderá ser usado para diferenciar e caracterizar estirpes de *E. coli* com diferentes níveis de actividade efluxo.

Iniciamos o estudo com a determinação do perfil de susceptibilidade ao Hoechst 33258 bem como a outros substratos de bombas de efluxo, nomeadamente da bomba de efluxo AcrAB-TolC (antibióticos, corantes e detergentes), através da determinação de concentrações mínimas inibitórias na presença e ausência de compostos inibidores de efluxo. Deste modo pretendeu-se avaliar a existência ou não de um efeito sinérgico entre inibidores de efluxo e antibióticos, biocidas, Hoechst 33258 e outros corantes, e se esse efeito inibitório pode ser avaliado também por fluorimetria em tempo real.

Posteriormente, avaliou-se a existência de actividade de efluxo do Hoechst 33258 por fluorimetria em tempo real nas duas estirpes em estudo.

### 3.1. Caracterização fenotípica das estirpes utilizadas para a optimização do método para determinação e estudo da actividade de efluxo de Hoechst 33258

Para optimização do método para determinação da actividade de efluxo de Hoechst 33258 foram usadas duas estirpes isogénicas de *E. coli*, a estirpe AG100 com o sistema de efluxo AcrAB-TolC funcional, e a estirpe AG100A, com o sistema de efluxo AcrAB-TolC inactivado. O perfil de susceptibilidade a antibióticos, biocidas e corantes das duas estirpes foi obtido através da determinação das CMI. Os valores das CMI estão apresentados na Tabela 7 e correspondem ao resultado de pelo menos dois valores concordantes.

**Tabela 7. Valores de CMI de antibióticos, biocidas e corantes para as estirpes *E. coli* AG100 e AG100A.** Entre parêntesis apresenta-se o factor de modulação para estirpe AG100A em relação a estirpe AG100.

| Compostos                  | CMI (µg/ml)          |                       |
|----------------------------|----------------------|-----------------------|
|                            | <i>E. coli</i> AG100 | <i>E. coli</i> AG100A |
| <b>Antibióticos</b>        |                      |                       |
| AMP                        | 8                    | 4 (↓ 2x)              |
| OXA                        | 512                  | <b>2 (↓ 256x)</b>     |
| CHL                        | 16                   | <b>2 (↓ 8x)</b>       |
| NA                         | 16                   | <b>4 (↓ 4x)</b>       |
| TET                        | 2                    | 1 (↓ 2x)              |
| ERI                        | 128                  | <b>4 (↓ 32x)</b>      |
| GEN                        | 8                    | <b>1 (↓ 8x)</b>       |
| CIP                        | 0,25                 | <b>0,0078 (↓ 32x)</b> |
| <b>Biocidas e corantes</b> |                      |                       |
| TPP                        | >512                 | <b>16 (↓ ≥32x)</b>    |
| CHX                        | 2                    | 1 (↓ 2x)              |
| CTAB                       | 32                   | 16 (↓ 2x)             |
| ACR                        | 64                   | <b>8 (↓ 8x)</b>       |
| SAF                        | 256                  | <b>8 (↓ 32x)</b>      |
| BAC                        | 32                   | <b>2 (↓ 16x)</b>      |
| <b>Corante/fluoróforo</b>  |                      |                       |
| Hoechst 33258              | >320 µM              | <b>80 µM (↓ ≥4x)</b>  |

CMI - Concentração mínima inibitória; TPP - Brometo de tetrafenilfosfónio; CHX - Clorexidina; CTAB - Brometo de hexadeciltrimetilamónio; SAF - Safranina; ACR - Acriflavina; BAC - Cloreto de benzalcónio; AMP - Ampicilina; CHL - Cloranfenicol; OXA - Oxacilina; NA - Ácido nalidíxico; TET - Tetraciclina; ERI - Eritromicina; GEN - Gentamicina; CIP - Ciprofloxacina. *E. coli* K-12 AG100 com o sistema de efluxo AcrAB-TolC intacto e funcional; *E. coli* K-12 AG100A com o sistema de efluxo AcrAB inactivado (Viveiros *et al.*, 2005). A bold encontram-se a reduções >4x no valor da CMI em relação a estirpe original.

De acordo com os valores de CMI obtidos para os compostos apresentados na Tabela 7, verifica-se que a estirpe AG100A é mais susceptível aos antibióticos, com exceção da ampicilina e tetraciclina, e aos corantes testados, do que a estirpe AG100. Este efeito é mais evidente para a oxacilina, seguida da eritromicina, ciprofloxacina e para os corantes brometo de tetrafenilfosfônio, safranina, acriflavina e cloreto de benzalcônio. Verifica-se também que o valor da CMI do fluoróforo Hoechst 33258 é pelo menos 4x mais baixo para a estirpe AG100A quando comparado com a estirpe AG100. Devido à reduzida solubilidade do composto Hoechst 33258 não foi possível testar concentrações acima de 320  $\mu\text{M}$  (170,8  $\mu\text{g/ml}$ ). Os valores de CMI dos biocidas clorexidina e CTAB apenas difere em uma diluição, quando comparada com a estirpe AG100, não sendo por isso considerada significativa. Estes resultados indicam que o Hoechst 33258, o brometo de tetrafenilfosfônio, a safranina, acriflavina, o cloreto de benzalcônio, o cloranfenicol, a oxacilina, o ácido nalidíxico, a eritromicina e a gentamicina e a ciprofloxacina são substratos da bomba de efluxo AcrAB-TolC.

De modo similar ao observado para os antibióticos e corantes, verifica-se que a estirpe AG100A apresenta uma maior susceptibilidade aos inibidores de efluxo PA $\beta$ N, CCCP e tioridazina quando comparada com a estirpe AG100 (Tabela 8). Estes resultados sugerem que o PA $\beta$ N, CCCP e tioridazina podem ser, eles próprios, substratos da bomba AcrAB-TolC.

**Tabela 8. Valores obtidos de CMI de inibidores de efluxo para as estirpes de *E. coli* AG100 e AG100A.**

| Composto     | CMI                  |               |   |                  |
|--------------|----------------------|---------------|---|------------------|
|              | <i>E. coli</i> AG100 |               | <i>E. coli</i> AG100A                     |                  |
|              | $\mu\text{g/ml}$     | $\mu\text{M}$ | $\mu\text{g/ml}$                          | $\mu\text{M}$    |
| Pa $\beta$ N | >256                 | >492,8        | <b>64</b> ( $\downarrow \geq 4\text{x}$ ) | <b>&gt;123,2</b> |
| CCCP         | 64                   | 312,8         | <b>16</b> ( $\downarrow 4\text{x}$ )      | <b>78,2</b>      |
| NMP          | >512                 | 2262,3        | 512 ( $\downarrow \geq 2\text{x}$ )       | 2262,3           |
| CPZ          | 128                  | 360,3         | 64 ( $\downarrow 2\text{x}$ )             | 180,1            |
| TZ           | 128                  | 314,5         | <b>16</b> ( $\downarrow 8\text{x}$ )      | <b>39,3</b>      |

CMI - Concentração mínima inibitória; PA $\beta$ N - Phe-arg- $\beta$ -naphthylamide; CCCP - Carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona; NMP - Arilpiperazina; CPZ - Clorpromazina; TZ - Tioridazina. A bold encontram-se a reduções >4x no valor da CMI em relação à estirpe parental.

### 3.2. Determinação das concentrações mínimas inibitórias de Hoechst 33258, antibióticos, biocidas e corantes na presença de inibidores de efluxo

De forma a se poder avaliar a capacidade dos inibidores de efluxo em interferir com efluxo de Hoechst 33258 e antibióticos, outros corantes e biocidas, foram determinados os valores de CMI para o mesmo conjunto de compostos antimicrobianos na presença dos inibidores de efluxo CCCP, PA $\beta$ N, NMP, clorpromazina e tioridazina, testados em concentrações sub-inibitórias. Os inibidores de efluxo foram usados a 80  $\mu$ M para a estirpe AG100 e a 20  $\mu$ M para a estirpe AG100A, de modo a não comprometer a viabilidade celular (Machado *et al.*, 2017b). Os valores das CMIs dos antibióticos na presença dos inibidores de efluxo estão apresentados na Tabela 9 e correspondem ao resultado de pelo menos dois valores concordantes.

**Tabela 9. Valores de CMI obtidos de antibióticos na presença dos inibidores de sistemas de efluxo para as estirpes em estudo.**

| Antibióticos na presença/ausência de inibidores de efluxo | <i>E. coli</i>    |                      |                   |                 |
|---|-------------------|----------------------|-------------------|-----------------|
|   | AG100             |                      | AG100A            |                 |
|   | CMI ( $\mu$ g/ml) | MF                   | CMI ( $\mu$ g/ml) | MF              |
| <b>AMP</b>  | <b>8</b>          | -                    | <b>4</b>          | -               |
| + CPZ   | 32                | $\uparrow$ 4x        | 8                 | $\uparrow$ 2x   |
| + CCCP  | 8                 | -                    | 8                 | $\uparrow$ 2x   |
| + PA $\beta$ N  | 32                | $\uparrow$ 4x        | 8                 | $\uparrow$ 2x   |
| + NMP   | 32                | $\uparrow$ 4x        | 8                 | $\uparrow$ 2x   |
| + TZ  | >32               | $\uparrow$ $\geq$ 4x | 8                 | $\uparrow$ 2x   |
| <b>CHL</b>  | <b>16</b>         | -                    | <b>2</b>          | -               |
| + CPZ   | 8                 | $\downarrow$ 2x      | 1                 | $\downarrow$ 2x |
| + CCCP  | 16                | -                    | 2                 | -               |
| + PA $\beta$ N  | <b>2</b>          | $\downarrow$ 8x      | 2                 | -               |
| + NMP   | 8                 | $\downarrow$ 2x      | 2                 | -               |
| + TZ  | <b>4</b>          | $\downarrow$ 4x      | <b>0,5</b>        | $\downarrow$ 4x |
| <b>OXA</b>  | <b>512</b>        | -                    | <b>2</b>          | -               |
| + CPZ   | 512               | -                    | 1                 | $\downarrow$ 2x |
| + CCCP  | 256               | $\downarrow$ 2x      | 2                 | -               |
| + PA $\beta$ N  | 256               | $\downarrow$ 2x      | <b>0,5</b>        | $\downarrow$ 4x |
| + NMP   | 512               | -                    | 8                 | $\uparrow$ 4x   |
| + TZ  | 256               | 2x                   | 1                 | $\downarrow$ 2x |

**Tabela 9 (cont.). Valores de CMI obtidos de antibióticos na presença dos inibidores de sistemas de efluxo para as estirpes em estudo.**

| Compostos antimicrobianos na presença/ausência de inibidores de efluxo | <i>E. coli</i> |              |                  |                |
|--|----------------|--------------|------------------|----------------|
|  | AG100          |              | AG100A           |                |
|  | CMI (µg/ml)    | MF           | CMI (µg/ml)      | MF             |
| <b>NA</b>  | <b>16</b>      | -            | <b>4</b>         | -              |
| + CPZ  | 8              | ↓2x          | 4                | -              |
| + CCCP   | 16             | -            | 4                | -              |
| + PAβN   | <b>0,5</b>     | ↓ <b>32x</b> | <b>0,5</b>       | ↓ <b>8x</b>    |
| + NMP  | 8              | ↓2x          | 4                | -              |
| + TZ   | <b>4</b>       | ↓ <b>4x</b>  | <b>≤0,03125</b>  | ↓ <b>≥128x</b> |
| <b>TET</b>   | <b>2</b>       | -            | <b>1</b>         | -              |
| + CPZ  | 1              | ↓2x          | <b>0,25</b>      | ↓ <b>4x</b>    |
| + CCCP   | 1              | ↓2x          | 0,5              | ↓2x            |
| + PAβN   | 2              | -            | 0,5              | ↓2x            |
| + NMP  | 1              | ↓2x          | 0,5              | ↓2x            |
| + TZ   | 1              | ↓2x          | <b>≤0,0078</b>   | ↓ <b>≥128x</b> |
| <b>ERI</b>   | <b>128</b>     | -            | <b>4</b>         | -              |
| + CPZ  | 64             | ↓2x          | 1                | ↓ <b>4x</b>    |
| + CCCP   | <b>32</b>      | ↓ <b>4x</b>  | 2                | ↓2x            |
| + PAβN   | <b>16</b>      | ↓ <b>8x</b>  | 2                | ↓2x            |
| + NMP  | <b>16</b>      | ↓ <b>8x</b>  | 2                | ↓2x            |
| + TZ   | 128            | -            | <b>0,125</b>     | ↓ <b>32x</b>   |
| <b>GEN</b>   | <b>8</b>       | -            | <b>1</b>         | -              |
| + CPZ  | <b>1</b>       | ↓ <b>8x</b>  | 2                | ↑2x            |
| + CCCP   | <b>2</b>       | ↓ <b>4x</b>  | 1                | -              |
| + PAβN   | <b>1</b>       | ↓ <b>8x</b>  | 2                | ↑2x            |
| + NMP  | <b>1</b>       | ↓ <b>8x</b>  | 1                | -              |
| + TZ   | <b>2</b>       | ↓ <b>4x</b>  | 1                | -              |
| <b>CIP</b>   | <b>0,25</b>    | -            | <b>0,0078</b>    | -              |
| + CPZ  | 0,25           | -            | 0,0078           | -              |
| + CCCP   | 0,125          | ↓2x          | 0,0078           | -              |
| + PAβN   | 0,25           | -            | 0,0078           | -              |
| + NMP  | 0,25           | -            | 0,0078           | -              |
| + TZ   | <b>0,03125</b> | ↓ <b>8x</b>  | <b>≤0,000609</b> | ↓ <b>≥128</b>  |

CMI - Concentração mínima inibitória; AMP - Ampicilina; CHL - Cloranfenicol; OXA - Oxacilina; NA - Ácido nalidixico; TET - Tetraciclina; ERI - Eritromicina; GEN - Gentamicina; CIP - Ciprofloxacina; TZ - Tioridazina; CPZ - Clorpromazina; CCCP - Carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona; NMP - Arilpiperazina; PAβN - Phe-arg-β-naphthylamide; -, sem efeito. A vermelho encontram-se assinaladas as interações antagonistas. A bold encontram-se assinaladas as interações sinérgicas. *E. coli* K-12 AG100 com o sistema de efluxo AcrAB-TolC intacto e funcional; *E. coli* K-12 AG100A com o sistema de efluxo AcrAB inativado (Viveiros *et al.*, 2005).

Analisando os resultados apresentados na Tabela 9 por antibiótico e para as duas estirpes em estudo verifica-se:

**Ampicilina:** antagonismo na presença dos inibidores testados com exceção do CCCP para a estirpe AG100.

**Cloranfenicol:** sinergismo na presença de tioridazina, com decréscimo de 4x a CMI para ambas as estirpes, e sinergismo na presença de PA $\beta$ N, com um decréscimo de 8x para a estirpe AG100. Para as restantes combinações, os valores de CMI mantiveram-se ou decresceram 2x (1 diluição), não sendo por isso consideradas diferenças significativas.

**Oxacilina:** sinergismo na presença de PA $\beta$ N, com um decréscimo de 4x a CMI, e antagonismo na presença de NMP, com um aumento de 4x a CMI, apenas para a estirpe AG100A. Para as restantes combinações, os valores de CMI mantiveram-se ou decresceram 2x (1 diluição), não sendo por isso consideradas diferenças significativas.

**Ácido nalidíxico:** sinergismo na presença de PA $\beta$ N e tioridazina, com decréscimo da CMI de 32x e 4x, respectivamente, para a estirpe AG100, e 8x e  $\geq 128x$ , respectivamente, para a estirpe AG100A. Para as restantes combinações, os valores de CMI mantiveram-se ou decresceram 2x (1 diluição), não sendo por isso consideradas diferenças significativas.

**Tetraciclina:** sinergismo na presença de clorpromazina e tioridazina, com decréscimo da CMI de 4x e  $\geq 128x$ , respectivamente, para a estirpe AG100A. Para as restantes combinações, os valores de CMI mantiveram-se ou decresceram 2x (1 diluição), não sendo por isso consideradas diferenças significativas.

**Eritromicina:** sinergismo na presença de CCCP, PA $\beta$ N, e NMP, apresentando decréscimos dos valores de CMI de 4x, 8x e 8x, respectivamente, para a estirpe AG100. Relativamente à estirpe AG100A, verificou-se diminuição das CMIs na presença de clorpromazina (4x) e tioridazina (32x). Para as restantes combinações, os valores de CMI mantiveram-se ou decresceram 2x (1 diluição), não sendo por isso consideradas diferenças significativas.

**Gentamicina:** sinergismo na presença de clorpromazina, NMP e PA $\beta$ N, com decréscimo da CMI de 8x, e na presença de CCCP e tioridazina, com reduções de 4x o valor da CMI, para a estirpe AG100. Em relação à estirpe AG100A, não foi observado qualquer efeito dos inibidores de efluxo na CMI deste antibiótico.

**Ciprofloxacina:** sinergismo na presença de tioridazina, verificando-se reduções de 8x da CMI para a estirpe AG100, e  $\geq 128x$  para a estirpe AG100A. Para as restantes combinações, os valores de CMI mantiveram-se ou decresceram 2x (1 diluição), não sendo por isso consideradas diferenças significativas.

Os valores das CMIs de biocidas e corantes na presença dos inibidores de efluxo estão apresentados na Tabela 10 e correspondem ao resultado de pelo menos dois valores concordantes.

**Tabela 10. Valores de CMI obtidos de biocidas e corantes na presença dos inibidores de efluxo para as duas estirpes em estudo.**

| Biocidas e corantes na presença/ausência de inibidores de efluxo | <i>E. coli</i>           |              |                                |               |
|--|--------------------------|--------------|--------------------------------|---------------|
|  | AG100                    |              | AG100A                         |               |
|  | CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) | MF           | CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )       | MF            |
| <b>TPP</b>   | <b>&gt;512</b>           | -            | <b>16</b>                      | -             |
| + CPZ  | >512                     | -            | 8                              | ↓2x           |
| + CCCP   | 512                      | ↓ $\geq 2x$  | 16                             | -             |
| + PA $\beta$ N   | 512                      | ↓ $\geq 2x$  | 8                              | ↓2x           |
| + NMP  | 512                      | ↓ $\geq 2x$  | 8                              | ↓2x           |
| + TZ   | >512                     | -            | <b><math>\leq 0,125</math></b> | ↓ $\geq 16x$  |
| <b>CHX</b>   | <b>2</b>                 | -            | <b>1</b>                       | -             |
| + CPZ  | <b>0,0625</b>            | ↓ <b>32x</b> | 1                              | -             |
| + CCCP   | <b>0,25</b>              | ↓ <b>8x</b>  | 2                              | ↑2x           |
| + PA $\beta$ N   | <b>0,125</b>             | ↓ <b>16x</b> | 2                              | ↑2x           |
| + NMP  | <b>0,125</b>             | ↓ <b>16x</b> | 2                              | ↑2x           |
| + TZ   | <b>0,03125</b>           | ↓ <b>64x</b> | 0,5                            | ↓2x           |
| <b>CTAB</b>  | <b>32</b>                | -            | <b>16</b>                      | -             |
| + CPZ  | 16                       | ↓2x          | <b>2</b>                       | ↓ <b>8x</b>   |
| + CCCP   | 32                       | -            | 16                             | -             |
| + PA $\beta$ N   | 32                       | -            | 8                              | ↓2x           |
| + NMP  | 32                       | -            | 16                             | -             |
| + TZ   | 32                       | -            | <b>&lt;0,125</b>               | ↓ $\geq 128x$ |
| <b>ACR</b>   | <b>64</b>                | -            | <b>8</b>                       | -             |
| + CPZ  | 32                       | ↓2x          | <b>2</b>                       | ↓ <b>4x</b>   |
| + CCCP   | 64                       | -            | 8                              | -             |
| + PA $\beta$ N   | 64                       | -            | 8                              | -             |
| + NMP  | 64                       | -            | 8                              | -             |
| + TZ   | 32                       | ↓2x          | <b>1</b>                       | ↓ <b>8x</b>   |

**Tabela 10 (cont.). Valores de CMI obtidos de biocidas e corantes na presença dos inibidores de efluxo para as duas estirpes em estudo.**

| Biocidas e corantes na presença/ausência de inibidores de efluxo | <i>E. coli</i>   |     |                   |        |
|--|------------------|-----|-------------------|--------|
|  | AG100            |     | AG100A            |        |
|  | CMI (µg/ml)      | MF  | CMI (µg/ml)       | MF     |
| <b>SAF</b>   | <b>256</b>       | -   | <b>8</b>          | -      |
| + CPZ  | 128              | ↓2x | <b>2</b>          | ↓4x    |
| + CCCP   | 256              | -   | 8                 | -      |
| + PAβN   | 256              | -   | 4                 | ↓2x    |
| + NMP  | 256              | -   | 8                 | -      |
| + TZ   | 256              | -   | <b>1</b>          | ↓8x    |
| <b>BAC</b>   | <b>32</b>        | -   | <b>2</b>          | -      |
| + CPZ  | 16               | ↓2x | <b>0,5</b>        | ↓4x    |
| + CCCP   | 32               | -   | 2                 | -      |
| + PAβN   | <b>4</b>         | ↓8x | <b>0,5</b>        | ↓4x    |
| + NMP  | 16               | ↓2x | 2                 | -      |
| + TZ   | 16               | ↓2x | <b>&lt;0,0078</b> | ↓≥256x |
|  | CMI (µM)         | MF  | CMI (µM)          | MF     |
| <b>Hoechst 33258</b>   | <b>&gt;320µM</b> |     | <b>80 µM</b>      |        |
| + CPZ  | <b>40</b>        | ↓8x | <b>20</b>         | ↓4x    |
| + CCCP   | <b>80</b>        | ↓4x | <b>20</b>         | ↓4x    |
| + PAβN   | >320             | -   | <b>10</b>         | ↓8x    |
| + NMP  | >320             | -   | 80                | -      |
| + TZ   | <b>40</b>        | ↓8x | <b>1,25</b>       | ↓64x   |

CMI - Concentração mínima inibitória; TZ - Tioridazina; CPZ - Clorpromazina; CCCP - Carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona; NMP – Arilpiperazina; PAβN - Phe-arg-β-naphthylamide; **TPP** - Brometo de tetrafenilfosfônio; **CHX** - Clorexidina; **CTAB** - Brometo de hexadeciltrimetilamônio; **SAF** - Safranina; **ACR** - Acriflavina; **BAC** - Cloreto de benzalcônio; **AMP** - Ampicilina; **CHL** - Cloranfenicol; **OXA** - Oxacilina; **NA** - Ácido nalidíxico; **TET** - Tetraciclina; **ERI** - Eritromicina; **GEN** - Gentamicina; **CIP** – Ciprofloxacina. -, sem efeito.

Analisando os resultados apresentados na Tabela 10 por biocida/corante e para as duas estirpes em estudo verificamos:

**Brometo de tetrafenilfosfônio:** sinergismo na presença de tioridazina, apresentando um decréscimo no valor da CMI ≥16x para a estirpe AG100A.

**Clorexidina:** sinergismo na presença de clorpromazina, CCCP, PAβN, NMP e tioridazina, verificando-se reduções entre 8x a 64x para a estirpe AG100. Para as restantes combinações, os valores de CMI mantiveram-se ou decresceram 2x (1 diluição), não sendo por isso consideradas diferenças significativas. Em relação à estirpe AG100A, não

foi observado qualquer efeito dos inibidores de efluxo na CMI deste composto.

**Brometo de hexadeciltrimetilamónio:** sinergismo na presença de clorpromazina e tioridazina, com decréscimo da CMI de 8x e  $\geq 128x$ , respectivamente, para a estirpe AG100A. Para as restantes combinações, os valores de CMI mantiveram-se ou decresceram 2x (1 diluição), não sendo por isso consideradas diferenças significativas. Em relação à estirpe AG100, não foi observado efeito dos inibidores de efluxo na CMI deste composto.

**Acriflavina:** sinergismo na presença de clorpromazina e tioridazina, com decréscimo da CMI de 4x e 8x, respectivamente, para a estirpe AG100A. Para as restantes combinações, os valores de CMI mantiveram-se ou decresceram 2x (1 diluição), não sendo por isso consideradas diferenças significativas. Em relação à estirpe AG100, não foi observado efeito dos inibidores de efluxo na CMI deste corante.

**Safranina:** sinergismo na presença de clorpromazina e tioridazina, com decréscimo da CMI de 4x e 8x, respectivamente, para a estirpe AG100A. Para as restantes combinações, os valores de CMI mantiveram-se ou decresceram 2x (1 diluição), não sendo por isso consideradas diferenças significativas. Em relação à estirpe AG100, não foi observado efeito dos inibidores de efluxo na CMI deste corante.

**Cloreto de benzalcónio:** sinergismo na presença de clorpromazina e tioridazina, com decréscimo da CMI de 4x e  $\geq 256x$ , respectivamente, para a estirpe AG100A. Sinergismo na presença de PA $\beta$ N, com decréscimo da CMI de 8x para a estirpe AG100 e 4x para a estirpe AG100A. Para as restantes combinações, os valores de CMI mantiveram-se ou decresceram 2x (1 diluição), não sendo por isso consideradas diferenças significativas.

**Hoechst 33258:** sinergismo na presença de clorpromazina, CCCP e tioridazina, com decréscimo da CMI de 8x, 4x e 8x, respectivamente, para a estirpe AG100. Sinergismo na presença de clorpromazina, CCCP, PA $\beta$ N e tioridazina, com decréscimo da CMI de 4x, 4x, 8x e 64x, respectivamente, para a estirpe AG100A. Para as restantes combinações, os valores de CMI mantiveram-se.

Estes resultados permitem-nos concluir que os inibidores de efluxo testados apresentam efeito sinérgico, promovendo reduções nos valores de CMIs de antibióticos, corantes e biocidas tanto para a estirpe AG100, que possui o sistema AcrAB-TolC activo e funcional, como para a estirpe AG100A, que apresenta o sistema AcrAB-TolC inactivo.

Estes resultados demonstram, uma vez mais, que o sistema de efluxo AcrAB-TolC é o principal sistema de efluxo em *E. coli* e que, na sua ausência outras bombas de efluxo passam a actuar como mecanismo de resistência compensatório (Viveiros *et al.*, 2005). O inibidor de efluxo capaz de promover as maiores reduções nas CMI dos antibióticos, corantes e biocidas foi a tioridazina. Contrariamente, os inibidores de efluxo menos eficientes na redução das CMI tanto dos antibióticos como dos corantes e biocidas foram o NMP e o PA $\beta$ N. As diferenças observadas em relação à actividade dos inibidores de efluxo poderão estar relacionadas com o seu mecanismo de acção. Enquanto que o NMP e o PA $\beta$ N são compostos que inibem as bombas de efluxo por competição (Viveiros *et al.*, 2005; Kern *et al.*, 2006), podendo actuar como permeabilizadores da membrana celular apenas quando usados em concentrações elevadas e inibir a actividade de efluxo por depleção de energia (Lamers *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2017b), o CCCP, clorpromazina e a tioridazina são inibidores energéticos que inibem a actividade de efluxo por inibição da FMP (Machado *et al.*, 2017b). Neste trabalho, os inibidores de efluxo foram usados em concentrações substancialmente abaixo das respectivas CMI, concentrações estas que não interferem com a viabilidade celular (Machado *et al.*, 2017b).

Relativamente ao Hoechst 33258, podemos inferir que este fluoróforo é um substrato do sistema de efluxo AcrAB-TolC de *E. coli*, cujo transporte pode ser inibido na presença de compostos inibidores de efluxo. Uma vez que a determinação das CMI de diferentes substratos na presença e ausência de inibidores de efluxo apenas permite inferir de forma indirecta o efluxo de determinado composto, posteriormente foram realizados ensaios de acumulação para a determinação de actividade de efluxo de Hoechst 33258 em *E. coli*.

### **3.3. Determinação de actividade de efluxo de Hoechst 33258 em *E. coli* por fluorometria em tempo-real**

A monitorização do transporte de corantes/fluoróforos através da parede celular bacteriana permite-nos detectar a presença e avaliar a actividade de sistemas de efluxo associados ao transporte destes substratos do interior para o exterior (efluxo) e do exterior para o interior (acumulação) da célula, e que são também responsáveis pelo transporte de outros compostos antimicrobianos incluindo antibióticos, biocidas e outros corantes (Paixão *et al.*, 2009; Viveiros *et al.*, 2010, Blair e Piddock, 2016). Neste trabalho

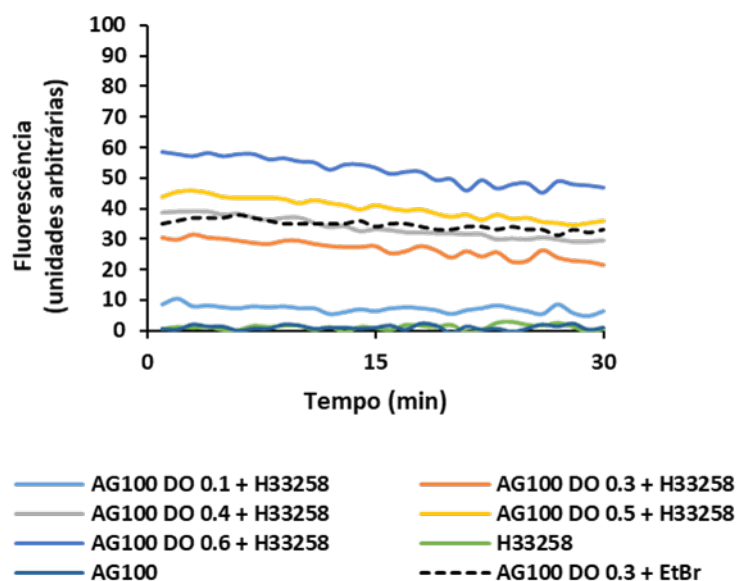
adaptamos o método fluorométrico semiautomático em placa de 96 poços, recentemente otimizado para uso com o brometo de etídio (Antunes, 2018), para detecção da actividade de efluxo do fluoróforo Hoechst 33258 em *E. coli*.

Assim, para a optimização do protocolo ao Hoechst 33258 foram usadas as mesmas condições aplicadas na optimização do protocolo ao brometo de etídio, i.e:

- i) determinar a “concentração de equilíbrio” de Hoechst 33258, i.e., a concentração para a qual o isolado apresenta um nível de acumulação de Hoechst 33258 basal que resulta do equilíbrio entre a entrada por difusão passiva e saída por efluxo activo; este valor não deve ultrapassar 10 unidades de fluorescência (UF) durante a duração do ensaio, neste caso 30 min (ponto 3.3.1);
- ii) garantir que o Hoechst 33258 não afecta a viabilidade celular nas concentrações usadas (ponto 3.3.2);
- iii) garantir que a glucose e o inibidor de efluxo não afectam a viabilidade celular nas concentrações usadas (Paixão *et al.*, 2009; Viveiros *et al.*, 2010; Machado *et al.*, 2017b).

### **3.3.1. Determinação da concentração de equilíbrio de Hoechst 33258**

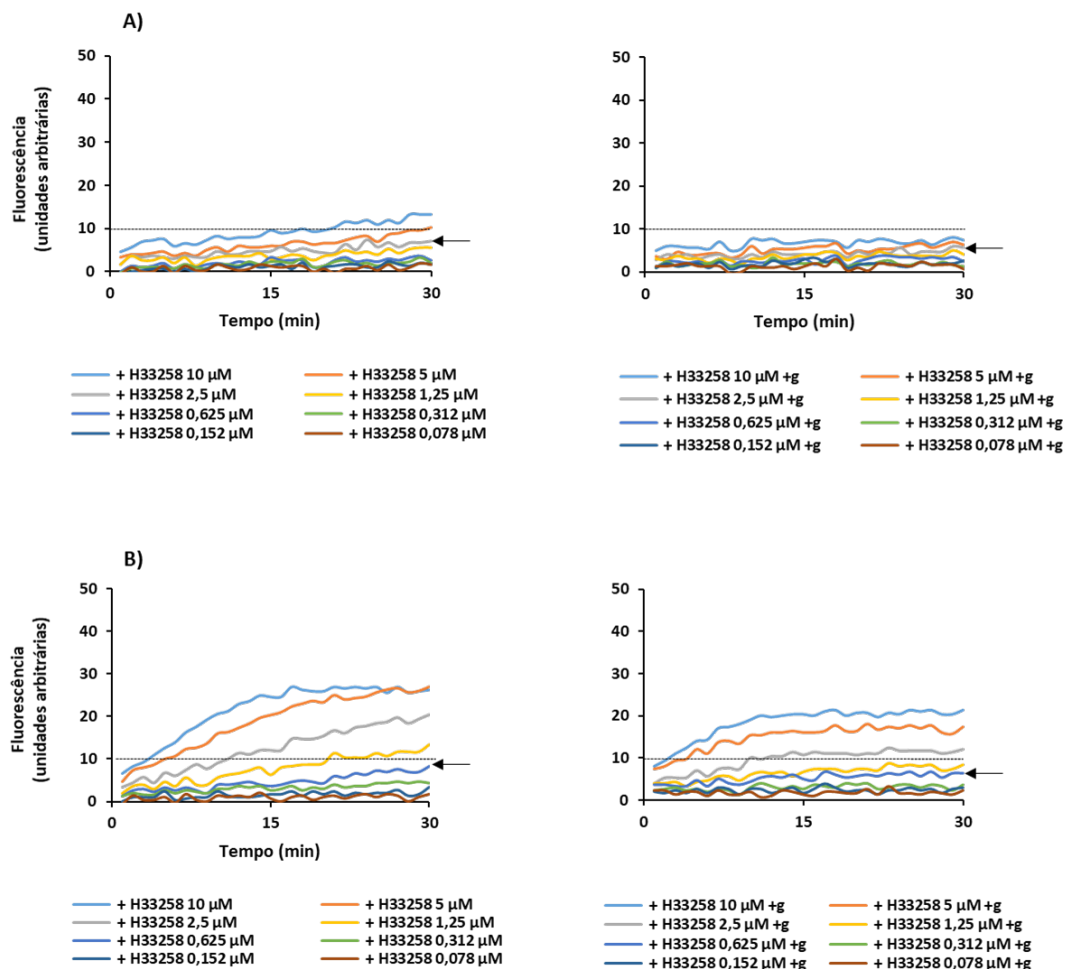
Estudos realizados com o fluoróforo Hoechst 33342 demonstraram a sua acumulação intracelular pode ser detectada a 2,5  $\mu\text{M}$  (Coldhman *et al.*, 2010; Richmond *et al.*, 2013). Uma vez que não existem estudos com Hoechst 33258, começamos por usar Hoechst 33258 a 2,5  $\mu\text{M}$  para determinar qual a concentração de células necessária usando como parâmetro de comparação os níveis de acumulação obtidos com o brometo de etídio usando o fluorímetro Synergy HT (Figura 8). De modo a obter níveis de acumulação máximos foram utilizadas células inactivadas pelo calor.



**Figura 8. Efeito de diferentes concentrações *E. coli* AG100 inactivada pelo calor na acumulação de Hoechst 33258 a 2,5  $\mu\text{M}$ .** A concentração final de células usada no ensaio foi 0.1, 0.3, 0.4, 0.5 e 0.6, medidas em unidades de densidade óptica (DO) a 600 nm. Para o ensaio de acumulação de brometo de etídio, a concentração celular usada é 0,3 (medida a  $\text{DO}_{600}$ ) e o brometo de etídio é usado a 1  $\mu\text{g/ml}$  (concentração de equilíbrio para AG100).

Da análise da Figura 8, verifica-se que as concentrações celulares que promovem níveis de acumulação de Hoechst 33258 equivalentes aos originados pelo brometo de etídio correspondem às  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  0.3, 0.4 e 0.5. Num ensaio de acumulação de brometo de etídio, as células são usadas a uma  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 0.3. Deste modo, e uma vez que não se verificam diferenças significativas entre os níveis de acumulação entre as  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  0.3, 0.4 e 0.5, seleccionou-se a  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  0.3, equivalente a ambos os ensaios, para os ensaios subsequentes.

Tendo determinado qual a concentração celular óptima a usar nos ensaios de fluorometria aplicado ao fluoróforo Hoechst 33258, fomos de seguida determinar a concentração de equilíbrio de Hoechst 33258, usando novamente Hoechst 33342 a 2,5  $\mu\text{M}$  como referência. Foram testadas concentrações de Hoechst 33258 entre 10  $\mu\text{M}$  e 0,078  $\mu\text{M}$ . Os ensaios foram realizados na presença e ausência de glucose (fonte de energia). Os resultados obtidos estão representados na Figura 9.



**Figura 9.** Gráficos representativos dos ensaios de acumulação de Hoechst 33258 de concentrações crescentes de Hoescht 33258, na ausência e na presença de glicose a 0,4%, para a estirpe *E. coli* AG100 (A) e AG100A (B) usando o Synergy HT Microplate Reader. A concentração de equilíbrio está indicada pela seta. A linha a tracejado indica o limite de 10 unidades de fluorescência. H33258, Hoechst 33258; g, glicose.

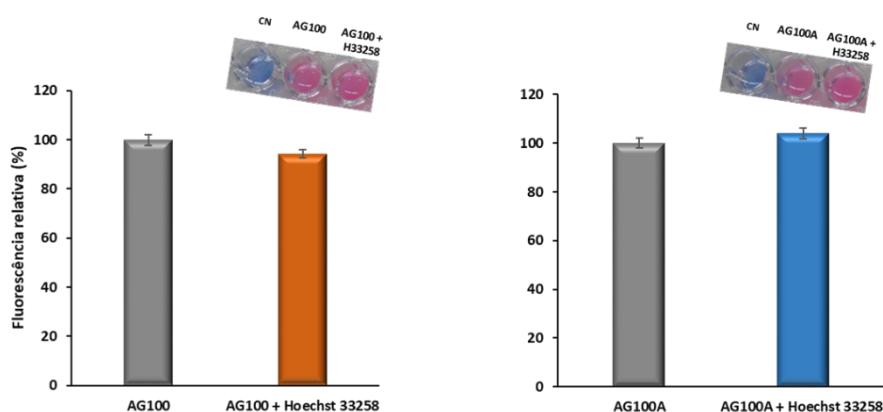
Com base na análise da Figura 9 determinámos as seguintes concentrações de equilíbrio: 2,5  $\mu\text{M}$  para a estirpe AG100 e 0,625  $\mu\text{M}$  para a estirpe AG100A. Os ensaios realizados na presença de glicose mostram um decréscimo dos níveis de acumulação de Hoechst 33258, como esperado, uma vez que a glicose funciona como fonte de energia para o funcionamento das bombas de efluxo resultando numa menor acumulação de substrato. As concentrações de equilíbrio de Hoechst 33258 mantiveram-se na presença de glicose. Estes resultados mostram que a estirpe AG100, com o sistema de efluxo AcrAB intacto e funcional, possui menor capacidade para acumular Hoechst 33258, que é indicativo de uma maior capacidade para efluxar este fluoróforo, do que a estirpe

AG100A, que possui o sistema de efluxo AcrAB inativado não conseguindo efluxar o substrato eficazmente.

### 3.3.2. Avaliação do efeito de Hoechst 33258 na viabilidade celular

Para avaliar o efeito do Hoechst 33258 na viabilidade celular das duas estirpes em estudo, foi utilizado o composto colorimétrico resazurina. A resazurina é um indicador oxidação-redução de cor púrpura que quando reduzido a resorufina por oxidoreductases celulares em células metabolicamente activas origina uma cor rosa (Riss *et al.*, 2013). Deste modo, a leitura dos resultados pode ser efectuada visualmente sendo que a alteração da cor do meio de azul para rosa é indicativa de crescimento bacteriano. Uma vez que a quantidade de resorufina produzida é directamente proporcional ao número de células viáveis (Riss *et al.*, 2013), os resultados podem também ser quantificados por fluorometria.

Os resultados dos ensaios de viabilidade estão apresentados na Figura 10. Foram obtidos valores de viabilidade celular acima de 90% para as duas estirpes na presença de Hoechst 33258 testado nas respectivas concentrações de equilíbrio, 2,5  $\mu$ M, AG100, e 0.625  $\mu$ M, AG100A (Figura 10). Estes resultados demonstram que quando usado na concentração de equilíbrio, o Hoechst 33258 não afecta a viabilidade das estirpes em estudo.

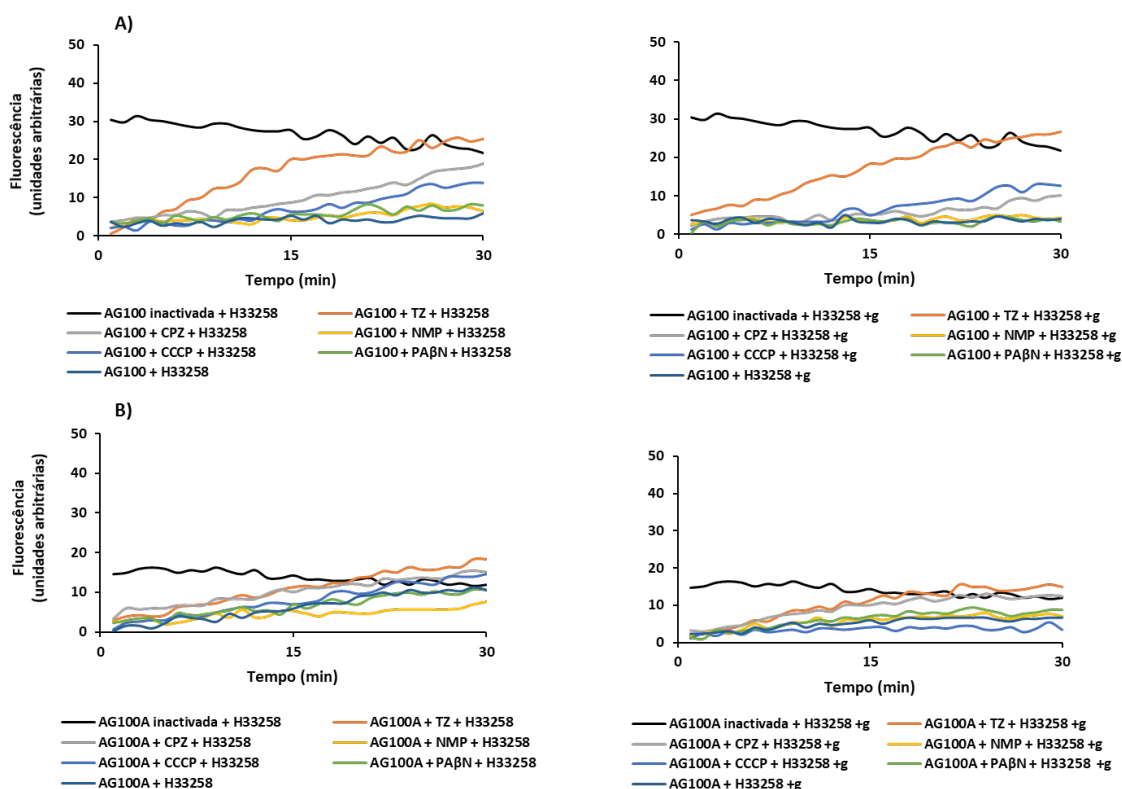


**Figura 10. Determinação da viabilidade celular das estirpes *E. coli* AG100 e AG100A, na presença de Hoechst 33258, com o indicador de viabilidade resazurina.** A fluorescência emitida em cada poço foi quantificada usando o fluorímetro Synergy HT Microplate Reader a 530/25 nm (excitação) e 590/35 nm (emissão). Os resultados encontram-se normalizados em relação ao controlo (estirpe sem composto) e são apresentados através da média de três ensaios  $\pm$  desvio padrão. CN, controlo negativo; H33258, Hoechst 33258.

Comprovando-se que o Hoechst 33258, quando testado na respectiva concentração de equilíbrio, não afecta a viabilidade celular das estirpes em estudo, seguidamente foram determinados os níveis de acumulação de Hoechst 33258 na presença de compostos inibidores de efluxo.

### **3.3.3. Determinação dos níveis de acumulação de Hoechst 33258 na presença de inibidores de efluxo**

Nos ensaios realizados na presença de compostos inibidores de efluxo, a actividade de efluxo foi inferida pela quantidade de Hoechst 33258 que é retido no interior da célula na presença da mesma concentração molar de inibidor, proporcionando assim uma medida indirecta da actividade de efluxo célula. Os inibidores testados foram a tioridazina, clorpromazina, CCCP, NMP e PA $\beta$ N. Todos os inibidores foram testados a 80  $\mu$ M para a estirpe AG100 e a 20  $\mu$ M para a estirpes AG100A, de modo a não interferir com a viabilidade celular (Machado *et al.*, 2017b). Os ensaios foram realizados na ausência e na presença de glucose a 0.4%, concentração esta que não interfere com a viabilidade celular conforme já demonstrado em trabalhos anteriores (Paixão *et al.*, 2009; Viveiros *et al.*, 2010). Os resultados obtidos para as estirpes em estudo na presença dos inibidores de efluxo, com e sem glucose são apresentados na Figura 11. Considerou-se efeito inibitório significativo, valores de FFR iguais ou superiores a 1.



**Figura 11.** Gráficos representativos dos ensaios de acumulação de Hoechst 33258 na presença e ausência de inibidores de efluxo, com e sem glicose a 0,4%, para a estirpe *E. coli* AG100 (A) e AG100A (B), usando o Synergy HT Microplate Reader. A curva a preto corresponde às células inativadas por calor e posteriormente incubadas na presença de Hoechst 33258 na concentração de equilíbrio. Os compostos foram usados a 80  $\mu$ M para a estirpe AG100 e a 20  $\mu$ M para a estirpe AG100A. TZ, tioridazina; CPZ, clorpromazina; CCCP, carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona; NMP, arilpiperazina; PA $\beta$ N, phe-arg- $\beta$ -naphthylamide; H33258, Hoechst 33258; g, glicose.

Com base nos valores de fluorescência ao final dos 30 min de ensaio, determinamos o índice de FFR, um valor arbitrário que reflecte a capacidade de um inibidor de efluxo em potenciar a retenção de um substrato no interior da célula (Machado *et al.*, 2011). Assim, quanto maior for a diferença entre o valor de fluorescência de Hoechst 33258 na presença do inibidor em relação à fluorescência da estirpe na presença apenas de Hoechst 33258, maior será o efeito inibitório exercido sobre os sistemas de efluxo. Os resultados realizados na presença e ausência de glicose estão apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11. Valores de fluorescência final relativa para os inibidores de efluxo em estudo para as estirpes *E. coli* AG100 e AG100A utilizando como substrato fluorescente o Hoechst 33258.**

| Inibidores de efluxo | Fluorescência Final Relativa |                    |                       |              |
|----------------------|------------------------------|--------------------|-----------------------|--------------|
|                      | <i>E. coli</i> AG100         |                    | <i>E. coli</i> AG100A |              |
|                      | - glucose                    | + glucose          | - glucose             | + glucose    |
| <b>TZ</b>            | <b>3,99 ± 0,18</b>           | <b>3,16 ± 0,32</b> | 0,75 ± 0,06           | 0,88 ± 0,03  |
| <b>CPZ</b>           | <b>2,64 ± 0,10</b>           | <b>1,25 ± 0,05</b> | 0,65 ± 0,06           | 0,78 ± 0,07  |
| <b>NMP</b>           | 0,53 ± 0,04                  | 0,30 ± 0,07        | 0,24 ± 0,04           | 0,01 ± 0,04  |
| <b>CCCP</b>          | <b>2,10 ± 0,29</b>           | <b>1,55 ± 0,13</b> | -0,30 ± 0,01          | -0,36 ± 0,10 |
| <b>PAβN</b>          | 0,23 ± 0,02                  | -0,04 ± 0,09       | 0,39 ± 0,02           | 0,40 ± 0,10  |

TZ, tioridazina; CPZ, clorpromazina; CCCP, carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona; NMP, arilpiperazina; PAβN, phe-arg-β-naphthylamide.

Para a estirpe AG100, e com base nos resultados obtidos, verificamos que o inibidor que apresenta uma maior capacidade para promover a retenção de Hoechst 33258 na célula é a tioridazina, seguido da clorpromazina e CCCP. O NMP e o PAβN são os inibidores que apresentam os níveis de acumulação mais baixos (FFR<1). Observa-se também que, na presença de glucose os níveis de acumulação decrescem em relação à condição sem glucose. Tal como referido acima, a glucose funciona com fonte de energia proporcionando um aumento da actividade das bombas de efluxo promovendo o aumento do efluxo dos seus substratos. Na presença de glucose a tioridazina é também o inibidor que apresenta maiores níveis de acumulação de Hoechst 33258. Relativamente à estirpe AG100A, verificaram-se níveis de acumulação de Hoechst 33258 reduzidos na presença de todos os inibidores (FFR<1) confirmando a reduzida actividade de efluxo nesta estirpe devido à inactivação do sistema AcrAB-TolC. Na presença de glucose a grande maioria apresenta valores de FFR similares com excepção do NMP que reduziu. Os resultados de fluorometria em tempo real vão de encontro aos resultados obtidos nas reduções das CMIs onde se verificou que a tioridazina, clorpromazina e CCCP foram os compostos inibidores de efluxo que apresentaram maior capacidade na redução das CMIs dos antibióticos, biocidas e corantes estudados.

## 4. Conclusões

Os resultados obtidos nesta Dissertação demonstram a existência de efluxo de Hoechst 33258 em *E. coli*, o qual pode ser inibido pelos inibidores de efluxo tioridazina, clorpromazina e CCCP e com menor eficiência com NMP e PA $\beta$ N.

Em particular, os resultados obtidos permitem-nos concluir que:

- (i) o Hoechst 33258 é um substrato da bomba de efluxo AcrAB-TolC;
- (ii) que a tioridazina e a clorpromazina são capazes de potenciar a acumulação de Hoechst 33258 a níveis similares ao das células cuja a actividade de efluxo foi inactivada (níveis de acumulação máximos);
- (iii) que é possível diferenciar estirpes de *E. coli* com diferentes níveis de acumulação de Hoechst 33258, nomeadamente, a estirpe AG100 com o sistema de efluxo AcrAB activo e funcional, da estirpe isogénica AG100A, que apresenta o sistema de efluxo AcrAB-TolC inactivado;
- (iv) que o Hoechst 33258 pode ser usado para avaliar a actividade de efluxo em *E. coli*;
- (v) que o Hoechst 33258 pode ser considerado uma alternativa ao brometo de etídio. Ambos os fluoróforos apresentaram resultados semelhantes permitindo efectuar as análises comparativas de capacidade de efluxo equivalentes.
- (vi) que o método fluorométrico semiautomático em placa de 96 poços usando fluorímetro Synergy HT pode ser usado para detectar do transporte de Hoechst 33258 em *E. coli*.

Neste sentido, futuramente poderão ser utilizadas outras abordagens para complementar os resultados obtidos neste trabalho nomeadamente o estudo de estirpes com sobreexpressão de bombas de efluxo, p.e., *E. coli* AG100<sub>tet</sub> (Viveiros *et al.*, 2005), a inclusão de isolados clínicos susceptíveis e resistentes a diferentes antibióticos, biocidas e corantes, e a avaliação da existência de competição entre o efluxo de Hoechst 33258 e outros substratos usando diferentes competidores de substratos de bombas de efluxo tais como tetraciclinas, macrólidos e fluoroquinolonas.

A aplicação do protocolo a novas moléculas fluorescentes permitirá aprofundar o conhecimento sobre a actividade dos sistemas de efluxo bem como identificar novos substratos e novos inibidores numa diversidade de bactérias.

## 5. Referências bibliográficas

- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., Di Ilio, C. 2013. *Escherichia coli* in Europe: an overview. *Int J Environ Res Public Health*, 10(12), 6235-54.
- Antunes S. 2018. Aplicação de um método fluorométrico em placa de 96 poços para a detecção de actividade de efluxo em bactérias. Tese de Mestrado em Ciências Biomédicas. Unidade de Microbiologia Médica. Instituto de Higiene e Medicina Tropical.
- Baquero, F. 2001. Low-level antibacterial resistance: a gateway to clinical resistance. *Drug Resist Updat*, 4(2), 93-105.
- Blair, J.M., Piddock, L.J.V. 2016. How to measure export via bacterial multidrug resistance efflux pumps. *mBio*, 7(4), e00840-16.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M.A., Rose, D.J, Mau, B., Shao, Y. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277(5331), 1453-62.
- Blount, Z.D. 2015. The natural history of model organisms: the unexhausted potential of *E. coli*. *Elife*, 4, e05826.
- Bohnert, J.A., Karamian, B., Nikaido, H. 2010. Optimized Nile Red efflux assay of AcrAB-TolC multidrug efflux system shows competition between substrates. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(9), 3770-5.
- Bohnert, J.A., Schuster, S., Kern, W.V. 2013. Pimozide inhibits the AcrAB-TolC efflux pump in *Escherichia coli*. *Open Microbiol J*, 7, 83-6.
- Bohnert, J.A., Szymaniak-Vits, M., Schuster, S., Kern, W.V. 2011a. Efflux inhibition by selective serotonin reuptake inhibitors in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*, 66(9), 2057-60.
- Bohnert, J.A., Schuster, S., Szymaniak-Vits, M., Kern, W.V. 2011b. Determination of real-time efflux phenotypes in *Escherichia coli* AcrB binding pocket phenylalanine mutants using a 1, 2'-dinaphthylamine efflux assay. *PLoS One*, 6(6), e21196.
- Brown, A.R., Etefagh, K.A., Todd, D., Cole, P.S., Egan, J.M., Foil, D.H., Graf, T.N., Schindler, B.D., Kaatz, G.W., Cech, N.B. 2015. A mass spectrometry-based assay for improved quantitative measurements of efflux pump inhibition. *PloS One*, 10(5), e0124814.
- Cai, H., Rose, K., Liang, L.H., Dunham, S., Stover, C. 2009. Development of a liquid chromatography/mass spectrometry-based drug accumulation assay in *Pseudomonas aeruginosa*. *Anal Biochem*, 385(2), 321-5.
- Chazotte, B. 2011. Labeling nuclear DNA with Hoechst 33342. Cold Spring Harbor Protocols, 2011(1), pdb-prot5557.

- Chen, Q.Y., Li, D.H., Yang, H.H., Zhu, Q.Z., Xu, J.G., Zhao, Y. 1999. Interaction of a novel red-region fluorescent probe, Nile Blue, with DNA and its application to nucleic acids assay. *Analyst*, 124(6), 901-6.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2016. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Seventeenth Informational Supplement. M100-S17. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, pp. 52-59.
- Coldham, N.G., Webber, M., Woodward, M.J., Piddock, L.J.V. 2010. A 96-well plate fluorescence assay for assessment of cellular permeability and active efflux in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*, 65, 1655-63.
- Costa R. 2018. Contribuição do efluxo para a emergência da resistência em bactérias persistentes. Tese de Mestrado em Ciências Biomédicas. Unidade de Microbiologia Médica. Instituto de Higiene e Medicina Tropical.
- Cox, G., & Wright, G.D. 2013. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol*, 303(6-7), 287-92.
- Crowley, L.C., Marfell, B.J., Scott, A.P., Boughaba, J.A., Chojnowski, G., Christensen, M.E., Waterhouse, N.J. 2016. Dead cert: measuring cell death. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(12), pdb-top070318.
- da Silva, P.E.A., Machado, D., Ramos, D., Couto, I., von Groll, A., Viveiros, M. 2016. Efflux pumps in Mycobacteria: antimicrobial resistance, physiological functions, and role in pathogenicity. In: Li, X.-Z., Elkins C.A., Zgurskaya, H.I. (ed.) *Efflux-mediated antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, regulation and clinical implications*. Switzerland: Adis, pp. 527-59.
- DeMarco, C.E., Cushing, L.A., Frempong-Manso, E., Seo, S. M., Jaravaza, T. A., Kaatz, G.W. 2007. Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and biocides in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 3235-9.
- Duarte, A. 2014a. Agentes antibacterianos: mecanismos de acção e de resistência. In: Barroso, H., Meliço-Silvestre, A., Taveira, N. (ed.) *Microbiologia Médica Volume 1*. Lisboa, Portugal: Lidel – Edições Técnicas, Lda., pp. 211-227.
- Duarte, A. 2014b. *Enterobacteriaceae*. In: Barroso, H., Meliço-Silvestre, A., Taveira, N. (ed.) *Microbiologia Médica Volume 1*. Lisboa, Portugal: Lidel – Edições Técnicas, Lda., pp. 342-357.
- Gattuso, H., Besancenot, V., Grandemange, S., Marazzi, M., Monari, A. 2016. From non-covalent binding to irreversible DNA lesions: Nile Blue and Nile Red as photosensitizing agents. *Sci Rep*, 6, 28480.
- Greenspan, P., Mayer, E. P., Fowler, S.D. 1985. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol*, 100(3), 965-73.

- Gröblacher, B., Kunert, O., F. Bucar, F. 2012. Compounds of *Alpinia katsumadai* as potential efflux inhibitors in *Mycobacterium smegmatis*. *Bioorg Med Chem*, 20(8), 2701-6.
- Gu, H., Chen, A., Song, X., Brasch, M. E., Henderson, J. H., Ren, D. 2016. How *Escherichia coli* lands and forms cell clusters on a surface: a new role of surface topography. *Sci Rep*, 6, 29516.
- Huda, N., Lee, E. W., Chen, J., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T., Tsuchiya, T. 2003. Molecular cloning and characterization of an ABC multidrug efflux pump, VcaM, in non-O1 *Vibrio cholerae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(8), 2413-7.
- Ihmels, H., Otto, D. 2005. Intercalation of organic dye molecules into double-stranded DNA-general principles and recent developments. *Top Curr Chem*, 258, 161-204.
- Iyer, R., Erwin, A. L. 2015a. Direct measurement of efflux in *Pseudomonas aeruginosa* using an environment-sensitive fluorescent dye. *Res Microbiol*, 166(6), 516-24.
- Iyer, R., Ferrari, A., Rijnbrand, R., Erwin, A. L. 2015b. A fluorescent microplate assay quantifies bacterial efflux and demonstrates two distinct compound binding sites in AcrB. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(4), 2388-97.
- Jana, B., Panja, S., Saha, S., Basu, T. 2009. Mechanism of protonophores-mediated induction of heat-shock response in *Escherichia coli*. *BMC Microbiol*, 9(1), 20.
- Jernaes, M.W., Steen, H.B. 1994. Staining of *Escherichia coli* for flow cytometry: influx and efflux of ethidium bromide. *Cytometry*, 17(4):302-309.
- Kern, W.V., Steinke, P., Schumacher, A., Schuster, S., Baum, H.V., Bohnert, J.A. 2006. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*, 57(2), 339-43.
- Krishan A., Hamelik R.M. 2005. Flow cytometric monitoring of fluorescent drug retention and efflux. In: Blumenthal R.D. (eds) Chemosensitivity: Volume II. Methods in Molecular Medicine, vol 111, pp. 149-66. Humana Press, Totowa, NJ.
- Kristiansen, M.M., Leandro, C., Ordway, D., Martins, M., Viveiros, M., Pacheco, T., Molnar, J., Kristiansen, J.E., Amaral, L. 2006. Thioridazine reduces resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by inhibiting a reserpine-sensitive efflux pump. *In vivo*, 20(3), 361-6.
- Lamers, R.P., Cavallari, J.F., Burrows, L.L. 2013. The efflux inhibitor phenylalanine-arginine beta-naphthylamide (PAβN) permeabilizes the outer membrane of gram-negative bacteria. *PLoS One*, 8(3), e60666.
- Lederberg, E. 1951. Lysogenicity in *Escherichia coli* K-12. *Genetics*, 36, 560.
- LePecq, J.B., Paoletti, C. 1967. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids: physical - chemical characterization. *J Mol Biol*, 27(1), 87-106.

Li, X.-Z., Elkins, C.A., Zgurskaya, H.I. Efflux-mediated antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, regulation and clinical implications. Switzerland: Adis, Cham - Springer International Publishing, Switzerland; pp.1-848.

Li, X.-Z., Nikaido, H. 2009. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs*, 69(12), 1555-623.

Li, X.-Z., Nikaido, H. 2016. Antimicrobial drug efflux pumps in *Escherichia coli*. In: Li, X.-Z., Elkins C.A., Zgurskaya, H.I. (ed.) Efflux-mediated antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, regulation and clinical implications. Switzerland: Adis, Cham – Springer International Publishing, Switzerland; pp. 219-59.

Ling, B.D., Zhang L., Li, X.Z. 2016. Antimicrobial resistance and drug efflux pumps in *Acinetobacter*. In: Efflux-mediated antimicrobial resistance in bacteria. mechanisms, regulation and clinical implications. Li, X., Elkins, C.A., Zgurskaya, H.I. Eds.; Adis, Cham – Springer International Publishing, Switzerland; pp. 329-58.

Linton, K.J., Higgins, C.F. 1998. The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol Microbiol*, 28(1), 5-13.

Machado, D., Coelho, T.S., Perdigão, J., Pereira, C., Couto, I., Portugal, I., Maschmann, R., Ramos, D., von Groll, A., Rossetti, M., da Silva, P.A., Viveiros, M. 2017a. Interplay between mutations and efflux in drug resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Microbiol*, 8, 711.

Machado, D., Fernandes, L., Costa, S., Cannalire, R., Manfroni, G., Tabarrini, O., Couto, I., Sabatini, S., Viveiros, M. 2017b. Mode of action of the 2-phenylquinoline efflux inhibitor PQQ4R against *Escherichia coli*. *PeerJ*, 5, e3168.

Machado, L., Spengler, G., Evaristo, M., Handzlik, J., Molnár, J., Viveiros, M., Kiec-Kononowicz, K., Amaral, L. 2011. Biological activity of twenty-three hydantoin derivatives on intrinsic efflux pump system of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis NCTC 13349. *In Vivo*, 25, 769-72.

Marquez, B. 2005. Bacterial efflux systems and efflux pump inhibitors. *Biochimie*, 87(12), 1137-47.

Martinez, J.L., Baquero, F. 2000. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 44(7), 1771-7.

Martins, M., McCusker, M.P., Viveiros, M., Couto, I., Fanning, S., Pagès, J. M., Amaral, L. 2013. A simple method for assessment of MDR bacteria for over-expressed efflux pumps. *Open Microbiol J*, 7, (Supply 1-M6), 72-82.

Martins, M., Viveiros, M., Couto, I., Costa, 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*, 25, 171-8.

- Mergny, J.L., Collier, D., Rougée, M., Montenay-Garestier, T., Hélène, C. 1991. Intercalation of ethidium bromide into a triple-stranded oligonucleotide. *Nucleic Acids Res*, 19(7), 1521-6.
- Mousa, J.J., Bruner, S.D. 2016. Structural and mechanistic diversity of multidrug transporters. *Nat Prod Rep*, 33(11), 1255-67.
- Munita, J.M., Arias, C.A. 2016. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectr*, 4(2), VMBF-0016-2015.
- National Center for Biotechnology Information. 2018a. PubChem Compound Database; CID=14710, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14710> (acedido 9 Junho, 2018).
- National Center for Biotechnology Information. 2018b. PubChem Compound Database; CID=65182, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/65182> (acedido 9 Junho, 2018).
- National Center for Biotechnology Information. 2018c. PubChem Compound Database; CID=1464, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1464> (acedido 9 Junho, 2018).
- National Center for Biotechnology Information. 2018d. PubChem Compound Database; CID=5360743, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5360743> (acedido 9 Junho, 2018).
- Nikaido, H., Takatsuka, Y. 2009. Mechanisms of RND multidrug e3fflux pumps. *Biochim Biophys Acta*, 1794(5), 769-81.
- Ohene- Agyei, T., Mowla, R., Rahman, T., Venter, H. 2014. Phytochemicals increase the antibacterial activity of antibiotics by acting on a drug efflux pump. *Microbiol Open*, 3(6), 885-96.
- Okuso, H., Ma, D., Nikaido, H. 1996. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J Bacteriol*, 178(1), pp. 306-8.
- Olivares, J. A., Bernardini, A., Garcia-Leon, G., Corona, F., Sanchez, M. B., Martinez, J. L. 2013. The intrinsic resistome of bacterial pathogens. *Front Microbiol*, 4, 103.
- Olive, P.L., Chaplin, D.J., Durand, R.E. 1985. Pharmacokinetics, binding and distribution of Hoechst 33342 in spheroids and murine tumours. *Br J Cancer*, 52(5), 739.
- Olmsted III, J., Kearns, D.R. 1977. Mechanism of ethidium bromide fluorescence enhancement on binding to nucleic acids. *Biochemistry*, 16(16), 3647-54.
- Paixão, L., Rodrigues, L., Couto, I., Martins, M., Fernandes, P., de Carvalho, C.C.C.R., Monteiro, G. A., Sansonetty, F., Amaral, L., Viveiros, M. 2009. Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in *Escherichia coli*. *J Biol Eng*, 3, 1-13.
- Paul, J.H. 1982. Use of Hoechst dyes 33258 and 33342 for enumeration of attached and planktonic bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 43(4), 939-44.

- Piddock, L.J. 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev*, 19(2), 382-402.
- Portugal, J., Waring, M.J. 1988. Assignment of DNA binding sites for 4', 6-diamidine-2-phenylindole and bisbenzimidazole (Hoechst 33258). A comparative footprinting study. *Biochim Biophys Acta - Gene Structure and Expression*, 949(2), 158-68.
- Putman, M., Van Veen, H.W., Konings, W.N. 2000. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64(4), 672-93.
- Quentin, Y., Fichant, G. 2000. ABCdb: an ABC transporter database. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2(4), 501-4.
- Rees, D. C., Johnson, E., Lewinson, O. 2009. ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(3), 218.
- Richmond, G.E., Chua, K.L., Piddock, L.J. 2013. Efflux in *Acinetobacter baumannii* can be determined by measuring accumulation of H33342 (bis-benzamide). *J Antimicrob Chemother*, 68, 1594-600.
- Riss, L.T., Moravec, R., Niles, A., Duellman, S., Benink A. H., Worzella, J. T., Minor, L. 2013. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.  
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/pdf/Bookshelf\\_NBK144065.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/pdf/Bookshelf_NBK144065.pdf)
- Saier Jr, M.H., Paulsen, I.T. 2001. Phylogeny of multidrug transporters. *Semin Cell Dev Biol*, 12(3), 205-13.
- Sakhtah, H., Koyama, L., Zhang, Y., Morales, D. K., Fields, B. L., Price-Whelan, A., Hogan, D.A., Shepard, K., Dietrich, L.E. 2016. The *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump MexGHI-OpmD transports a natural phenazine that controls gene expression and biofilm development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(25), E3538-E3547.
- Sapula S.A., Brown M.H. 2016. Antimicrobial drug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. In: Li X.Z., Elkins C., Zgurskaya H. (eds) Efflux-mediated antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, regulation and clinical implications. Switzerland: Adis, Cham – Springer International Publishing, Switzerland; pp.165-195.
- Sincock, S.A., Robinson, J.P. 2001. Flow cytometric analysis of microorganisms. *Methods Cell Biol*, 64, 511-37.
- Sonnet, P., Izard, D., Mullié, C. 2012. Prevalence of efflux-mediated ciprofloxacin and levofloxacin resistance in recent clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and its reversal by the efflux pump inhibitors 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenylalanine-arginine- $\beta$ -naphthylamide. *Int J Antimicrob Agents*, 39(1), 77-80.
- Sousa, J.C.F. 2000. *Enterobacteriaceae*. In: Ferreira, W. C., Sousa, J. C., Lima, N. (ed.) Microbiologia. Lisboa, Portugal: Lidel – Edições Técnicas, Lda., pp. 99-109.

- Tomchick, R., Mandel, H.G. 1964. Biochemical effects of ethidium bromide in micro-organisms. *Microbiology*, 36(2), 225-36.
- Verstrepen, K.J., Van Laere, S.D., Vercammen, J., Derdelinckx, G., Dufour, J.P., Pretorius, I.S., Winderickx, J., Thevelein, J.M., Delvaux, F.R. 2004 The *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyl transferase Atf1p is localized in lipid particles. *Yeast*, 21, 367-77.
- Vidal-Aroca, F., Meng, A., Minz, T., Page, M.G., Dreier, J. 2009. Use of resazurin to detect mefloquine as an efflux-pump inhibitor in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *J Microbiol Methods*, 79(2), 232-7.
- 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. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(8), 3578-82.
- Viveiros, M., Martins, A., Paixão, L., Rodrigues, L., Martins, M., Couto, I., Fahrnich, E., Kern, W.V., Amaral, L. 2008. Demonstration of intrinsic efflux activity of *Escherichia coli* K-12 AG100 by an automated ethidium bromide method. *Int J Antimicrob Agents*, 31, 1458-1462.
- Viveiros, M., Rodrigues, L., Martins, M., Couto, I., Spengler, G., Martins A., Amaral, L. 2010. Evaluation of efflux activity of bacteria by a semi-automated fluorometric system. In: Gillespie, S. H., McHugh, T. D. (ed.) *Antibiotic Resistance Protocols*. 2<sup>nd</sup> Edition. New York, USA: Springer Science+Business Media, LLC: Humana Press, pp. 159-172.
- Walberg, M., Gaustad, P., Steen, H.B. 1999. Uptake kinetics of nucleic acid targeting dyes in *S. aureus*, *E. faecalis* and *B. cereus*: a flow cytometric study. *J Microbiol Methods*, 35(2), 167-76.
- Walsh, C. 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, 406(6797), 775-81.
- Webber, M.A., Piddock. L.J., 2003. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother*. 51(1), 9-11.
- Wilkens, S. 2015. Structure and mechanism of ABC transporters,. *F1000Prime Rep*, 7, 14.
- Zhang, X., Kiechle, F.L. 1998. Hoechst 33342 induces apoptosis and alters TATA box binding protein/DNA complexes in nuclei from BC3H-1 myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 248(1), 18-21.