



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Aplicação de um método fluorométrico em placa de 96 poços
para a detecção de actividade de efluxo em bactérias**

Samuel Filipe Jesus Antunes

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

OUTUBRO, 2017



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Aplicação de um método fluorométrico em placa de 96 poços
para a detecção de actividade de efluxo em bactérias**

Autor: Samuel Filipe Jesus Antunes

Orientador: Professor Doutor Miguel Viveiros

Coorientador: Doutora Diana Machado

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^o UID/Multi/04413/2013 e bolsa de Pós-Doutoramento Ref^o SFRH/BPD/100688/2014 (DM).

OUTUBRO, 2017

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

Agradecimentos

Após a realização deste trabalho, quero agradecer às pessoas que de maneira directa ou indirecta contribuíram para a sua concretização.

Ao meu Orientador, Professor Doutor Miguel Viveiros, Director do Grupo de Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, agradeço pela sua orientação, pelas palavras de incentivo e sabedoria e pela simpatia demonstrada ao longo da elaboração deste trabalho.

À minha Co-orientadora, Doutora Diana Machado, obrigado pela orientação dada, pela dedicação e partilha de conhecimentos.

À Unidade de Microbiologia Médica, Grupo de Micobactérias, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, quero agradecer pelas condições disponibilizadas para a elaboração deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório agradeço-lhes pelo companheirismo demonstrado e um agradecimento especial à Jéssica Antunes pela ajuda dada e pela disponibilidade na fase final deste trabalho.

Aos meus amigos mais próximos agradeço-lhes pelos momentos de descontração e diversão.

Aos meus pais, pois sem eles nada disto seria possível, agradeço-lhes pelo carinho, dedicação, compreensão e apoio que me mostraram ao longo deste último ano.

A todos, um muito obrigado!

Resumo

A resistência mediada por efluxo a compostos antimicrobianos é reconhecida como um importante mecanismo de resistência quer em células eucariotas quer em células procariotas. As bombas de efluxo são proteínas da membrana que têm como função proteger as células de efeitos tóxicos, facilitando a saída de moléculas nocivas para o espaço extracelular.

Com a emergência da multirresistência a compostos antimicrobianos devido à sobreexpressão e sobre-actividade de bombas de efluxo em estirpes patogénicas, torna-se importante o desenvolvimento de métodos que permitam detectar e quantificar a actividade dos sistemas de efluxo em células bacterianas.

O objectivo deste trabalho consistiu em testar, avaliar e comparar uma metodologia descrita por Coldham *et al.* em 2010, que se baseia na detecção de actividade de efluxo em bactérias usando o método fluorométrico em placa de 96 poços, aqui usando *Escherichia coli* (Gram-negativa) e *Lactobacillus plantarum* (Gram-positiva) como modelos e o fluorímetro Synergy HT Microplate Reader. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos com o método fluorométrico semiautomático desenvolvido na Unidade de Microbiologia Médica, IHMT/NOVA, para o fluorímetro e termociclador em tempo real Rotor-Gene 3000, como referência. Simultaneamente foi avaliado o efeito sinérgico de compostos inibidores de efluxo na resistência intrínseca aos antibióticos nestas duas espécies modelo.

Os resultados obtidos demonstraram que a) os inibidores de efluxo testados, tioridazina, clorpromazina, carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona e a arilpiperazina possuem efeito sinérgico significativo nos níveis de resistência intrínseca aos antibióticos nestas duas espécies modelo, diminuindo significativamente a CMI dos antibióticos: em *E. coli* o efeito modulador variou de 4x a 32x enquanto em *L. plantarum* variou de 64x a 128x; e b) o fluorímetro Synergy HT Microplate Reader pode ser considerado uma alternativa ao fluorímetro e termociclador em tempo real Rotor-Gene 3000. Ambos os aparelhos apresentaram resultados e capacidades analíticas semelhantes permitindo efectuar análises comparativas equivalentes de actividade de efluxo.

Destes resultados podemos concluir que os inibidores de efluxo testados possuem efeito sinérgico significativo nos níveis de resistência intrínseca aos antibióticos nas duas espécies modelo testadas e que o método fluorométrico em placa de 96 poços usado para a detecção de actividade de efluxo em bactérias é confiável e reprodutível e que pode ser uma alternativa segura do ponto de vista da biossegurança para a determinação da actividade de efluxo em tempo real em estirpes clínicas multirresistentes.

Palavras-chave

Bombas de efluxo, Synergy HT, Rotor-Gene 3000, *E. coli*, *L. plantarum*

Abstract

The resistance to antimicrobial compounds mediated by efflux is recognized as an important mechanism of resistance in both eukaryotic and prokaryotic cells. Efflux pumps are membrane proteins whose function is to protect the cells from toxic effects, facilitating the escape of harmful molecules into the extracellular space.

With the emergence of multidrug resistance due to overexpression and over-activity of efflux pumps in pathogenic strains, it is important to develop methods to detect and quantify the activity of efflux systems in bacterial cells.

The aim of this work was to test, evaluate and compare a methodology described by Coldham *et al.* in 2010, which is based on the direct detection of efflux activity in bacteria using the fluorometric method in a 96-well plate format, here using *Escherichia coli* (Gram-negative) and *Lactobacillus plantarum* (Gram-positive) as models and the fluorimeter Synergy HT Microplate Reader. The results obtained were compared with those obtained with the semi-automated fluorometric method developed at the Unit of Medical Microbiology, IHMT/NOVA, for use within the fluorimeter and thermocycler Rotor-Gene 3000, as reference. Simultaneously, it was evaluated the synergistic effect of inhibitors of efflux in the intrinsic resistance to antibiotics in these two model species.

The results obtained demonstrated that: a) the efflux inhibitors tested, thioridazine, chlorpromazine, carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone and the arylpiperazine have significant synergistic effect on intrinsic drug resistance levels in these two model species, significantly decreasing the MIC of the antibiotics: for *E. coli* the modulator effect ranged from 4x to 32x while for *L. plantarum* ranged from 64x to 128x; and b) the fluorimeter Synergy HT Microplate Reader can be considered an alternative to the fluorimeter and real-time thermocycler Rotor-Gene 3000. Both systems showed similar results and analytical performance allowing equivalent comparative analysis of efflux capacity.

From these results we can conclude that the efflux inhibitors tested have significant synergistic effect on intrinsic antibiotic resistance levels in the two model species tested and that the 96-well plate fluorometric method used for detection of efflux activity in bacteria is reliable and reproducible and can be a safe alternative in terms of biosecurity for the determination of real-time efflux activity in clinical multidrug resistant strains.

Keywords

Efflux pumps, Synergy HT, Rotor Gene 3000, *E. coli*, *L. plantarum*

Índice geral

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Índice Geral.....	iv
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas	x
1. Introdução	1
1.1. Mecanismos de acção e resistência aos antibióticos	1
1.2. Resistência mediada por efluxo em bactérias	3
1.2.1. Transportadores primários.....	4
1.2.2. Transportadores secundários	5
1.2.2.1. Superfamília “Major Facilitator” (MFS)	6
1.2.2.2. Família “Small Multi-drug Resistance” (SMR)	7
1.2.2.3. Família “Multidrug and Toxic compound Extrusion” (MATE).....	8
1.2.2.4. Superfamília “Resistance Nodulation and cell Division” (RND)	9
1.3. A relevância clinica da resistência mediada por bombas de efluxo em bactérias Gram-negativas	10
1.4. Métodos utilizados na detecção de actividade de efluxo em bactérias	13
1.4.1. Avaliação indirecta da actividade de efluxo.....	13
1.4.1.1. Determinação de concentrações mínimas inibitórias na presença e ausência de inibidores de efluxo	13
1.4.1.2. Método de “ EtBr Cartwheel”	14
1.4.2. Avaliação da actividade de efluxo em tempo real.....	14

1.4.2.1. Determinação dos níveis de acumulação de substratos de bombas de efluxo	18
1.5. <i>Escherichia coli</i> e <i>Lactobacillus plantarum</i> como modelos experimentais.....	24
1.5.1. <i>E. coli</i>	24
1.5.2. <i>Lactobacillus plantarum</i>	25
1.6. Objectivos desta Dissertação.....	27
2. Material e Métodos	28
2.1. Material	28
2.1.1. Estirpes bacterianas	28
2.1.2. Meios de cultura e soluções.....	28
2.2. Métodos.....	31
2.2.1. Crescimento e manutenção das estirpes bacterianas	31
2.2.2. Determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMI) pelo método de diluição em microplaca de 96 poços para os antibióticos, inibidores de efluxo e EtBr	31
2.2.3. Determinação de CMIs pelo método de diluição em microplaca de 96 poços para os antibióticos e EtBr na presença de compostos inibidores de efluxo	33
2.2.4. Método fluorométrico semiautomático	34
2.2.4.1. Preparação das estirpes bacterianas.....	34
2.2.4.2. Método fluorométrico semiautomático usando o fluorímetro e termociclador em tempo real Rotor-Gene 3000	35
2.2.4.2.1. Ensaio de acumulação de EtBr: determinação da concentração de equilíbrio.....	35
2.2.4.2.2. Ensaio de acumulação de EtBr na presença de inibidores de efluxo.....	36
2.2.4.3. Método fluorométrico semiautomático usando o fluorímetro Synergy HT Microplate Reader	37
2.2.4.3.1. Ensaio de acumulação de EtBr: determinação da concentração de equilíbrio.....	38

2.2.4.3.2. Ensaio de acumulação de EtBr na presença de inibidores de efluxo.....	38
3. Resultados e Discussão.....	40
3.1. Avaliação da actividade dos inibidores de bombas de efluxo através da determinação de concentrações mínimas inibitórias.....	41
3.1.1. Determinação das concentrações mínimas inibitórias de antibióticos, substratos e inibidores de efluxo para as estirpes <i>E. coli</i> AG100, <i>E. coli</i> AG100A e <i>L. plantarum</i> ATCC14917.....	41
3.1.2. Determinação das concentrações mínimas inibitórias dos antibióticos e EtBr na presença de compostos inibidores de efluxo para as estirpes <i>E. coli</i> AG100, <i>E. coli</i> AG100A e <i>L. plantarum</i> ATCC14917	44
3.2. Comparação do método fluorométrico semiautomático em termociclador de tempo real Rotor-Gene 3000 com o Synergy HT Microplate Reader.....	48
3.2.1. <i>E. coli</i> AG100.....	49
3.2.1.1. Determinação da concentração de equilíbrio de EtBr	49
3.2.1.2. Determinação dos níveis de acumulação de EtBr na presença e ausência de inibidores de efluxo	51
3.2.2. <i>E. coli</i> AG100A.....	54
3.2.2.1. Determinação da concentração de equilíbrio de EtBr	54
3.2.2.2. Determinação dos níveis de acumulação de EtBr na presença e ausência de inibidores de efluxo	56
3.2.3. <i>L. plantarum</i> ATCC14917	59
3.2.3.1. Determinação da concentração de equilíbrio de EtBr	59
3.2.3.2. Determinação dos níveis de acumulação de EtBr na presença e ausência de inibidores de efluxo	62
4. Conclusões.....	66
5. Referências bibliográficas.....	68

Índice de Figuras

Figura 1. Representação esquemática dos principais mecanismos de acção de agentes antimicrobianos.....	2
Figura 2. Mecanismos de resistência a agentes antimicrobianos.....	3
Figura 3. Representação esquemática da bomba de efluxo da família ABC.....	5
Figura 4. Representação esquemática da bomba de efluxo da família MFS.....	7
Figura 5. Representação esquemática da bomba de efluxo da família SMR.....	8
Figura 6. Representação esquemática da bomba de efluxo da família MATE.....	8
Figura 7. Representação esquemática da bomba de efluxo da família RND.....	10
Figura 8. Substratos de bombas de efluxo mais comumente usados.....	17
Figura 9. Ensaio de acumulação de brometo de etídio para a estirpe selvagem <i>E. coli</i> AG100 e a estirpe isogénica <i>E. coli</i> AG100A com o sistema AcrAB inactivado.....	19
Figura 10. Representação esquemática da entrada e saída de brometo de etídio através da parede celular de bactérias.....	20
Figura 11. Representação esquemática de um ensaio de acumulação de brometo de etídio na presença e ausência de um composto inibidor de efluxo para uma determinada estirpe.....	21
Figura 12. Estrutura química dos compostos com actividade inibitória de efluxo mais comumente utilizados.....	23
Figura 13. Representação esquemática do modo de preparação da placa de 96 poços para a determinação das CMI's.....	33
Figura 14. Gráficos representativos dos ensaios de acumulação de EtBr na presença de concentrações crescentes de EtBr, na ausência e na presença de glucose a 0,4%, para a estirpe <i>E. coli</i> AG100 usando o Rotor-Gene 3000 e o Synergy HT Microplate Reader.....	50
Figura 15. Gráficos representativos dos ensaios de acumulação de EtBr na presença e ausência de inibidores de efluxo, com e sem glucose a 0,4%, para a estirpe <i>E. coli</i> AG100, usando o Rotor-Gene 3000 e o Synergy HT Microplate Reader.....	52
Figura 16. Gráficos representativos dos ensaios de acumulação de EtBr na presença de concentrações crescentes de EtBr, na ausência e na presença de glucose a 0,4%, para a estirpe <i>E. coli</i> AG100A usando o Rotor-Gene 3000 e o Synergy HT Microplate Reader.....	55

Figura 17. Gráficos representativos dos ensaios de acumulação de EtBr na presença e ausência de inibidores de efluxo, com e sem glucose a 0,4%, para a estirpe <i>E. coli</i> AG100A, usando o Rotor-Gene 3000 e o Synergy HT Microplate Reader.	57
Figura 18. Gráficos representativos dos ensaios de acumulação de EtBr na presença de concentrações crescentes de EtBr, na ausência e na presença de glucose a 0,4%, para a estirpe <i>L. plantarum</i> ATCC14917 usando o Rotor-Gene 3000 e o Synergy HT Microplate Reader.	60
Figura 19. Gráficos representativos dos ensaios de acumulação de EtBr na presença e ausência de inibidores de efluxo, com e sem glucose a 0,4%, para a estirpe <i>L. plantarum</i> ATCC14917, usando o Rotor-Gene 3000 e o Synergy HT Microplate Reader.	63

Índice de Tabelas

Tabela 1. Principais transportadores membranares associados a MDR em bactérias Gram-negativas.	11
Tabela 2. Substratos de bombas de efluxo mais comumente usados na avaliação da actividade de efluxo.	16
Tabela 3. Composição dos meios de cultura utilizados.	29
Tabela 4. Composição e modo de preparação de soluções utilizadas.	29
Tabela 5. Composição e modo de preparação das soluções de inibidores de efluxo e substrato de bombas de efluxo.	30
Tabela 6. Composição e modo de preparação das soluções de antibióticos utilizados. .	30
Tabela 7. Gama de concentrações dos compostos utilizados para determinação das CMI.	32
Tabela 8. Valores obtidos de CMI de antibióticos e do substrato de bombas de efluxo EtBr para as estirpes <i>E. coli</i> AG100 e AG100A.	42
Tabela 9. Valores obtidos de CMI de antibióticos e do substrato de bombas de efluxo EtBr para a estirpe <i>L. plantarum</i> ATCC14917.	43
Tabela 10. Valores obtidos de CMI de compostos inibidores de efluxo para as estirpes <i>E. coli</i> AG100, <i>E. coli</i> AG100A e <i>L. plantarum</i> ATCC14917.	44
Tabela 11. Valores obtidos de CMI para os antibióticos e EtBr na presença dos inibidores de sistemas de efluxo (a ¼ da CMI) para as duas estirpes de <i>E. coli</i> , AG100 e AG100A.	45
Tabela 12. Valores obtidos de CMI para os antibióticos e EtBr na presença dos inibidores de sistemas de efluxo (a ¼ da CMI) para <i>L. plantarum</i> ATCC14917.	47
Tabela 13. Valores de fluorescência final relativa para os inibidores de efluxo em estudo.	53
Tabela 14. Valores de fluorescência final relativa para os inibidores de efluxo em estudo.	58
Tabela 15. Valores de fluorescência final relativa para os inibidores de efluxo em estudo.	64
Tabela 16. Comparação entre o fluorímetro e termociclador em tempo real Rotor-Gene 3000 e fluorímetro Synergy HT Microplate Reader.	66

Lista de Abreviaturas

ABC	Do inglês “(ATP)-Binding Cassette”
ADP	Adenosina difosfato, do inglês “adenosine diphosphate”
AMP	Ampicilina
ATB	Antibiótico
ATP	Adenosina trifosfato, do inglês “adenosine 5’-triphosphate”
BE	Bomba de efluxo
CAN	Canamicina
CCCP	Carbonil cianeto <i>m</i> -clorofenilhidrazona
CLSI	“Clinical and Laboratory Standards Institute”
CMI	Concentração mínima inibitória
CPZ	Clorpromazina
CHL	Cloranfenicol
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês “deoxyribonucleic acid”
DO	Densidade óptica
EtBr	Brometo de etídio, do inglês “ethidium bromide”
ERI	Eritromicina
FFR	Fluorescência final relativa
FM	Factor de modulação
FMP	Força motriz protónica
G	Glucose
H⁺	Ião hidrogénio
IE	Inibidor de efluxo
LA	Do inglês “Luria Bertani Agar”
LB	Do inglês “Luria Bertani Broth”
MATE	Do inglês “Multidrug and toxic compound extrusion”
MDR	Do inglês “Multidrug resistant”
MFP	Do inglês “Membrane fusion protein”
MFS	Do inglês “Major facilitator superfamily”
MHB	Do inglês “Mueller-Hinton broth”
Na⁺	Ião sódio

NMP	“1-(1-naphthylmethyl)-piperazine”
OMP	Do inglês “Outer membrane protein”
PBS	Do inglês “Phosphate buffered saline”
Pi	Do inglês “Inorganic phosphate”
pH	Potencial de hidrogénio
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês “Ribonucleic acid”
RND	Do inglês “Resistance nodulation division”
Rpm	Rotações por minuto
SMR	Do inglês “Small multidrug resistance”
TET	Tetraciclina
TMS	Do inglês “Transmembranar segments”
TSA	Do inglês “Trypticase Soy Agar”
TSB	Do inglês “Trypticase Soy Broth”
TZ	Tioridazina
UFR	Unidades de fluorescência relativa

Unidades:

g	Gramma
L	Litro
M	Molar
mg	Miligramma
min	Minuto
ml	Mililitro
nm	Nanómetro
µg	Microgramma
µl	Microlitro
°C	Grau Celsius

1. Introdução

A descoberta e introdução do uso de antibióticos na terapêutica de infecções bacterianas representaram um dos maiores avanços científicos do século XX (Kumar e Schweizer, 2005). No começo dos anos 40, iniciava-se a “era dos antibióticos” que aparentava estar destinada a vencer a grande batalha contra as infecções, erradicando doenças e aumentando consideravelmente a esperança de vida (Wannmacher, 2004). No entanto, o uso indiscriminado destes na prática clínica levou à emergência de estirpes de bactérias patogénicas resistentes (Kummerer, 2003). A emergência de estirpes de bactérias resistentes e multirresistentes a compostos antimicrobianos constitui actualmente um problema sério de saúde pública que urge combater.

1.1. Mecanismos de acção e resistência aos antibióticos

Os agentes antimicrobianos são substâncias que inibem o crescimento microbiano ou eliminam os microrganismos. Entre estes incluem-se os antibióticos, que são substâncias produzidas por bactérias ou fungos, e os compostos produzidos sinteticamente, designados por compostos antimicrobianos (De Sousa, 2006).

Os agentes antimicrobianos afectam a viabilidade dos microrganismos através de cinco mecanismos principais de actuação: 1) inibição da síntese da parede celular; 2) inibição da síntese proteica; 3) inibição da síntese de ácidos nucleicos; 4) alteração da permeabilidade da membrana celular; e 5) inibição competitiva de metabolitos essenciais (Tortora *et al.*, 2016).

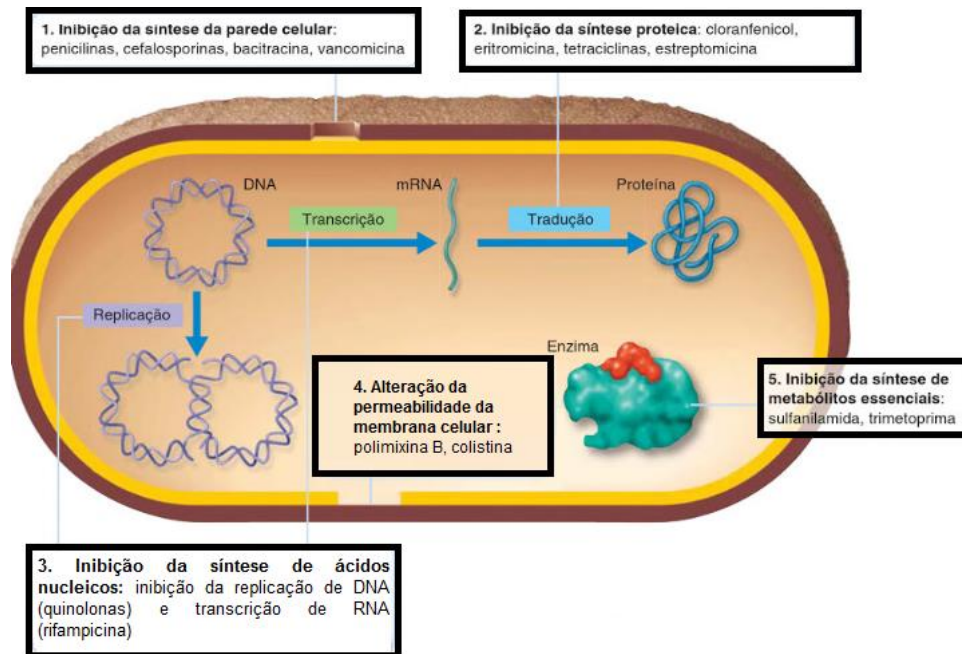


Figura 1. Representação esquemática dos principais mecanismos de ação de agentes antimicrobianos (adaptado de Tortora *et al.*, 2016).

Com o passar do tempo e com a pressão antibiótica, os microrganismos desenvolveram diversos mecanismos para evitar aos efeitos bactericidas ou bacteriostáticos dos agentes antimicrobianos (Pallasch, 2003). Os mecanismos que levam à resistência são os seguintes: 1) inativação enzimática do antibiótico; 2) alteração da molécula alvo; 3) diminuição da permeabilidade da parede celular; e 4) extrusão do antibiótico por bombas de efluxo (Levy *et al.*, 2004).

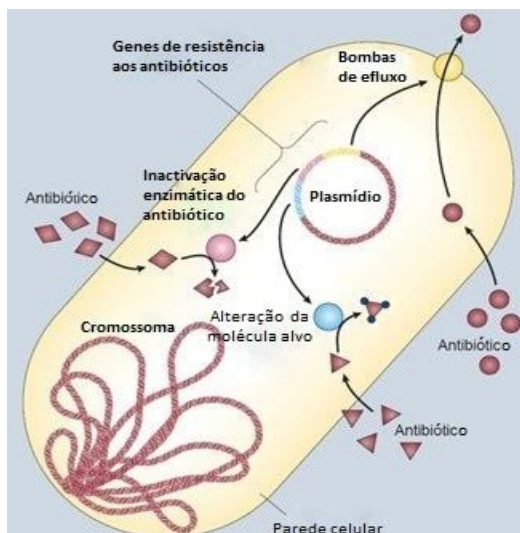


Figura 2. Mecanismos de resistência a agentes antimicrobianos (adaptado de Levy *et al.*, 2004).

A resistência de um microrganismo a um determinado agente antimicrobiano pode ser uma característica intrínseca da bactéria, como p.ex., a reduzida permeabilidade da membrana celular e os sistemas de efluxo ativos (ver ponto 1.2) (Normark *et al.*, 2002; Blair e Piddock, 2009), ou pode ser adquirida pela ocorrência de mutações genéticas ou pela aquisição de genes exógenos localizados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos ou transposões (Giedraitiene *et al.*, 2011).

1.2. Resistência mediada por efluxo em bactérias

A resistência bacteriana a diversas classes de agentes antimicrobianos e outros compostos pode ocorrer através da actividade de proteínas de transporte membranares, designadas por bombas de efluxo (Cristóbal *et al.*, 2006). A sua função é transportar compostos através da membrana celular e reduzir a acumulação intracelular de substâncias tóxicas, modulando assim a acumulação e saída de compostos em diversos tipos de células. As bombas de efluxo encontram-se não só em procariontes como também em organismos eucariontes superiores (Webber e Piddock, 2003).

As bombas de efluxo tanto podem ser codificadas em plasmídeos como no cromossoma bacteriano, podendo ser específicas, facilitando o efluxo de exclusivamente um substrato, ou não-específicas se transportarem vários substratos, desde antibióticos a corantes e biocidas (Pidcock, 2006).

Os sistemas de efluxo podem ser classificados em duas grandes classes, de acordo com as suas características bioenergéticas e estruturais, tais como, transportadores primários ou transportadores secundários. Os transportadores primários são sistemas dependentes de ATP e os transportadores secundários actuam com base no gradiente do potencial electroquímico da membrana plasmática, a força motriz prótonica (FMP) (Azevedo e Sunkel, 2012).

1.2.1. Transportadores primários

Os sistemas de transporte primários catalisam simultaneamente uma reacção química e um processo de transporte de um ou mais substratos contra os seus gradientes de concentração. Os transportadores primários englobam a superfamília de transportadores “ATP Binding Cassette” (ABC) (Azevedo e Sunkel, 2012).

A superfamília ABC inclui várias centenas de proteínas transportadoras presentes praticamente em todos os organismos, desde procariontes a eucariontes e estão envolvidas quer no influxo quer no efluxo de diversos compostos e outras substâncias (Azevedo e Sunkel, 2012). Possuem um papel importante no transporte de toxinas, compostos antimicrobianos e de muitas outras substâncias incluindo iões, açúcares, aminoácidos, fosfolípidos, colesterol, péptidos, polissacarídeos ou mesmo proteínas. Estes transportadores podem ser específicos para um só substrato ou não-específicos transportando vários substratos (Azevedo e Sunkel, 2012).

Os transportadores ABC são proteínas integrais de membrana que facilitam o transporte de moléculas através da membrana lipídica contra o gradiente de concentração, utilizando energia proveniente da hidrólise de ATP (Moussatova *et al.*, 2008).

Apresentam uma organização estrutural constituída por quatro domínios: dois transmembranares (TMS, do inglês “transmembranar segments”), através dos quais as

moléculas transportadas atravessam as membranas, e dois citosólicos, onde se encontram os locais de ligação ao ATP. Estas proteínas têm sido identificadas como responsáveis pela resistência a agentes antimicrobianos em microrganismos patogénicos, pelo que estes sistemas de transporte tem sido reconhecidos como alvos moleculares para o desenho de novos compostos (Azevedo e Sunkel, 2012).

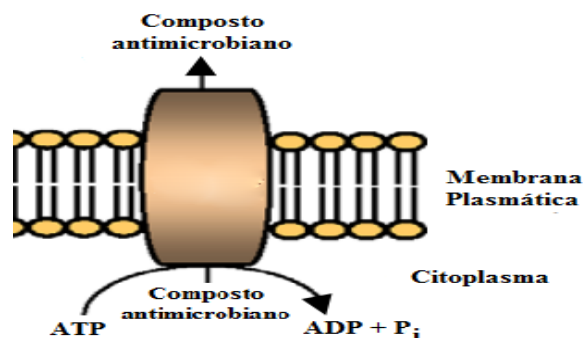


Figura 3. Representação esquemática da bomba de efluxo da família ABC (adaptado de Kumar e Schweizer, 2005).

Entre os transportadores ABC melhor estudados está o transportador MDR1 ou P-gp (do inglês “multidrug transporter-1” e “P-glycoprotein”, respectivamente) que, quando sobreexpresso em células tumorais humanas, promove o efluxo de diferentes compostos anticancerígenos, diminuindo assim, a eficácia do tratamento quimioterápico (Azevedo e Sunkel, 2012). Um representante desta superfamília em *Escherichia coli* é a bomba de efluxo MacB associada ao efluxo de macrólidos (Kobayashi *et al.*, 2001).

1.2.2. Transportadores secundários

São proteínas de membrana que utilizam a energia acumulada na forma de gradientes electroquímicos, gerados pelos sistemas de transporte primários para mediar o movimento de substâncias através da membrana (Azevedo e Sunkel, 2012).

Os processos de transporte secundário estão descritos como sendo de dois tipos, co-transportes e uniportes electroforéticos. No primeiro caso, também designado por transporte acoplado, o substrato pode ser transportado contra o seu gradiente de

concentração, usando a energia libertada pelo deslocamento de um ião (co-substrato) a favor do seu gradiente; os dois, substrato e co-substrato, podem mover-se no mesmo sentido ou em sentidos opostos, designando-se, respectivamente, por simporte ou antiporte. A proteína que medeia o processo é específica para o substrato e para o ião acoplado, e a acumulação do substrato pressupõe que a concentração do co-substrato seja diferente em cada um dos lados da membrana. O transporte secundário pode também efectuar-se pelo deslocamento de uma única molécula contra o seu gradiente de concentração química, mas a favor do gradiente eléctrico – uniporte electroforético (Azevedo e Sunkel, 2012).

Com base nas semelhanças e no tamanho das estruturas primárias e secundárias estes transportadores são subdivididos em quatro famílias (Marquez, 2005): “Major Facilitator Superfamily” (MFS); família “Small Multidrug Resistance” (SMR); família “Multidrug and Toxic compound Extrusion” (MATE) e superfamília “Resistance Nodulation and cell Division” (RND).

1.2.2.1. Superfamília “Major Facilitator” (MFS)

São proteínas integrais de membrana responsáveis pelo transporte do meio externo para o meio interno da célula (influxo) de aminoácidos, açúcares, entre muitos outros nutrientes e pelo transporte do meio intracelular para o meio extracelular (extrusão) de toxinas celulares, metabolitos intermediários, e compostos antimicrobianos por mecanismos de simporte e antiporte (Pao *et al.*, 1998; Kumar e Schweizer, 2005).

Os transportadores MFS estão presentes tanto em eucariontes como em procariontes. Trata-se de uma família ancestral numerosa e diversa que inclui centenas de membros diferenciados e engloba pelo menos 74 famílias agrupadas de acordo com a afinidade para o soluto e conta actualmente com mais de 10000 proteínas sequenciadas (Pao *et al.*, 1998; Madej e Kaback, 2013)

As proteínas que compõem esta superfamília podem ser agrupadas consoante o número de TMS que possuem: as que apresentam 12 TMS e as que apresentam 14 TMS (Pao *et al.*, 1998; Kumar e Schweizer, 2005).

De entre os sistemas de efluxo MFS melhor estudados encontra-se a bomba de efluxo NorA de *Staphylococcus aureus*, uma bomba de efluxo de componente único e a EmrAB-TolC de *E. coli*, que funciona como bomba de efluxo de dois componentes sendo composta por uma proteína de fusão membranar (MFP, do inglês “membrane fusion protein”) e componentes ancorados na membrana externa designados por proteínas de membrana externa (OMP, do inglês “outer membrane protein”) (Kumar e Schweizer, 2005).

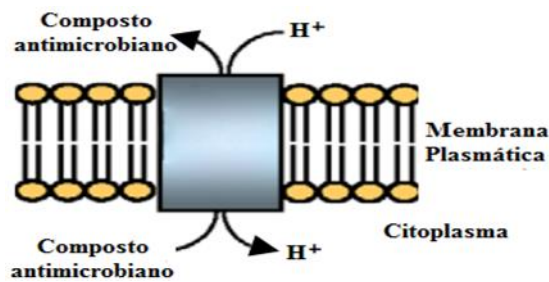


Figura 4. Representação esquemática da bomba de efluxo da família MFS (adaptado de Kumar e Schweizer, 2005).

1.2.2.2. Família “Small Multi-drug Resistance” (SMR)

A família SMR consiste em proteínas membranares com aproximadamente 110 resíduos de aminoácidos, hidrofóbicos e 4 TMS sendo energizadas pela FMP (Kumar e Schweizer, 2005).

As mais bem caracterizadas bombas de efluxo pertencentes a esta família incluem a bomba de efluxo Smr de *S. aureus* e a bomba de efluxo EmrE de *E. coli*, que estão implicadas no efluxo de corantes, antibióticos e cátions (Kumar e Schweizer, 2005).

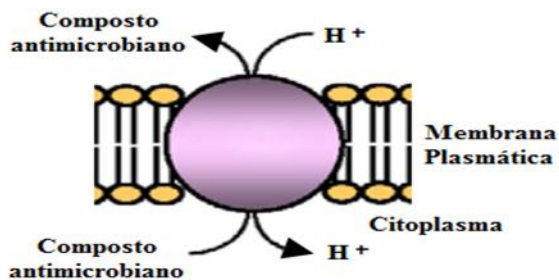


Figura 5. Representação esquemática da bomba de efluxo da família SMR (adaptado de Kumar e Schweizer, 2005).

1.2.2.3. Família “Multidrug and Toxic compound Extrusion” (MATE)

A família MATE é constituída por proteínas transportadoras que possuem aproximadamente 450 aminoácidos organizados espacialmente em 12 hélices e que exibem uma topologia de membrana semelhante à da família MFS, o que levou a que inicialmente se pensasse que pertenceriam à mesma família. Utilizam a FMP ou o gradiente transmembranar de iões sódio como fonte de energia para a extrusão de diversos substratos (Putman *et al.*, 2000; Kumar e Schweizer, 2005).

Esta família foi identificada a quando da caracterização da proteína NorM, dependente de Na^+ , de *Vibrio parahaemolyticus*, e da caracterização da sua homóloga Ydhe em *E. coli* (Kumar e Schweizer, 2005).

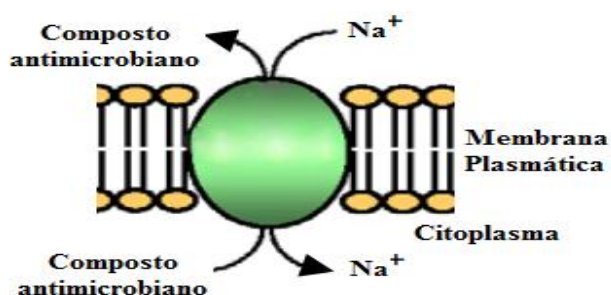


Figura 6. Representação esquemática da bomba de efluxo da família MATE (adaptado de Kumar e Schweizer, 2005).

1.2.2.4. Superfamília “Resistance Nodulation and cell Division” (RND)

Os membros pertencentes à superfamília de transportadores RND foram identificados em eubactérias, arqueobactérias e eucariontes e são maioritariamente codificados por genes localizados no cromossoma. Estas proteínas são constituídas por grandes cadeias polipeptídicas com cerca de 1300 resíduos de aminoácidos (Kumar e Schweizer, 2005).

Todos os membros da superfamília RND catalisam o efluxo de substratos por um mecanismo de antiporte mediado por iões H^+ (Li e Nikaido, 2009). As bombas de efluxo RND têm um papel importante na resistência intrínseca e adquirida, em bactérias Gram-negativas, a uma grande variedade de agentes antimicrobianos (Kumar e Schweizer, 2005).

Estas bombas de efluxo são constituídas por uma associação entre três proteínas, nomeadamente, uma proteína de transporte membranar com 12 TMS, uma proteína membranar externa (OMP) e uma proteína de fusão membranar (MFP), formando um canal que atravessa o espaço periplásmico, permitindo o transporte de compostos através da membrana interna e externa de bactérias Gram-negativas.

Os membros desta família melhor estudados são o sistema AcrAB-TolC de *E. coli* e o sistema MexAB-OprM de *Pseudomonas aeruginosa* (Li *et al.*, 2009; Kumar e Schweizer, 2005).

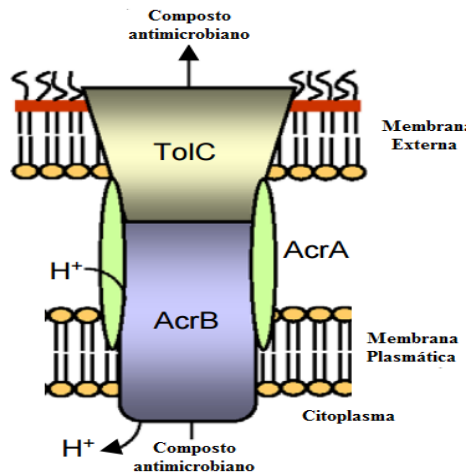


Figura 7. Representação esquemática da bomba de efluxo da família RND (adaptado de Kumar e Schweizer, 2005).

1.3. A relevância clínica da resistência mediada por bombas de efluxo em bactérias Gram-negativas

Os mecanismos de efluxo foram descritos pela primeira vez em 1980 e ganharam grande importância por serem responsáveis pela resistência bacteriana aos antibióticos quando sobreexpressos (Bambeke *et al.*, 2006).

Actualmente sabe-se que a expressão de bombas de efluxo contribui de um modo significativo para a resistência intrínseca e adquirida de bactérias, vírus, e parasitas devido à enorme variedade de substratos que reconhecem. As bombas de efluxo capazes de bombear um ou vários antibióticos são a principal causa de multirresistência (MDR, do inglês “multidrug resistance”) em isolados clínicos, tendo assim uma importante relevância clínica uma vez que conduzem a que a infecção bacteriana seja virtualmente intratável com a terapêutica habitual (Bambeke *et al.*, 2006).

As bombas de efluxo não-específicas, em estirpes selvagens, apresentam níveis basais de actividade de efluxo contribuindo para a diminuição da susceptibilidade aos antibióticos. Esta resistência intrínseca até pode ser suficientemente baixa para que as bactérias ainda sejam susceptíveis à terapia efectuada com antibióticos, no entanto, elas seriam ainda mais susceptíveis se as bombas de efluxo fossem inactivas, permitindo que doses menores de antibióticos fossem usadas na terapêutica. Este facto pode ser

especialmente importante para antibióticos com índices terapêuticos reduzidos (Lomovskaya e Watkins, 2001).

A actividade das bombas de efluxo pode actuar de modo sinérgico com outros mecanismos de resistência, o que leva a um nível elevado de resistência como também a um aumento do espectro de compostos para os quais a bactéria assume o fenótipo de resistência (Li e Nikaido, 2004). A expressão de diversas bombas de efluxo na mesma bactéria pode conduzir a fenótipos de resistência aparentemente elevados quando se avalia o mesmo substrato (Li e Nikaido, 2009).

Para combater a MDR e os problemas que daí advém, é importante investir em várias estratégias tais como o desenvolvimento de compostos com capacidades de contornar ou inibir a actividade das bombas de efluxo de forma a restaurar e preservar a função do composto antimicrobiano (Mahamound *et al.*, 2007).

As principais bombas de efluxo de bactérias clinicamente relevantes associadas a MDR em bactérias Gram-negativas estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Principais transportadores membranares associados a MDR em bactérias Gram-negativas.

Transportadores membranares	Família de transportadores	Referências
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>		
NorM	MATE	Rouquette-Loughlin <i>et al.</i> , 2003
MacAB	ABC	Rouquette-Loughlin <i>et al.</i> , 2003
FarAB	MFS	Lee <i>et al.</i> , 1999
MtrCDE	RND	Hagman <i>et al.</i> , 1997
<i>Acinetobacter baumannii</i>		
AdeABC	RND	Magnet <i>et al.</i> , 2001
AdelJK	RND	Damier-Piolle <i>et al.</i> , 2011
AdeFGH	RND	Coyne <i>et al.</i> , 2010
CraA	MFS	Roca <i>et al.</i> , 2009
AmvA	MFS	Rajamohan <i>et al.</i> , 2010
AbeM	MATE	Su <i>et al.</i> , 2005
AbeS	SMR	Srinivasan <i>et al.</i> , 2009
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
KmrA	MFS	Ogawa <i>et al.</i> , 2006
OqxAB	RND	Perez <i>et al.</i> , 2013
AcrAB	RND	Padilla <i>et al.</i> , 2010
EefABC	RND	Coudeyras <i>et al.</i> , 2008

Tabela 1 (cont). Principais transportadores membranares associados a MDR em bactérias Gram-negativas.

<i>E. coli</i>		
AcrAB	RND	Ma <i>et al.</i> , 1995
AcrD	RND	Rosenberg <i>et al.</i> , 2000
AcrEF	RND	Kawamura-Sato <i>et al.</i> , 1999
YhiUV	RND	Nishino and Yamaguchi, 2001
EmrE	SMR	Purewal, 1991
TehA	SMR	Turner <i>et al.</i> , 1997
EmrD	MFS	Naroditskaya <i>et al.</i> , 1993
EmrAB	MFS	Lomovskaya and Lewis, 1992
MdfABC	MFS	Edgar and Bibi, 1997
MacAB	ABC	Nishino and Yamaguchi, 2001
<i>Salmonella</i>		
EmrAB	MFS	Nishino <i>et al.</i> , 2006
MdfA	MFS	Nishino <i>et al.</i> , 2006
AcrAB	RND	Baucheron <i>et al.</i> , 2002
AcrD	RND	Nishino <i>et al.</i> , 2006
AcrEF	RND	Nishino <i>et al.</i> , 2006
MdtABC	RND	Nishino <i>et al.</i> , 2006
MdsAB	RND	Nishino <i>et al.</i> , 2006
Mdtk	MATE	Nishino <i>et al.</i> , 2006
MacAB	ABC	Nishino <i>et al.</i> , 2006
<i>Enterobacter</i>		
AcrAB	RND	Pradel <i>et al.</i> , 2002
EmmDR	MATE	He <i>et al.</i> , 2011
SugE	SMR	He <i>et al.</i> , 2011
<i>Pseudomonas</i>		
MexAB	RND	Srikumar <i>et al.</i> , 1998
MexXY	RND	Poole <i>et al.</i> , 2001
MexCD	RND	Srikumar <i>et al.</i> , 1998
MexEF	RND	Poole <i>et al.</i> , 2001
MexJK	RND	Chuanchuen <i>et al.</i> , 2005
MexGHI	RND	Aendekerck <i>et al.</i> , 2002
MexVW	RND	Li <i>et al.</i> , 2003
PmpM	MATE	He <i>et al.</i> , 2004

ABC, “ATP-binding cassette”; SMR, “small multidrug resistance”; MFS, “major facilitator superfamily”; RND, “resistance nodulation cell division”; MATE, “multidrug and toxic compound extrusion”.

1.4. Métodos utilizados na detecção de actividade de efluxo em bactérias

Com a emergência da MDR a compostos antimicrobianos devido à sobreexpressão e sobre-actividade de bombas de efluxo em estirpes patogénicas, torna-se importante o desenvolvimento de métodos que permitam detectar e quantificar a actividade dos sistemas de efluxo em células bacterianas (Paixão *et al.*, 2009; Viveiros *et al.*, 2010).

A actividade de efluxo em bactérias pode ser avaliada de forma indirecta ou de forma directa (Blair e Piddock, 2016).

1.4.1. Avaliação indirecta da actividade de efluxo

Uma forma de avaliar indirectamente a actividade de efluxo é através da determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMIs) para diferentes substratos na presença e ausência de inibidores de efluxo e pelo método do brometo de etídio (EtBr) em placa de agar ou “EtBr Cartwheel method” (Martins *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2013).

1.4.1.1. Determinação de concentrações mínimas inibitórias na presença e ausência de inibidores de efluxo

A CMI é definida como a menor concentração de um composto capaz de inibir o crescimento visível de um microrganismo (Pallasch, 2003).

A determinação de CMIs de um antibiótico para uma estirpe na presença e ausência de inibidores de efluxo é um método indirecto e pouco preciso mas que permite inferir se a resistência observada se deve a existência de actividade de efluxo na estirpe em estudo. O efeito inibitório dos inibidores de efluxo pode ser quantificado através do cálculo do fator de modulação (FM). O FM reflete a redução do valor da CMI de um dado antibiótico na presença de um inibidor de efluxo e é proporcional à “força inibitória” do inibidor (Coelho *et al.*, 2015). Valores de FM iguais ou superiores a 4, na presença de um inibidor de efluxo, geralmente indicam existência de actividade de efluxo em relação ao substrato que está a ser avaliado.

1.4.1.2. Método de “ EtBr Cartwheel”

O método de “EtBr Cartwheel” foi desenvolvido na Unidade de Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT). É um método rápido, simples e livre de instrumentos que permite a detecção da sobreexpressão de sistemas de efluxo em isolados clínicos MDR com base na fluorescência emitida por cada isolado em placas de agar contendo EtBr. É facilmente adaptado ao laboratório clínico de rotina e pode proporcionar informação adicional importante que define a MDR de isolados clínicos (Viveiros *et al.*, 2008).

Cada placa contém uma concentração diferente de EtBr como substrato de bombas de efluxo e pelo menos uma estirpe de referência. A concentração mais baixa de substrato capaz de produzir fluorescência é registada para cada isolado. Os isolados que apresentam fluorescência a concentrações mais baixas de EtBr têm possivelmente menor actividade de efluxo do que os isolados cuja fluorescência só é detectada em concentrações mais elevadas de EtBr. Desta forma, a concentração de EtBr capaz de emitir fluorescência num isolado com sobreexpressão de bombas de efluxo é consideravelmente superior à concentração que produz fluorescência na estirpe de referência (Martins *et al.*, 2011).

1.4.2. Avaliação da actividade de efluxo em tempo real

Actualmente estão descritas várias metodologias para a determinação de actividade de efluxo em bactérias (Blair e Piddock, 2016). No entanto, os métodos fluorométricos têm sido os métodos de eleição para detectar e quantificar o transporte de substratos fluorescentes através da parede celular de bactérias e membranas de células eucariotas (Paixão *et al.*, 2009; Viveiros *et al.*, 2010). Na sua grande maioria, estas metodologias usam moléculas fluorescentes que são substratos das bombas de efluxo em estudo e cuja concentração pode ser facilmente detectada por fluorescência. Este é o caso do método fluorométrico semiautomático para monitorização do transporte de EtBr utilizando o fluorímetro e termociclador em tempo real Rotor-Gene 3000TM (Corbett Research, Sidney, Austrália), desenvolvido e implementado na Unidade de Microbiologia Médica, IHMT (Viveiros *et al.*, 2008). Este é um método simples e directo para a detecção

da actividade de efluxo em bactérias (Paixão *et al.*, 2009), posteriormente adaptado a células eucariotas, e baseia-se em fluorimetria em tempo real usando o EtBr como marcador fluorescente. De seguida descrever-se-ão as características inerentes aos métodos fluorométricos para avaliação da actividade de efluxo em bactérias dando como exemplo o método fluorométrico semiautomático referido acima.

Os métodos mais usados para a avaliação da actividade de efluxo podem ser divididos em duas categorias: i) aqueles que avaliam directamente a actividade de efluxo, *i.e.*, a quantidade de substrato que sai da célula; e ii) aqueles em que a actividade de efluxo é inferida pela quantidade de substrato que é retido no interior da célula, proporcionando assim uma medida indirecta da actividade de efluxo. Ambos os métodos usam substratos que apresentam diferenças no nível de fluorescência quando se encontram em meio intra- ou extracelular. Na Tabela 2 estão descritos os substratos de bombas de efluxo mais comumente usados na avaliação da actividade de efluxo. Estes incluem o EtBr, um composto quaternário; o Hoechst 33342, uma bis-benzamidina; e o vermelho do Nilo, uma oxazona (Figura 8) (Olmsted *et al.*, 1977; Blair e Piddock, 2016).

Tabela 2. Substratos de bombas de efluxo mais comumente usados na avaliação da actividade de efluxo (adaptado de Blair e Piddock, 2016).

Substrato	Características	Vantagens	Desvantagens	Referências
Brometo de etídio	<ul style="list-style-type: none"> - Corante intercalador de DNA; - Emite fluorescência quando ligado ao DNA; - Comprimento de onda de excitação, 530 nm; - Comprimento de onda de emissão, 600 nm 	<ul style="list-style-type: none"> - Substrato de diversas bombas de efluxo (p.ex., AcrB-TolC) - Fácil e rápido de usar, barato e facilmente adaptado para alto rendimento 	<ul style="list-style-type: none"> - Concentra-se no citoplasma, de modo que o efluxo é lento porque deve haver um passo de dissociação e provavelmente mais de um evento de efluxo; - Provavelmente leva a subestimar o nível de efluxo. - EtBr necessita de manipulação em condições de segurança por ser considerado mutagénico 	<p>Olmsted <i>et al.</i>, 1977. Paixão <i>et al.</i>, 2009. Viveiros <i>et al.</i>, 2008. Coldham <i>et al.</i>, 2010.</p>
Hoechst 33342	<ul style="list-style-type: none"> - Corante intercalador de DNA; - Emite fluorescência quando ligado ao DNA; - Comprimento de onda de excitação, 355 nm; - Comprimento de onda de emissão, 460 nm 	<ul style="list-style-type: none"> - Fácil e rápido de usar, barato e facilmente adaptado para alto rendimento 		<p>Coldham <i>et al.</i>, 2010. Richmond <i>et al.</i>, 2013.</p>
Vermelho do Nilo	<ul style="list-style-type: none"> - Periplasmático; - Corante lipofílico que se liga aos fosfolípidos de membrana; - Fluoresce fracamente em soluções aquosas mas fortemente em ambientes não polares tais como a membrana; - Comprimento de onda de excitação, 552 nm; - Comprimento de onda de emissão, 636 nm; - Ensaio utiliza células em fase estacionária 	<ul style="list-style-type: none"> - Periplasmático, bom para estudar bombas de efluxo RND como a AcrB; - Comprimento de onda máximo de emissão máxima (636 nm) significa que há menos problema com interferência ao medir a concorrência com outros substratos; - Melhor relação sinal / ruído do que o observado com o EtBr; - O efluxo é mais rápido do que com os corantes citoplasmáticos; - Pode ser usado para testar se os compostos são substratos de efluxo através de ensaios de competição 	<ul style="list-style-type: none"> - Não funciona bem em bactérias não fermentadoras tais como <i>Pseudomonas</i>; - Optimizado para o estudo do sistema de efluxo AcrAB-TolC 	<p>Bohnert <i>et al.</i>, 2010.</p>

Os compostos mencionados acima emitem fluorescência fraca em ambiente extracelular e fluorescência aumentada em ambientes apolares, como quando ligados aos fosfolípidos de membrana, e hidrofóbicos, como no espaço periplasmático ou citoplasma das células bacterianas. Para além disso, o EtBr e o Hoechst 33342 são agentes intercaladores de DNA pelo que quando se ligam ao DNA os níveis de fluorescência emitidos são irreversíveis (Blair e Piddock, 2016). Para qualquer um destes compostos, o nível de fluorescência emitido pode ser usado para determinar a quantidade de substrato que se acumula no interior da célula ao longo do tempo.

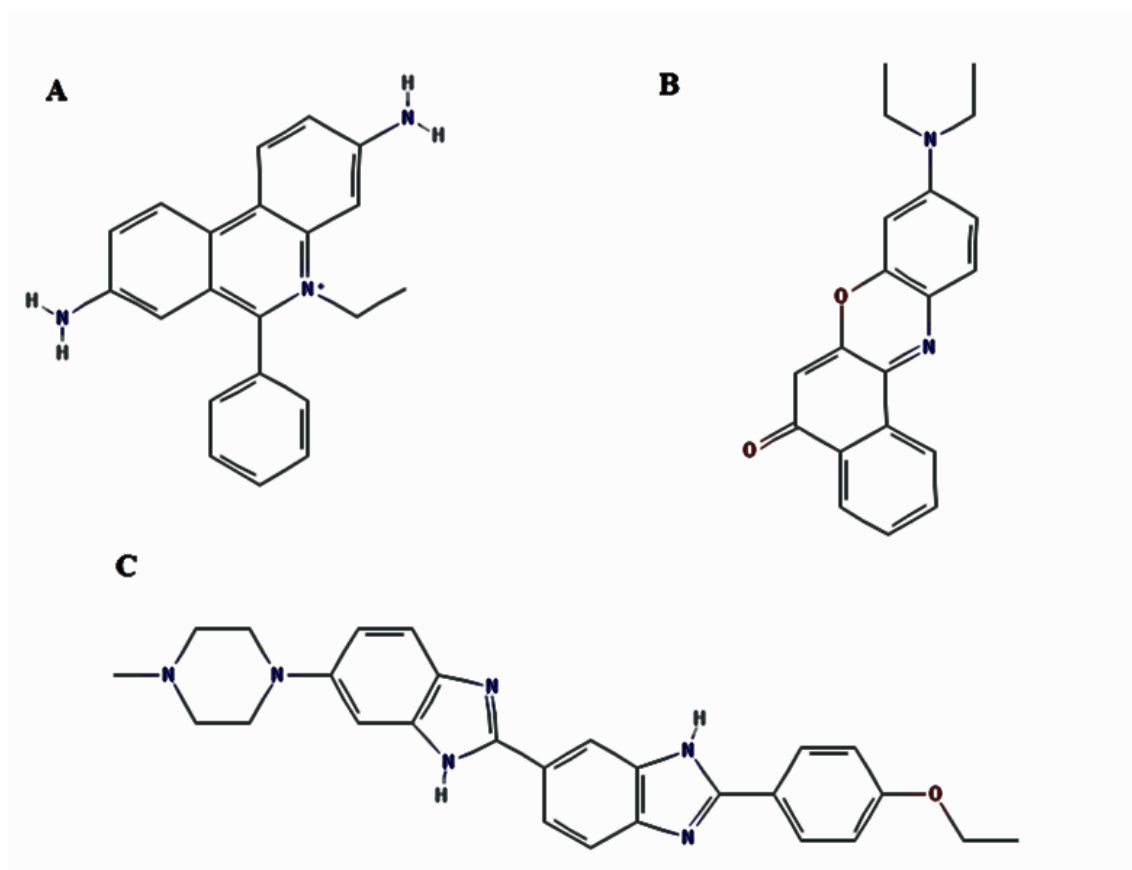


Figura 8. Substratos de bombas de efluxo mais comumente usados. A - Brometo de etídio (Pubchem, 2017. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14710> - acedido a 18-5-2017); B - Vermelho do Nilo (Pubchem, 2017. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/65182> - acedido a 18-5-2017); e C - Hoechst 33342 (Pubchem, 2017. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1464> - acedido a 18-5-2017).

O método fluorométrico semiautomático usa o EtBr como substrato fluorescente. O EtBr foi seleccionado como marcador fluorescente (i) porque, como referido acima, emite fluorescência reduzida quando se encontra em solução aquosa (fora das células), fluorescência esta que aumenta grandemente quando se encontra em ambientes apolares e hidrofóbicos, como quando se liga a componentes de membrana e acumulam no interior das células (ii) e porque é um substrato universal de bombas de efluxo podendo ser usado como marcador quer em bactérias Gram-positivas quer em Gram-negativas (Viveiros *et al.*, 2010).

1.4.2.1 Determinação dos níveis de acumulação de substratos de bombas de efluxo

A capacidade de efluxo de uma determinada estirpe pode ser avaliada indirectamente através da determinação dos níveis de acumulação intracelular de compostos que são substratos de bombas de efluxo. Os métodos que avaliam a acumulação de substratos baseiam-se na premissa de que quanto maior é a concentração de substrato no interior da célula (maior fluorescência = maior acumulação) menor será a capacidade de efluxo da estirpe em estudo. Nestes ensaios, as células são incubadas na presença do substrato de bombas de efluxo seleccionado (p.ex., EtBr) e os níveis de fluorescência monitorizados ao longo do tempo. A fluorescência aumenta com o tempo à medida que a concentração de substrato aumenta no interior da célula. Os ensaios de acumulação de substratos são muito uteis para comparar os níveis de efluxo entre estirpes isogénicas (*i.e.* com genes que codificam para as bombas de efluxo inactivados ou sobre-expressos) e também para comparar a actividade de efluxo entre estirpes clinicamente relacionadas. Por exemplo, uma estirpe com actividade de efluxo deficiente (p.ex., com uma bomba de efluxo inactivada) irá acumular mais do que a estirpe isogénica com o sistema de efluxo intacto e funcional (p.ex., estirpe selvagem) uma vez que não consegue efluxar o substrato eficazmente (Figura 9) (Viveiros *et al.*, 2008; Paixão *et al.*, 2009; Viveiros *et al.*, 2010; Blair e Piddock., 2016).

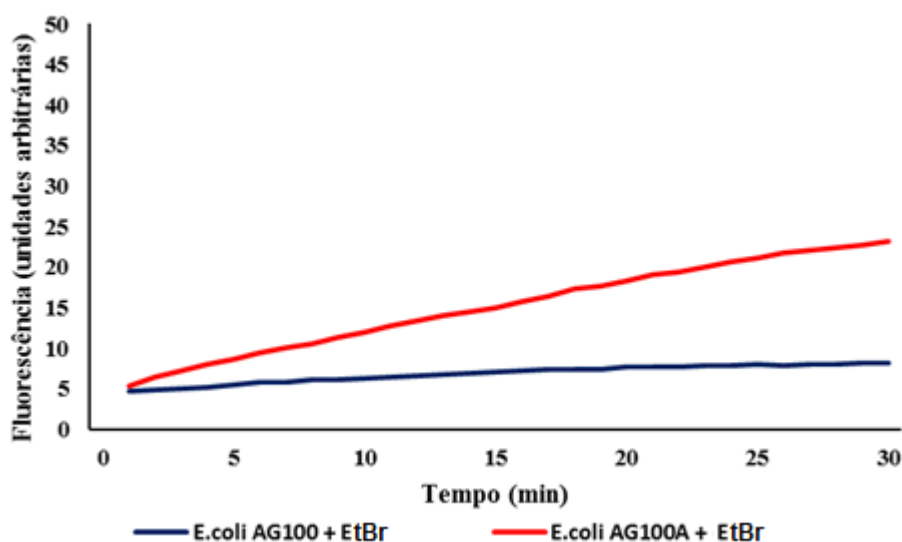


Figura 9. Ensaio de acumulação de brometo de etídio para a estirpe selvagem *E. coli* AG100 (curva azul) e a estirpe isogénica *E. coli* AG100A com o sistema AcrAB inactivado (curva vermelha).

No entanto, os métodos que avaliam a acumulação de substratos tendem a ser pouco sensíveis uma vez que apenas fornecem uma medida indirecta das variações de efluxo de uma estirpe. A quantidade de substrato que é acumulado pode ser afectada por factores intrínsecos à estirpe em estudo, como por exemplo, a permeabilidade da parede celular que, por sua vez, vai afectar a taxa de entrada do substrato na célula. Deste modo, a capacidade total da célula acumular um determinado substrato resulta da combinação entre a sua taxa de efluxo por transporte activo e a taxa de influxo por difusão passiva desse mesmo substrato (Paixão *et al.*, 2009). Isto torna os ensaios de acumulação pouco uteis para avaliar os níveis de efluxo entre estirpes não isogénicas, como p.ex., colecções de estirpes clínicas, uma vez que estes isolados tendem a apresentar diferenças significativas de permeabilidade da sua membrana externa levando a diferentes taxas de entrada dos substratos (Blair e Piddock, 2016). Do mesmo modo, os dados resultantes dos ensaios de acumulação não podem ser usados para tirar conclusões sobre a cinética de efluxo se a taxas de influxo do substrato não forem conhecidas (Paixão *et al.*, 2009) podendo ser apenas usados para determinar a concentração de equilíbrio ou “steady state” entre a entrada e saída dos substratos (Figura 10A).

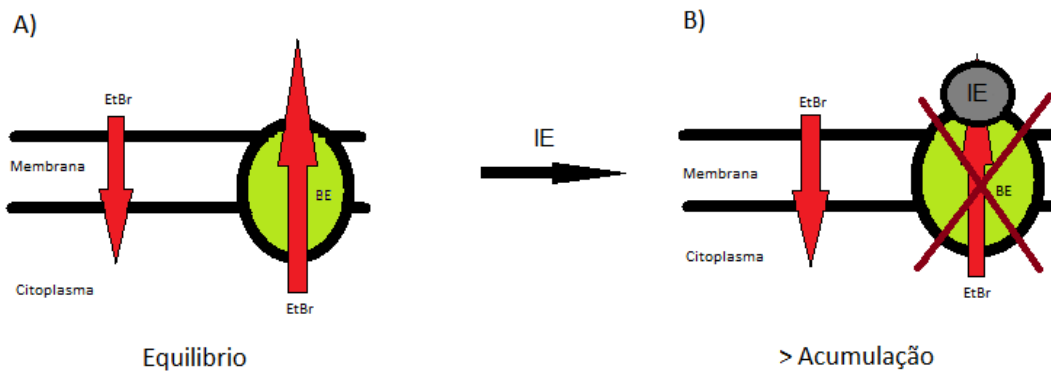


Figura 10. Representação esquemática da entrada e saída de brometo de etídio através da parede celular de bactérias. A) Estado de equilíbrio: a concentração de substrato que entra é semelhante à concentração de substrato que sai; B) Acumulação de brometo de etídio na presença de inibidores de efluxo: a concentração de brometo de etídio aumenta no interior das células devido a inibição do seu efluxo devido à acção inibitória de compostos inibidores de efluxo. IE, inibidor de efluxo; BE, bomba de efluxo (adaptado de Costa, 2009).

Uma grande vantagem dos ensaios de acumulação é permitir a avaliação de compostos relativamente à sua capacidade para inibir sistemas de efluxo. Na presença de compostos inibidores de efluxo o estado de equilíbrio apresentado acima (Figura 10A) é alterado uma vez que o efluxo do substrato é inibido devido a acção do inibidor de efluxo proporcionando assim uma maior acumulação de substrato no interior da célula (Figura 10B). No entanto, para estes ensaios torna-se necessário definir determinadas variáveis, adaptadas a cada estirpe, que permitam detectar diferenças na acumulação de substratos, nomeadamente (i) determinar qual a concentração de equilíbrio do substrato para a qual as células apresentam uma acumulação de substrato residual e basal que resulta do equilíbrio entre a sua entrada por difusão passiva e sua saída por efluxo activo; (ii) e determinar as concentrações dos compostos a testar de modo a que não afectem a viabilidade celular (Viveiros *et al.*, 2008). Determinadas estas variáveis, as células são incubadas na presença do substrato de efluxo na concentração de equilíbrio determinada e na presença do inibidor na concentração seleccionada para que não afecte a viabilidade, e o aumento dos níveis de acumulação de EtBr monitorizado ao longo do tempo (pode variar de acordo com a espécie). Num ensaio de acumulação de EtBr, como o exemplificado na Figura 11, é possível observar o aumento da acumulação deste substrato

no interior das células na presença (curva vermelha) e na ausência (curva azul) de um inibidor de efluxo. O diferencial (Δ) entre os valores de fluorescência finais entre as células incubadas na presença do inibidor de efluxo e a estirpe que esteve em contacto unicamente com substrato corresponde à capacidade do inibidor em inibir o efluxo do substrato, uma vez que a concentração de substrato que é usada (concentração de equilíbrio) reflecte a capacidade de extrusão celular (Paixão *et al.*, 2009).

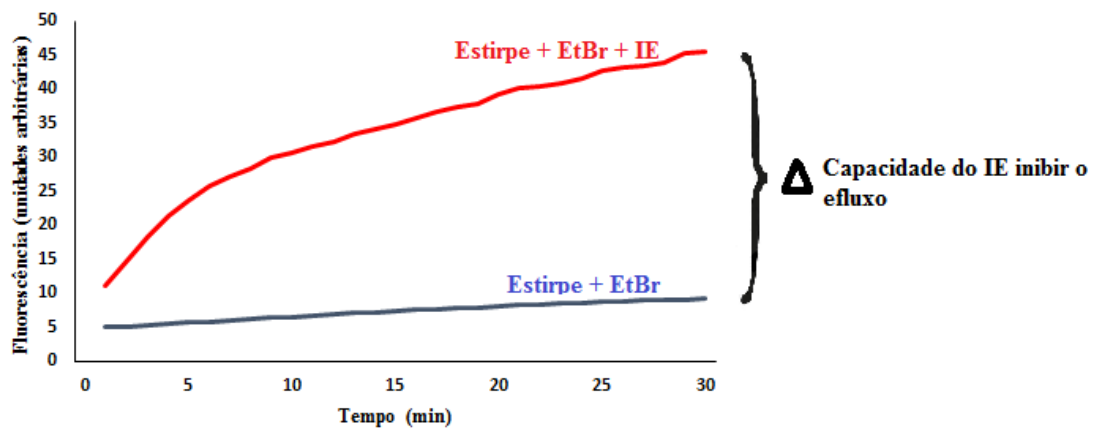


Figura 11. Representação esquemática de um ensaio de acumulação de brometo de etídio na presença e ausência de um composto inibidor de efluxo para uma determinada estirpe. Na presença de inibidores de efluxo existe maior acumulação de brometo de etídio (curva a vermelho) e na sua ausência a capacidade de efluxo da estirpe não é inibida, ocorrendo assim uma menor acumulação de brometo de etídio (curva a azul).

Deste modo, a diferença de fluorescência entre as duas curvas (curva azul – estirpe incubada na presença de EtBr, e curva vermelha – estirpe incubada na presença de EtBr e inibidor de efluxo) demonstra o aumento da acumulação de EtBr resultante da acção do inibidor, possibilitando assim analisar e comparar a capacidade inibitória do composto em estudo. Para melhor comparar e quantificar a acção inibitória de um determinado composto, para uma determinada estirpe e entre ensaios, é usado um coeficiente relativo de inibição designado por fluorescência final relativa (FFR) calculado com recurso à seguinte fórmula: $FFR = (\text{fluorescência relativa no ultimo ponto da curva de acumulação de EtBr na presença do inibidor} - \text{fluorescência relativa no último ponto da curva de$

acumulação EtBr) / fluorescência relativa no último ponto da curva de acumulação EtBr (Machado *et al.*, 2011). Nesta fórmula, a fluorescência relativa no último ponto do gráfico de acumulação na presença do inibidor de efluxo é comparada com a fluorescência relativa no último ponto da curva na ausência do inibidor, obtendo-se assim um índice de inibição relativo e normalizado para o inibidor de efluxo em estudo (Machado *et al.*, 2011). Na Figura 12 encontram-se exemplos mais significativos de compostos descritos na literatura como inibidores de efluxo em bactérias, nomeadamente a clorpromazina (CPZ), o carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona (CCCP), a arilpiperazina (NMP) e a tioridazina (TZ) (Bohnert e Kern, 2016).

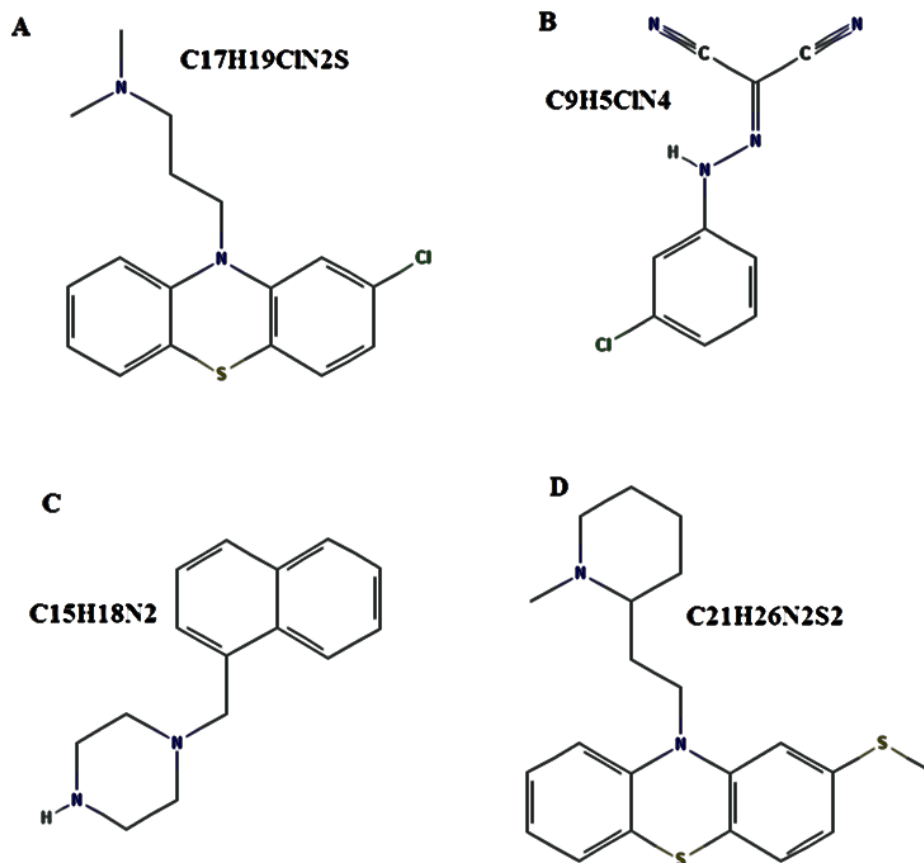


Figura 12. Estrutura química dos compostos com actividade inibitória de efluxo mais comumente utilizados. A - Clorpromazina (CPZ) (Pubchem, 2017. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2726> - acedido a 18-5-2017); B - Carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona (CCCP) (Pubchem, 2017. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2603> - acedido a 18-5-2017); C - Aripiperazina (NMP) (Pubchem, 2017. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-1-Naphthylmethyl_piperazine - acedido a 18-5-2017); D - Tioridazina (TZ) (Pubchem, 2017. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5452> - acedido a 18-5-2017).

1.5. *Escherichia coli* e *Lactobacillus plantarum* como modelos experimentais

Para a elaboração desta dissertação foram seleccionados como modelos experimentais os microrganismos *E. coli* e *L. plantarum*.

1.5.1. *E. coli*

E. coli pertence ao género *Escherichia*, família *Enterobacteriaceae*. Foi descrita pela primeira vez pelo pediatra alemão Theodor Escherich, em 1885 (Chen e Frankel, 2005). É um bacilo Gram-negativo com cerca de 1 µm de largura e 3 µm de comprimento, aeróbio e anaeróbio facultativo (Ferreira *et al.*, 2000; Azevedo e Sunkel, 2012). *E. coli* possui flagelação peritrica que lhe proporciona mobilidade, e fimbrias ou adesinas que permitem a sua fixação ao hospedeiro impedindo o seu arrastamento pela urina ou fezes líquidas (Azevedo e Sunkel, 2012; Ferreira *et al.*, 2000).

O nucleóide desta espécie bacteriana contém uma única molécula de DNA circular e o citoplasma contém um ou mais plasmídeos. Possui uma grande quantidade de ribossomas, cerca de 15000, o que é uma evidência da elevada capacidade de resposta metabólica desta bactéria (Nelson *et al.*, 2014).

Dentro deste género, é a espécie mais importante clinicamente. As estirpes de *E. coli* podem ser agrupadas em três grupos: comensais, intestinais patogénicas, e extra-intestinais (Barroso *et al.*, 2014). As estirpes comensais tem como habitat o sistema gastrointestinal humano e de outros mamíferos estabelecendo com o primeiro uma relação simbiótica produzindo vitaminas que são absorvidas pelo hospedeiro e usando a glucose deste para produzir todos os constituintes celulares de que necessita (Kaper *et al.*, 2004). No entanto podem causar infecções oportunistas em doentes imunodeprimidos. As estirpes intestinais patogénicas são agrupadas de acordo com as infecções que causam e factores de virulência que produzem: *E. coli* enteropatogénica, *E. coli* enteroagregativa, *E. coli* difusamente aderente, *E. coli* enterotoxinogénica, *E. coli* enteroinvasiva e *E. coli* entero-hemorrágica (Barroso *et al.*, 2014). Por último, as estirpes extraintestinais estão associadas a infecções do tracto urinário (*E. coli* uropatogénica) e meningites do recém-nascido (Barroso *et al.*, 2014).

As infecções causadas por *E. coli* constituem um sério problema de saúde pública devido à emergência de estirpes resistentes às principais classes de antibióticos, p.ex., β -lactâmicos, quinolonas e tetraciclina (Kaper *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2000). A resistência mediada por efluxo possui um papel particularmente importante na resistência às principais classes de antibióticos (Viveiros *et al.*, 2007). A caracterização do genoma da estirpe de referência *E. coli* ATCC8739 revelou a existência de cerca de 612 transportadores. Entre estes encontram-se 218 ABC, 75 MFS, 11 RND, 4 SMR e 3 MATE (Elbourne *et al.*, 2017). O sistema AcrAB-TolC, pertencente à classe RND, é o principal sistema de efluxo em *E. coli* sendo responsável pela extrusão de uma variedade de fármacos (tetraciclina, cloranfenicol, fluoroquinolonas, β -lactâmicos, eritromicina, novobiocina, ácido fusídico, ácido nalidíxico), corantes (EtBr, acriflavina, violeta de cristal), detergentes (dodecil sulfato de sódio (SDS), triton X-100 e triclosan), sais biliares e ácidos gordos (Elkins e Nikaido, 2002; Piddock, 2006; Nikaido, 2011).

1.5.2. *Lactobacillus plantarum*

L. plantarum é uma espécie bacteriana pertencente ao numeroso e diversificado género *Lactobacillus*, família *Lactobacillaceae* (Siezen *et al.*, 2011). É uma bactéria ácido-láctica, Gram-positiva em forma de bastonete, não-patogénica, de crescimento lento, anaeróbia facultativa, e heterofermentativa facultativa. É capaz de crescer em elevadas quantidades de sal e apresenta uma gama de temperaturas de crescimento entre 15°C a 45°C. Quando comparada com outras espécies de *Lactobacillus* difere destas devido ao seu genoma relativamente grande (p.ex., *L. plantarum* WCFS1 - 3348.624 kb), o que indica uma maior capacidade de adaptação a diversas condições ambientais (Kleerebezem *et al.*, 2003; Rao *et al.*, 2004; Farnworth, 2008).

Apresenta capacidade de fermentar diferentes carboidratos e possui uma elevada tolerância ao pH (níveis tão baixos como 3.2) (Kleerebezem *et al.*, 2003; Alegría *et al.*, 2004). Por este motivo é um habitante natural do sistema gastrointestinal humano (Kleerebezem *et al.*, 2003) sobrevivendo à passagem através das condições ácidas do estômago humano, onde o pH é geralmente inferior a 4.0 (Johanson *et al.*, 1993).

L. plantarum é considerada uma espécie flexível e versátil que é encontrada numa variedade de nichos ambientais, ocorrendo frequentemente na maioria dos alimentos fermentados, especialmente quando o alimento tem como base material vegetal (Siezen *et al.*, 2011).

Estas bactérias têm grande importância em produtos alimentares como o leite e seus derivados e no fabrico de vários produtos fermentados onde são dominantes e responsáveis pelas alterações ocorridas durante a fermentação. Por este motivo, são usadas como culturas “starter” na indústria e na fermentação de alimentos de origem animal, uma vez que ao metabolizarem os hidratos de carbono, produzem entre outros compostos, ácido láctico que diminui drasticamente o pH, enzimas que transformam nutrientes e compostos antimicrobianos impedindo o crescimento de bactérias patogénicas, contribuindo assim para a conservação, o sabor, o cheiro e a textura dos fermentados (De Vuyst e De Geest, 1999; Ruas-Madiedo *et al.*, 2002). Sendo assim é de extrema importância que as estirpes escolhidas para este processo tenham uma garantia de segurança para o consumidor.

Um dos grandes perigos associados a estes microrganismos é a sua capacidade de adquirir resistência aos antibióticos. Em *L. plantarum* as proteínas de transporte (n = 433), são de longe a maior classe de proteínas. Foram identificados até a data 169 transportadores ABC, 57 MFS, 3 SMR, 2 RND e 2 MATE (Elbourne *et al.*, 2017). Um dos grandes problemas é a ocorrência de isolados de *L. plantarum* resistentes à tetraciclina devido à presença de bombas de efluxo MFS codificadas em plasmídeos como Tet(L) e Tet(K) e genes de protecção ribossomal como a Tet(M). Estas proteínas são particularmente importantes por estarem associadas a elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposões, que são facilmente transmitidos entre bactérias (Gevers *et al.*, 2003; Ammor *et al.*, 2008; Thaker *et al.*, 2010; Ashraf e Shah, 2011; Songisepp *et al.*, 2012). Têm sido já descritos casos de infecções em Humanos, tais como endocardites, septicemias e bacteriemias, causadas por bactérias usadas na produção alimentar como *Lactobacillus*, *Saccharomyces*, *Pediococcus* e *Bifidobacterium* resistentes aos antibióticos por aquisição de genes de resistência em elementos genéticos móveis (Ashraf e Shah, 2011). Estas infecções podem ser difíceis de tratar devido às resistências que possuem.

1.6. Objectivos desta Dissertação

O objectivo deste trabalho e dissertação consistiu em testar, avaliar e comparar uma metodologia descrita em 2010, por Coldham *et al.*, (2010), para detecção directa da actividade de efluxo em bactérias, usando *E. coli* (Gram-negativa) e *L. plantarum* (Gram-positiva) como modelos, efectuando simultaneamente a avaliação do efeito sinérgico de compostos inibidores de efluxo na resistência intrínseca aos antibióticos nestas duas espécies modelos. O método descrito em 2010 por Coldham *et al.*, baseia-se na detecção de actividade de efluxo em bactérias usando o método fluorométrico em placa de 96 poços adaptado por estes autores a partir de trabalhos como os de Viveiros *et al.*, (2008) e Paixão *et al.*, (2009) com fluorometria em tempo-real, aplicado agora a fluorímetros de placas de 96 poços como o fluorímetro Synergy HT Microplate Reader. Os resultados obtidos foram comparados com o método fluorométrico semiautomático desenvolvido na Unidade de Microbiologia Médica do IHMT/NOVA, como referência e termo de comparação para monitorização do transporte de EtBr usando o fluorímetro e termociclador em tempo real Rotor Gene 3000 (Viveiros *et al.*, 2008; Paixão *et al.*, 2009; Viveiros *et al.*, 2010).

Procura-se assim testar uma nova metodologia em diferentes bactérias para que possa vir a ser futuramente uma alternativa reprodutível e segura do ponto de vista de biossegurança para a determinação de actividade de efluxo em tempo real em estirpes clínicas MDR.

2. Material e Métodos

2.1. Material

2.1.1. Estirpes bacterianas

Para a realização deste trabalho foram utilizadas três estirpes bacterianas:

- Estirpe selvagem *Escherichia coli* K-12 AG100 (*argE3 thi-1 rpsL xyl mtl Δ (gal-uvrB) supE44*), que possui o sistema de efluxo AcrAB-TolC intacto e funcional (Okuso *et al.*, 1996).
- Estirpe *Escherichia coli* K-12 AG100A (Δ *acrAB::Tn903 Kan^r*), que deriva da estirpe AG100 e que possui o sistema de efluxo AcrAB-TolC inativado devido à inserção do transposão Tn903 no operão *acrAB* (Okuso *et al.*, 1996).
- Estirpe de referência de *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* (ATCC 14917^T).

As estirpes *E. coli* AG100, AG100A, e *L. plantarum* ATCC 14917^T pertencem à coleção de culturas do Grupo de Micobactérias da Unidade de Microbiologia Médica, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa. 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

A constituição e modo de preparação dos meios de cultura, compostos e soluções utilizados ao longo do trabalho encontram-se descritos nas Tabelas 3 a 6. Os meios de cultura e soluções foram preparados com água destilada e esterilizados, quando necessário, por autoclavagem a 121°C durante 15 minutos, a 1 bar, excepto quando indicado em contrário.

Tabela 3. Composição dos meios de cultura utilizados.

Meio de cultura	Composição (por litro)
Luria Bertani agar (LA)	10 g de peptona caseína ⁽¹⁾ ; 5 g de extracto de levedura ⁽¹⁾ ; 10 g de cloreto de sódio ⁽²⁾ ; 20 g agar ⁽³⁾
Luria Bertani broth (LB)	10 g de peptona caseína ⁽¹⁾ ; 5 g de extracto de levedura ⁽¹⁾ ; 10 g de cloreto de sódio ⁽²⁾
Trypticase Soy agar (TSA) ⁽³⁾	20 g de Trypticase Soy Agar
Trypticase Soy broth (TSB) ⁽³⁾	30 g de Trypticase Soy Broth
Mueller-Hinton broth (MHB) ⁽³⁾	21 g de Muller-Hinton Broth

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

Tabela 4. Composição e modo de preparação de soluções utilizadas.

Solução ⁽¹⁾	Composição
PBS (“Phosphate Buffered Saline”) 1X, pH 7	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*

⁽¹⁾ Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha; *a solução depois de preparada foi filtrada com filtros de seringa estéreis de PVDF com 0,22 µm de diâmetro de poro da Rotilabo, Spritzenfilter Steril, Karlshure, Alemanha.

Tabela 5. Composição e modo de preparação das soluções de inibidores de efluxo e substrato de bombas de efluxo.

Solução ⁽¹⁾	Composição/Preparação da solução “stock”
Arilpiperazina (NMP) ⁽²⁾	10 mg/ml em dimetilsulfóxido (DMSO) ⁽¹⁾ Mantida a -20°C
Carbonil cianeto <i>m</i> -clorofenilhidrazona (CCCP)	10 mg/ml em DMSO Mantida a -20°C ao abrigo da luz
Clorpromazina (CPZ)	10 mg/ml em água Milli-Q Mantida a -20°C
Tioridazina (TZ)	10 mg/ml em água Milli-Q Mantida a -20°C ao abrigo da luz
Brometo de etídio (EtBr)	10 mg/ml em água Milli-Q Mantida a 4°C ao abrigo da luz

⁽¹⁾ Sigma-Aldrich; ⁽²⁾ NMP: 1-(1-Naphthylmethyl)piperazine

Tabela 6. Composição e modo de preparação das soluções de antibióticos utilizados.

Solução ⁽¹⁾	Composição/Preparação da solução “stock”
Tetraciclina (TET)	10 mg/ml em DMSO
Ampicilina (AMP)	10 mg/ml em água Milli-Q
Cloranfenicol (CHL)	10 mg/ml em DMSO
Eritromicina (ERI)	10 mg/ml em DMSO
Canamicina (CAN)	20 mg/ml em água Milli-Q
Oxacilina (OXA)	10 mg/ml em água Milli-Q
Ofloxacina (OFX)	1 mg/ml em 1% HCl

⁽¹⁾ Sigma-Aldrich; ⁽²⁾ Merk

2.2. Métodos

2.2.1. Crescimento e manutenção das estirpes bacterianas

As estirpes de *E. coli* foram crescidas a 37°C em meio LB, a 180 rpm (Thermo Scientific MaxQ 4000 Benchtop Orbital Shakers, Waltham, MA, E.U.A), ou em meio LA. Para o crescimento da estirpe *E. coli* AG100A os meios de cultura foram suplementados com 100 µg/ml de CAN de modo a evitar a perda do transposição Tn903.

A estirpe *L. plantarum* foi crescida a 37°C em meio TSB, sem agitação, ou em meio TSA.

Foram mantidos “stocks” a -80°C de culturas em meio líquido, suplementado com 10% (v/v) de glicerol (Sigma-Aldrich).

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

A CMI dos antibióticos, inibidores de efluxo e do substrato de bombas de efluxo EtBr, foi determinada através do método de microdiluição seriada em placa de 96 poços, conforme as recomendações do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2016). A CMI é definida como a menor concentração de um composto que inibe o crescimento visível de um microrganismo.

Para a determinação das CMIs para *E. coli*, prepararam-se culturas primárias das estirpes em meio LA. As placas foram incubadas a 37°C, durante 18 horas. A partir destas, foram preparadas culturas em 10 ml de meio LB, por inoculação de 3 a 4 colónias. As estirpes foram incubadas a 37°C, com agitação a 180 rpm, durante 18 horas. A densidade das culturas foi depois ajustada em meio MHB, de modo a obter uma turbidez equivalente a 0,5 da escala de McFarland.

Para a determinação das CMIs para *L. plantarum*, prepararam-se culturas primárias das estirpes em meio TSA. As placas foram incubadas a 37°C, durante 24 horas. A partir destas, foram preparadas culturas em 10 ml de meio TSB, por inoculação de 3 a 4 colonias. As estirpes foram incubadas a 37°C, sem agitação, durante 24 horas. A

densidade das culturas foi depois ajustada em meio MHB, de modo a obter uma turbidez equivalente a 0,5 da escala de McFarland.

As soluções de trabalho dos compostos a testar foram preparadas no próprio dia do ensaio, a partir das soluções “stock” de modo a obter concentrações dos antibióticos e EtBr na concentração mais elevada conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 7. Gama de concentrações dos compostos utilizados para determinação das CMI.

Composto	Gama de concentrações utilizadas (µg/ml)		
	<i>E.coli</i> AG100	<i>E.coli</i> AG100A	<i>L.plantarum</i>
Antibióticos			
AMP	-	-	0,015 - 8
CHL	-	-	0,031 - 16
TET	0,03 - 16	0,03 - 16	0,125 - 64
ERI	-	-	0,00097 - 2
OFX	0,015 - 8	0,00375 - 2	-
OXA	1,90 - 1000	0,0019 - 10	-
Inibidores de efluxo			
TZ	0,937 - 480	0,937 - 480	0,062 - 256
NMP	2 - 1024	2 - 1024	0,5 - 256
CCCP	0,5 - 256	0,5 - 256	0,031 - 256
CPZ	0,937 - 480	0,937 - 480	0,125 - 256
Substrato de efluxo			
EtBr	1,1 - 600	0,31 - 160	0,015 - 256

CMI - Concentração mínima inibitória; **TZ** - Tioridazina; **CPZ** - Clorpromazina; **CCCP** - Carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona; **NMP** - Arilpiperazina; **AMP** - Ampicilina; **CHL** - Cloranfenicol; **TET** - Tetraciclina; **ERI** - Eritromicina; **EtBr** - Brometo de etídio; **OFX** - Ofloxacina; **OXA** - Oxacilina.

As placas de 96 poços para determinação das CMI foram preparadas para um volume final de 150 µl como se descreve de seguida e se exemplifica na Figura 13: inicialmente distribuiu-se 130 µl de meio MHB em todos os poços da placa. De seguida, acrescentou-se 20 µl de meio MHB aos poços da coluna 1 (controlo negativo) e 110 µl de meio MHB e 20 µl do composto cuja CMI se pretende determinar aos poços da coluna 3. Esta coluna era a que continha a concentração mais elevada de cada composto, a partir da qual foram realizadas as diluições seriadas por um factor de dois. Para isso, retirou-se 130 µl dos poços da coluna 3 que foram adicionados aos poços da coluna 4, misturados com

uma micropipeta multicanal 3 a 4 vezes, e assim sucessivamente até à coluna 12, tendo-se descartado os últimos 130 µl. A coluna 12 corresponde à concentração mais baixa testada para cada composto. Por último, adicionou-se 20 µl do inóculo de estirpe, previamente preparado, a cada poço da placa desde a coluna 2 à coluna 12. A coluna 2 corresponde ao controlo de crescimento que contém apenas meio MHB e a estirpe. As placas foram incubadas a 37°C, durante 18 horas para *E. coli* e 24 horas para *L. plantarum*. A determinação das CMI's para cada estirpe e composto foi realizada em triplicado.

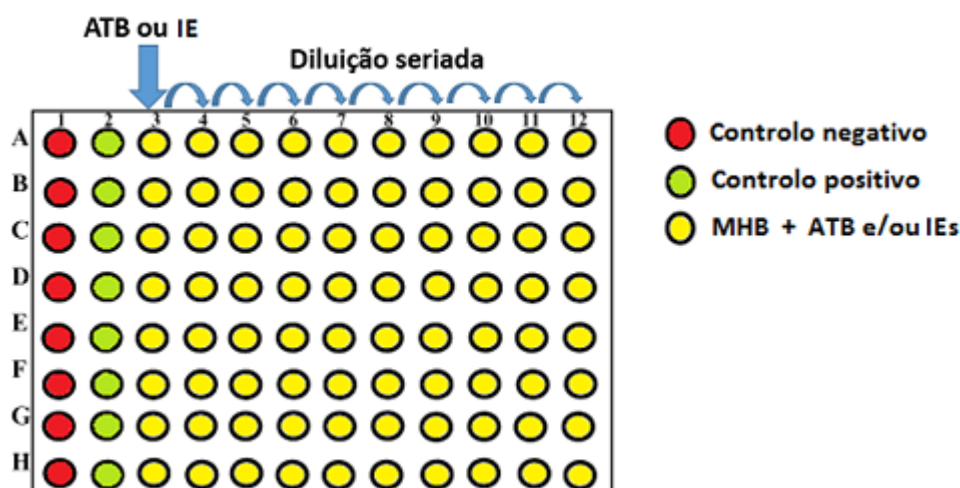


Figura 13. Representação esquemática do modo de preparação da placa de 96 poços para a determinação das CMI's.

2.2.3. Determinação de CMI's pelo método de diluição em microplaca de 96 poços para os antibióticos e EtBr na presença de compostos inibidores de efluxo

A determinação das CMI's dos antibióticos e EtBr na presença de inibidores de efluxo foi realizada conforme descrito no ponto 2.2.2, utilizando a mesma gama de concentrações testadas anteriormente (Tabela 7). Neste ensaio, após a adição ao meio de cultura dos compostos a testar e da realização das diluições seriadas destes, adicionou-se 10 µl dos inibidores de efluxo a testar aos poços contendo os antibióticos ou EtBr. As soluções de trabalho dos inibidores foram preparadas a partir das soluções “stock” de modo a obter concentrações dos inibidores de efluxo inferiores ao valor da sua CMI ($\frac{1}{4}$ da CMI), de modo a garantir a viabilidade da estirpe em estudo. As concentrações

utilizadas foram: para *E. coli* AG100, TZ a 30 µg/ml; CPZ a 30 µg/ml, NMP a 256 µg/ml e CCCP a 16 µg/ml; para *E. coli* AG100A, TZ a 3.75 µg/ml; CPZ a 15 µg/ml, NMP a 128 µg/ml e CCCP a 8 µg/ml; e para *L. plantarum*, TZ a 4 µg/ml; CPZ a 16 µg/ml, NMP a 32 µg/ml e CCCP a 2 µg/ml. Por último, adicionou-se 20 µl do inóculo de estirpe, previamente preparado, a cada poço da placa conforme descrito anteriormente. As placas foram incubadas a 37°C, durante 18 horas para *E. coli* e 24 horas para *L. plantarum*. A determinação das CMI's na presença de inibidores de efluxo para cada estirpe e composto foi realizada em triplicado.

De modo a avaliar o efeito do inibidor de efluxo na CMI dos antibióticos e EtBr, determinou-se o factor de modulação (FM) (Gröblacher *et al.*, 2012) de acordo com a seguinte fórmula:

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

Considerou-se significativo, o decréscimo de pelo menos ¼ do valor da CMI do antibiótico/EtBr na presença do inibidor em estudo (DeMarco *et al.*, 2007).

2.2.4. Método fluorométrico semiautomático

Neste trabalho foram utilizadas duas metodologias para a avaliação da actividade de efluxo nas estirpes em estudo: o fluorímetro e termociclador em tempo real Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Sydney, Austrália) e o fluorímetro Synergy HT Microplate Reader (BioTek Instruments).

2.2.4.1. Preparação das estirpes bacterianas

Para a realização de ambas as metodologias as culturas das estirpes em estudo foram processadas de igual modo como se descreve de seguida.

Foram efectuadas culturas primárias das estirpes de *E. coli* em meio LA e *L. plantarum* em meio TSA, como descrito no ponto 2.2.2. A partir destas culturas prepararam-se culturas em meio líquido por inoculação de 3-4 colónias em 10 ml de LB para *E. coli* e 10 ml de TSB para *L. plantarum*. Os tubos foram incubados a 37°C com agitação a 180 rpm para *E. coli* e incubadas a 37°C sem agitação para *L. plantarum*. O crescimento foi acompanhado por medição da densidade óptica (DO) a 600 nm num espectrofotómetro de tubos de ensaio (Spectronic™ 20D, Thermo Scientific, Cambridge, Reino Unido), até atingir uma DO_{600nm} de 0,6. Uma vez atingido este valor, que corresponde à fase exponencial de crescimento, as células foram recolhidas por centrifugação (Sigma 2-16 PK, Osterode, Alemanha) a 7300 rpm, durante três minutos, à temperatura ambiente e lavadas uma (*L. plantarum*) ou duas vezes (*E. coli*) em 10 ml de PBS. Após as lavagens o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 7 ml de PBS para *E. coli* e em 5 ml de PBS para *L. plantarum*. Após as lavagens, a suspensão celular foi transferida para um tubo de ensaio e a DO_{600nm} foi ajustada a 0,6 com PBS.

2.2.4.2. Método fluorométrico semiautomático usando o fluorímetro e termociclador em tempo real Rotor-Gene 3000

O método fluorométrico semiautomático foi realizado utilizando o termociclador e fluorímetro em tempo real Rotor-Gene 3000. Este método tem por base o protocolo padronizado no Grupo de Micobactérias do Instituto de Higiene e Medicina Tropical e que possibilita a monitorização em tempo real da acumulação de EtBr, um substrato comum à maioria das bombas de efluxo, no interior das células bacterianas por difusão passiva e da sua extrusão através do efluxo (Viveiros *et al.*, 2008; Paixão *et al.*, 2009; Viveiros *et al.*, 2010).

2.2.4.2.1. Ensaio de acumulação de EtBr: determinação da concentração de equilíbrio

Para a determinação da concentração de EtBr a partir da qual se começa a detectar acumulação de EtBr nas células foram realizados ensaios de acumulação com diferentes concentrações de EtBr. Os ensaios foram preparados para um volume final de 100 µl em

tubos de 0,2 ml contendo 50 µl da suspensão celular e 50 µl das soluções de trabalho de EtBr, de modo a obter concentrações finais de EtBr de 0,125 a 5 µg/ml. Estes ensaios foram realizados na ausência e presença de glucose a uma concentração final de 0,4% (v/v). A concentração final de células no ensaio foi de 0.3. Foram incluídos controlos com apenas a suspensão de células (50 µl de células DO_{600nm} e 50 µl PBS) e apenas PBS (100 µl). Os microtubos foram depois colocados no aparelho Rotor-Gene 3000. Os ensaios de acumulação realizaram-se a uma temperatura de 37°C e a leitura da fluorescência de EtBr adquirida a 530 e 585 nm, após cada ciclo de 60 segundos, durante 30 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicado.

Como controlo positivo nestes ensaios foram usadas células bacterianas inactivadas por calor. Para isso, as células foram preparadas previamente como apresentado no tópico 2.2.4.1 e depois inactivadas por calor a 100°C em banho seco durante 20 minutos. Após este período de incubação, o ensaio foi preparado de modo igual às células bacterianas em crescimento activo como acima descrito. Este procedimento resultou na lise das células bacterianas, permitindo assim que o EtBr se ligasse às suas estruturas de ácidos nucleicos, levando a que os valores de fluorescência detectados pelo aparelho fossem os máximos possíveis nas concentrações testadas. Este controlo permitiu comparar os níveis de acumulação de EtBr entre células bacterianas com sistemas de efluxo activo com as que possuem sistemas de efluxo inactivo.

2.2.4.2.2. Ensaio de acumulação de EtBr na presença de inibidores de efluxo

De modo a estudar a capacidade dos inibidores de efluxo para potenciar a acumulação de EtBr nas estirpes em estudo prepararam-se soluções de trabalho ao dobro da concentração pretendida de EtBr na presença e ausência dos inibidores de efluxo. A concentração final de EtBr corresponde à concentração de equilíbrio determinada anteriormente. A concentração final de células no ensaio foi de 0.3. Os inibidores foram testados nas seguintes concentrações sub-inibitórias (1/4 CMI): TZ a 30 µg/ml; CPZ a 30 µg/ml, NMP a 256 µg/ml e CCCP a 16 µg/ml para *E. coli* AG100; TZ a 3,75 µg/ml; CPZ a 15 µg/ml, NMP a 128 µg/ml e CCCP a 8 µg/ml para *E. coli* AG100A; TZ a 4 µg/ml; CPZ a 16 µg/ml, NMP a 32 µg/ml e CCCP a 2 µg/ml para *L. plantarum*. Em cada ensaio

foram preparados os seguintes tubos para um volume final de 100 µl contendo: i) suspensão celular; ii) suspensão celular e glucose a 0,4%; iii) suspensão celular e EtBr (concentração de equilíbrio); iv) suspensão celular, EtBr (concentração de equilíbrio) e glucose a 0,4%; v) suspensão celular, EtBr (concentração de equilíbrio) e inibidor de efluxo em estudo; vi) suspensão celular, EtBr (concentração de equilíbrio), inibidor de efluxo em estudo e glucose a 0,4%. Os tubos foram colocados no Rotor-Gene 3000 e os ensaios foram realizados a 37°C. A leitura da fluorescência de EtBr foi adquirida a 530 e 585 nm, após cada ciclo de 60 segundos, durante 30 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicado.

A partir dos valores de fluorescência obtidos, foi calculada a fluorescência final relativa (FFR) para cada estirpe e inibidor de efluxo (Machado *et al.*, 2011), de acordo com a seguinte fórmula:

$$FFR = \frac{FR (tratado) - FR (não tratado)}{FR (não tratado)}$$

Nesta fórmula, a FR (tratado) corresponde à fluorescência relativa no último ponto da curva de acumulação (30 minutos) na presença do inibidor e a FR (não tratado) corresponde à fluorescência relativa no último ponto da curva de acumulação (30 minutos) na ausência do inibidor. A FFR mede a capacidade do inibidor de efluxo em proporcionar a retenção de EtBr no interior da célula (Machado *et al.*, 2011). Considerou-se efeito inibitório significativo valores de FFR iguais ou superiores a 1.

2.2.4.3. Método fluorométrico semiautomático usando o fluorímetro Synergy HT Microplate Reader

O método fluorométrico semiautomático foi realizado utilizando o fluorímetro Synergy HT Microplate Reader. Esta metodologia baseia-se no mesmo princípio subjacente ao método fluorométrico semiautomático utilizando o fluorímetro e termociclador em tempo real Rotor-Gene 3000 mas adaptado para a detecção da acumulação de EtBr usando placas de 96 poços (Coldham *et al.*, 2010). Nesta dissertação, a validação desta metodologia em *E. coli* e *L. plantarum* foi efectuada usando os resultados obtidos no Rotor-Gene 3000 como referência.

2.2.4.3.1. Ensaio de acumulação de EtBr: determinação da concentração de equilíbrio

Para a determinação da concentração de EtBr a partir da qual se começa a detectar acumulação de EtBr nas células foram realizados ensaios de acumulação com diferentes concentrações de EtBr. Os ensaios foram preparados para um volume final de 200 µl por cada poço, em que 100 µl da suspensão celular foi adicionada aos poços de uma placa de 96 poços, aos quais foi previamente adicionado 100 µl de soluções de trabalho de EtBr, de modo a obter concentrações finais de EtBr de 0,25 a 256 µg/ml (diluições seriadas da coluna 1 à 11). Estes ensaios foram realizados na ausência e presença de glucose a uma concentração final de 0,4% (v/v). A concentração final de células no ensaio foi de 0.3. Foram incluídos controlos com apenas a suspensão de células (100 µl de células DO_{600nm} e 100 µl PBS) e apenas PBS (200 µl) (coluna 12). 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 EtBr adquirida a 530/25 e 590/35 nm, após cada ciclo de 60 segundos, durante 30 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicado.

2.2.4.3.2. Ensaio de acumulação de EtBr na presença de inibidores de efluxo

De modo a estudar a capacidade dos inibidores de efluxo para potenciar a acumulação de EtBr nas estirpes em estudo prepararam-se soluções de trabalho ao dobro da concentração pretendida de EtBr na presença e ausência dos inibidores de efluxo. A concentração final de EtBr corresponde à concentração de equilíbrio determinada anteriormente. Os inibidores foram testados nas seguintes concentrações sub-inibitórias (1/4 CMI): TZ a 30 µg/ml; CPZ a 30 µg/ml, NMP a 256 µg/ml e CCCP a 16 µg/ml para *E. coli* AG100; TZ a 3,75 µg/ml; CPZ a 15 µg/ml, NMP a 128 µg/ml e CCCP a 8 µg/ml para *E. coli* AG100A; TZ a 4 µg/ml; CPZ a 16 µg/ml, NMP a 32 µg/ml e CCCP a 2 µg/ml para *L. plantarum*. Em cada ensaio as placas de 96 poços foram preparadas da seguinte maneira por poços: i) 200 µl da suspensão celular e PBS; ii) 200 µl da suspensão celular, PBS e glucose a 0,4%; iii) 200 µl da suspensão celular e EtBr (concentração de equilíbrio); iv) 200 µl da suspensão celular, EtBr (concentração de equilíbrio) e glucose a 0,4%; v) 200 µl da suspensão celular, EtBr (concentração de equilíbrio) e inibidor de efluxo em estudo; vi) 200 µl da suspensão celular, EtBr (concentração de equilíbrio),

inibidor de efluxo em estudo e glucose a 0,4%. As placas de 96 poços foram colocadas no Synergy HT Microplate Reader e os ensaios foram realizados a 37°C. A leitura da fluorescência de EtBr foi adquirida a 530/25 e 590/35 nm, após cada ciclo de 60 segundos, durante 30 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicado.

A partir dos valores de fluorescência obtidos, foi calculada a fluorescência final relativa (FFR) para cada estirpe e inibidor de efluxo, de acordo com a fórmula apresentada no tópico 2.2.4.2.2.

3. Resultados e Discussão

O principal objectivo deste trabalho e dissertação consistiu em testar, avaliar e comparar uma metodologia descrita em 2010, para detecção directa da actividade de efluxo em bactérias usando *E. coli* (Gram-negativa) e *L. plantarum* (Gram-positiva) como modelos e simultaneamente avaliar o efeito de compostos inibidores de efluxo na susceptibilidade/resistência intrínseca aos antibióticos nestas espécies modelo. O método descrito por Coldham *et al.*, em 2010, foi desenvolvido e otimizado a partir de trabalhos anteriores como os de Viveiros *et al.*, (2008) e Paixão *et al.*, (2009) que usaram fluorometria em tempo real, e baseia-se agora na detecção de actividade de efluxo em bactérias usando um método fluorométrico em placa de 96 poços como o Synergy HT Microplate Reader. Assim, neste trabalho usámos como referência e termo de comparação a metodologia e os resultados obtidos com o termociclador e fluorímetro em tempo real Rotor-Gene 3000 desenvolvido na Unidade de Microbiologia Médica, IHMT/UNL (Viveiros *et al.*, 2008; Paixão *et al.*, 2009; Viveiros *et al.*, 2010).

Iniciou-se o estudo com a determinação do perfil de susceptibilidade aos antibióticos, inibidores de efluxo e do substrato de efluxo EtBr para estirpes em estudo através da determinação de concentrações mínimas inibitórias através do método de microdiluição em placa de 96 poços. Os antibióticos foram seleccionados de acordo com a espécie em estudo. Para *E. coli* foram seleccionados antibióticos comumente usados na terapêutica de infecções causadas por esta bactéria e que são conhecidos como substratos de bombas de efluxo (Viveiros *et al.*, 2005; Piddock, 2006). Para *L. plantarum* foram seleccionados antibióticos reconhecidos como substratos de efluxo para os quais têm sido detectados elevados níveis de resistência em estirpes alimentares bem como em casos de bacteriemia causada por *Lactobacillus* (Danielsen e Wind, 2003; Ashraf e Shah, 2011; Wachter-Rodart *et al.*, 2016).

Posteriormente avaliou-se a capacidade inibitória dos inibidores em interferir no efluxo dos antibióticos e EtBr, através da determinação das suas CMI's na presença dos inibidores CPZ, TZ, CCCP e NMP e determinação do factor de modulação. Deste modo pretendeu-se avaliar a existência ou não de um efeito sinérgico entre inibidores de efluxo

e os antibióticos/EtBr e como esse efeito inibitório pode ser posteriormente avaliado pelas duas metodologias em comparação neste trabalho.

Por fim, pretendeu-se então comprovar que o efeito sinérgico acima observado ocorre por inibição da actividade de efluxo activo analisando a capacidade dos inibidores em promover uma maior acumulação e conseqüentemente um menor efluxo de EtBr, um reconhecido substrato de vários sistemas de efluxo, principalmente do sistema de efluxo AcrAB-TolC, usando o sistema de detecção fluorométrico em placa de 96 poços, o Synergy HT Microplate Reader e a metodologia proposta por Coldham *et al.*, (2010), comparando os resultados com a metodologia proposta e desenvolvida na Unidade de Microbiologia Médica, IHMT/UNL (Viveiros *et al.*, 2008; Paixão *et al.*, 2009; Viveiros *et al.*, 2010).

3.1. Avaliação da actividade dos inibidores de bombas de efluxo através da determinação de concentrações mínimas inibitórias

3.1.1. Determinação das concentrações mínimas inibitórias de antibióticos, substratos e inibidores de efluxo para as estirpes *E. coli* AG100, *E. coli* AG100A e *L. plantarum* ATCC14917

A CMI define-se como a menor concentração de um composto capaz de inibir o crescimento visível de um microrganismo (CLSI, 2016). O resultado das CMIs dos antibióticos, EtBr e inibidores de efluxo para as estirpes *E. coli* AG100, *E. coli* AG100A e *L. plantarum* ATCC14917 testados neste trabalho estão apresentados nas Tabelas 8 a 12.

Tabela 8. Valores obtidos de CMIs de antibióticos e do substrato de bombas de efluxo EtBr para as estirpes *E. coli* AG100 e AG100A.

Antibióticos/substratos	CMI (µg/ml)	
	<i>E. coli</i> AG100	<i>E. coli</i> AG100A
Tetraciclina	2	0,5
Ofloxacina	0,125	0,015
Oxacilina	250	0,625
EtBr	150	5

Legenda: CMI - Concentração mínima inibitória; EtBr – brometo de etídio. *Escherichia coli* K-12 AG100 (*argE3 thi-1 rpsL xyl ml Δ (gal-uvrB) supE44*) - sistema de efluxo AcrAB-TolC intacto e funcional; *Escherichia coli* K-12 AG100A (Δ *acrAB::Tn903 Kan^r*), deriva da estirpe AG100 com o sistema de efluxo AcrAB-TolC inativado devido à inserção do transposão Tn903 no operão *acrAB* (Okuso *et al.*, 1996).

Através da análise dos valores de CMI obtidos dos antibióticos verifica-se que *E. coli* AG100 e AG100A são susceptíveis a tetraciclina e ofloxacina de acordo com os “breakpoints” da CLSI (tetraciclina – 16 µg/ml; e ofloxacina, 8 µg/ml (CLSI, 2016)). No entanto, a estirpe *E. coli* AG100A, que possui o sistema de efluxo AcrAB-TolC inativo, apresenta valores de concentrações mínimas inibitórias inferiores às da estirpe *E. coli* AG100 (estirpe selvagem). Estes resultados demonstram que a bomba AcrAB-TolC tem um papel importante na extrusão destes compostos, pois na sua ausência existe um aumento da susceptibilidade a estes compostos. Relativamente à oxacilina, não existe um “breakpoint” de susceptibilidade estabelecido uma vez que *E. coli* é intrinsecamente resistente a este antibiótico como comprovado pelo elevado valor de CMI obtido. Comparando o valor de CMI entre AG100 e AG100A verificamos um decréscimo de 400x o valor da CMI para estirpe AG100A indicando que a resistência intrínseca à oxacilina em *E. coli* é maioritariamente devida à presença de sistemas de efluxo activos, principalmente o AcrAB. Do mesmo modo, no caso do EtBr existe uma diminuição da CMI bastante acentuada (30x) na estirpe AG100A quando comparada com a estirpe AG100, indicando que o EtBr é um substrato preferencial das bombas de efluxo AcrAB-TolC como descrito anteriormente (Viveiros *et al.*, 2005).

Tabela 9. Valores obtidos de CMIs de antibióticos e do substrato de bombas de efluxo EtBr para a estirpe *L. plantarum* ATCC14917.

Antibióticos/substratos	CMI (µg/ml)
Tetraciclina	16
Ampicilina	2
Eritromicina	0,625
Cloranfenicol	4
EtBr	4

CMI – Concentração mínima inibitória; EtBr – brometo de etídio.

Relativamente a *L. plantarum*, da análise da Tabela 9 verificamos que a estirpe em estudo, ATCC14917, é susceptível à ampicilina e eritromicina de acordo com os “breakpoints” estabelecidos pelo CLSI (ampicilina, ≥ 8 µg/ml e eritromicina, < 1 µg/ml (CLSI, 2005)). Esta estirpe apresenta valores de CMI para a tetraciclina elevados, indicando reduzida susceptibilidade a este antibiótico. No entanto, apesar da ausência de um “breakpoint” de susceptibilidade estabelecido para a tetraciclina, o valor proposto na literatura é de 64 µg/ml (Danielsen e Wind, 2003). Deste modo, podemos concluir que a estirpe *L. plantarum* ATCC14917 em estudo é susceptível à tetraciclina. Similarmente, para o cloranfenicol e na ausência de um “breakpoint” de susceptibilidade estabelecido, o valor proposto na literatura é de 16 µg/ml pelo que a estirpe em estudo é susceptível a este antibiótico (Tabela 9). Em relação ao EtBr, esta estirpe apresenta um nível de susceptibilidade comparável com a estirpe *E. coli* AG100A e susceptibilidade aumentada, quando comparada com a estirpe *E. coli* AG100.

Tabela 10. Valores obtidos de CMIs de compostos inibidores de efluxo para as estirpes *E. coli* AG100, *E. coli* AG100A e *L. plantarum* ATCC14917.

Inibidores de efluxo	CMI (µg/ml)		
	<i>E. coli</i> AG100	<i>E. coli</i> AG100A	<i>L. plantarum</i> ATCC14917
CPZ	120	60	64
TZ	120	15	16
CCCP	64	32	8
NMP	>1024	512	128

CMI - Concentração mínima inibitória; TZ - Tioridazina; CPZ - Clorpromazina; CCCP - Carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona; NMP – Arilpiperazina.

Analisando os dados apresentados na Tabela 10 relativamente à susceptibilidade aos inibidores de efluxo das estirpes em estudo, verificamos que a estirpe *E. coli* AG100A quando comparada com a estirpe AG100 apresenta maior susceptibilidade à TZ. Relativamente aos restantes inibidores, os níveis de susceptibilidade variam de 1 diluição não sendo por isso consideradas diferenças significativas. Relativamente a *L. plantarum*, verificamos um decréscimo dos valores de CMI para o CCCP e NMP em relação as estirpes AG100 e AG100A e valores de CMI semelhante às da estirpe *E. coli* AG100A para a TZ e CPZ.

3.1.2. Determinação das concentrações mínimas inibitórias dos antibióticos e EtBr na presença de compostos inibidores de efluxo para as estirpes *E. coli* AG100, *E. coli* AG100A e *L. plantarum* ATCC14917

De forma a avaliar a capacidade dos inibidores de efluxo em estudo diminuírem a CMI dos antibióticos, determinaram-se as CMIs dos antibióticos na sua presença, a uma concentração fixa igual a ¼ da sua CMI, para garantir que o efeito inibitório observado se deve à actividade sinérgica entre o inibidor de efluxo e o antibiótico/EtBr e não à actividade antimicrobiana do inibidor de efluxo. Os resultados obtidos apresentam-se nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11. Valores obtidos de CMI para os antibióticos e EtBr na presença dos inibidores de sistemas de efluxo (a ¼ da CMI) para as duas estirpes de *E. coli*, AG100 e AG100A.

Antibióticos/ EtBr na presença/ausência de inibidores de efluxo	<i>E. coli</i>			
	AG100		AG100A	
	CMI (µg/ml)	MF	CMI (µg/ml)	MF
Tetraciclina	2	-	0,5	-
+ CPZ	1	↓2	0,0625	↓8
+ TZ	0,25	↓8	0,0625	↓8
+ CCCP	0,5	↓4	0,25	↓2
+ NMP	0,0625	↓32	0,125	↓4
Ofloxacina	0,125	-	0,015	-
+ CPZ	0,015	↓8	0,0075	↓2
+ TZ	0,015	↓8	0,0075	↓2
+ CCCP	0,015	↓8	0,015	-
+ NMP	0,0075	↓16	0,015	-
Oxacilina	250	-	0,625	-
+ CPZ	125	↓2	0,625	-
+ TZ	125	↓2	0,312	↓2
+ CCCP	62,5	↓4	0,625	-
+ NMP	7,68	↓32	0,312	↓2
EtBr	150	-	5	-
+ CPZ	37,5	↓4	2,5	↓2
+ TZ	18,75	↓8	5	-
+ CCCP	75	↓2	5	-
+ NMP	2,34	↓64	5	-

CMI - Concentração mínima inibitória; TZ - Tioridazina; CPZ - Clorpromazina; CCCP - Carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona; NMP – Arilpiperazina; EtBr – brometo de etídio. -, sem efeito.

Analisando a Tabela 11, verifica-se de um modo geral, que a CMI do antibiótico na presença do inibidor de efluxo, diminui significativamente quando comparada com o valor da CMI determinada para o mesmo antibiótico na ausência do inibidor de efluxo.

Para *E. coli* AG100 e para a tetraciclina, o composto que apresentou um efeito inibitório mais significativo foi o NMP, uma vez que diminuiu a CMI da tetraciclina em

32x. Os compostos CPZ, TZ e CCCP diminuíram o valor da CMI da tetraciclina em 2x, 8x e 4x, respectivamente. A CMI da ofloxacina foi reduzida 8x vezes na presença de TZ, CPZ e CCCP e 16x na presença de NMP. Para a oxacilina, CCCP e NMP reduziram o valor da CMI em 4x e 32x, respectivamente, não se verificando efeito significativo na presença de TZ e CPZ. Relativamente ao EtBr, verificou-se um decréscimo da sua CMI na presença de CPZ, TZ e NMP não se verificando efeito significativo na presença de CCCP.

Para a estirpe AG100A, que apresenta o sistema AcrAB-TolC inactivado, os compostos que apresentam um maior efeito na redução dos valores de CMI da tetraciclina (8x) foram o CPZ e TZ seguido pelo NMP (4x). Relativamente à ofloxacina, oxacilina e EtBr não se verificou efeito sinérgico na presença de qualquer um dos inibidores em concordância com o esperado em virtude da ausência do sistema AcrAB-TolC.

Os resultados obtidos confirmam que a tetraciclina, ofloxacina, oxacilina e o EtBr são substratos do sistema de efluxo AcrAB-TolC em *E. coli*. Podemos também concluir que o NMP é o inibidor mais eficaz na redução dos valores de CMI dos antibióticos e EtBr seguido do CPZ e TZ quando testados a $\frac{1}{4}$ da sua CMI.

De seguida, analisámos a capacidade dos referidos inibidores na diminuição das CMIs dos antibióticos seleccionados em *L. plantarum*. Os resultados estão apresentados na Tabela 12. Verifica-se que a CMI dos antibióticos tetraciclina, ampicilina, eritromicina e cloranfenicol e do EtBr diminuem significativamente (≥ 64 -128x) na presença de todos os inibidores de efluxo testados com a única excepção da TZ. Este inibidor de efluxo não demonstrou qualquer efeito nos valores de CMI dos quatro antibióticos bem como do EtBr. Este resultado parece indicar que a TZ actua apenas como agente antimicrobiano, e não tem qualquer efeito sobre possíveis sistemas de efluxo activos em *L. plantarum*.

Com estes resultados podemos concluir que o uso de inibidores de efluxo potencia a actividade dos antibióticos tetraciclina, ampicilina, eritromicina e cloranfenicol em *L. plantarum*, excepto o inibidor TZ que não teve qualquer alteração nas CMIs.

Tabela 12. Valores obtidos de CMI para os antibióticos e EtBr na presença dos inibidores de sistemas de efluxo (a ¼ da CMI) para *L. plantarum* ATCC14917.

Antibióticos/ EtBr na presença/ausência do inibidor de efluxo	<i>L. plantarum</i>	
	CMI (µg/ml)	MF
Tetraciclina	16	
+ CPZ	0,25	↓64
+ TZ	16	-
+ CCCP	≤ 0,125	≥ ↓128
+ NMP	≤ 0,125	≥ ↓128
Ampicilina	2	
+ CPZ	≤ 0,0156	≥ ↓128
+ TZ	2	-
+ CCCP	≤ 0,0156	≥ ↓128
+ NMP	≤ 0,0156	≥ ↓128
Eritromicina	0,0625	
+ CPZ	≤ 0,00097	≥ ↓64
+ TZ	0,0625	-
+ CCCP	≤ 0,00097	≥ ↓64
+ NMP	≤ 0,00097	≥ ↓64
Cloranfenicol	4	
+ CPZ	≤ 0,0312	≥ ↓128
+ TZ	4	-
+ CCCP	≤ 0,0312	≥ ↓128
+ NMP	≤ 0,0312	≥ ↓128
EtBr	4	
+ CPZ	≤ 0,0312	≥ ↓128
+ TZ	4	-
+ CCCP	≤ 0,0312	≥ ↓128
+ NMP	≤ 0,0312	≥ ↓128

CMI - Concentração mínima inibitória; TZ - Tioridazina; CPZ - Clorpromazina; CCCP - Carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona; NMP – Arilpiperazina; EtBr – brometo de etídio.

Considerando os resultados obtidos e tendo em conta o que se sabe sobre o mecanismo de acção destes compostos (Viveiros *et al.*, 2005; Kern *et al.*, 2006; Viveiros *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2017), podemos inferir que todos os inibidores de efluxo testados promovem a retenção dos antibióticos em estudo neste trabalho bem como do EtBr, através da inibição de sistemas de efluxo activos. Todavia, o efeito inibitório destes compostos em combinação com o antibiótico/substrato, no crescimento bacteriano, é avaliado após 18 (*E. coli*) e 24 horas (*L. plantarum*) de exposição a uma concentração não letal do inibidor ($\frac{1}{4}$ da CMI). Deste modo, para além da inibição da actividade de efluxo, podemos colocar a hipótese da existência de um efeito do inibidor na permeabilidade celular devido ao tempo de contacto prolongado com a estirpe em estudo. De forma a complementar os resultados indirectos obtidos pela acção dos inibidores de efluxo na redução dos valores das CMIs dos antibióticos e EtBr, nas estirpes em estudo, onde se verificaram inibições significativas, procedeu-se seguidamente ao estudo da inibição do efluxo de EtBr em tempo real usando o fluorímetro e termociclador Rotor-Gene 3000 e o fluorímetro Synergy HT Microplate Reader e assim completar o estudo comparativo entre metodologias proposto como objectivo deste trabalho.

3.2. Comparação do método fluorométrico semiautomático em termociclador de tempo real Rotor-Gene 3000 com o Synergy HT Microplate Reader

A monitorização do transporte de EtBr através da parede celular bacteriana permite-nos observar a presença e actividade de transportadores membranares responsáveis pelo transporte deste substrato do interior para o exterior da célula (efluxo), e que são também responsáveis pela co-extrusão de outros compostos antimicrobianos como detergentes, biocidas e corantes fluorescentes como EtBr (Paixão *et al.*, 2009; Viveiros *et al.*, 2010). Deste modo, foram realizados ensaios de acumulação de EtBr usando dois sistemas de detecção fluorométrica, o termociclador em tempo real Rotor-Gene 3000 e o Synergy HT Microplate Reader.

Para a interpretação dos resultados obtidos destes ensaios, foi necessário ter em conta os seguintes aspectos: i) o nível de fluorescência emitido pelo EtBr quando se encontra em solução é constante; ii) a entrada de EtBr nas células ocorre por difusão passiva devido à permeabilidade da parede celular bacteriana; e iii) o equilíbrio entre a difusão passiva e o efluxo activo de EtBr através dos sistemas de efluxo resulta no

estabelecimento de um equilíbrio entre o influxo e o efluxo que, quando desequilibrado para o primeiro por inibição do segundo, resulta na acumulação de EtBr na célula bacteriana (Paixão *et al.*, 2009; Viveiros *et al.*, 2008).

3.2.1. *E. coli* AG100

3.2.1.1. Determinação da concentração de equilíbrio de EtBr

Foram realizados ensaios de acumulação de EtBr para *E. coli* AG100 na presença de diferentes concentrações de EtBr para determinar qual a concentração de equilíbrio de EtBr (concentração na qual existe um equilíbrio entre a entrada e saída de EtBr da célula) e avaliar qual a variação entre os dois sistemas de detecção.

Para os ensaios realizados no Rotor-Gene seguimos o protocolo em uso para *E. coli* tendo sido testadas concentrações de EtBr de 0,125 a 5 µg/ml. Nos ensaios usando o Synergy HT foram testadas concentrações de 0,25 a 256 µg/ml. Os ensaios foram realizados também na presença de glucose. Os resultados obtidos estão representados na Figura 14.

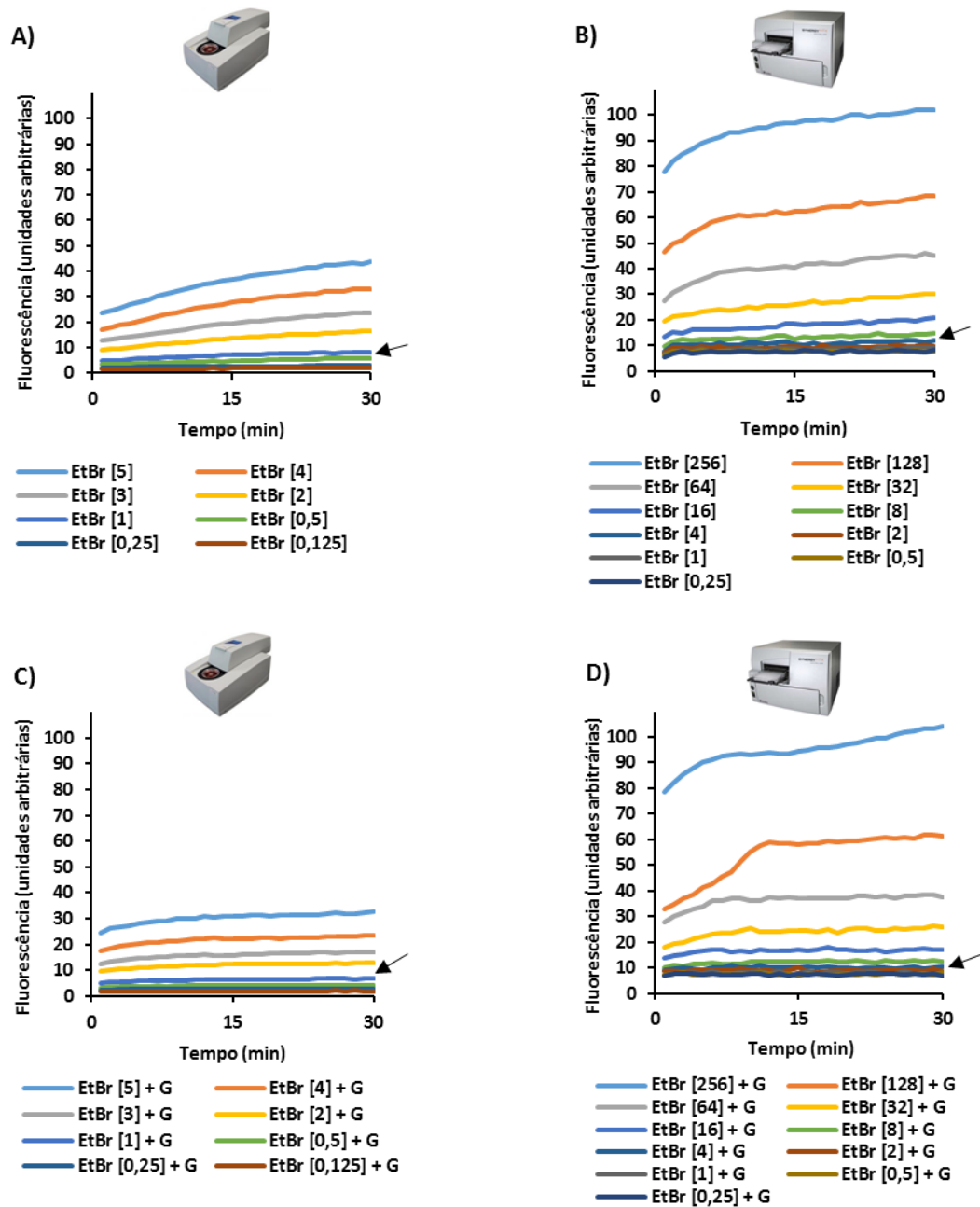


Figura 14. Gráficos representativos dos ensaios de acumulação de EtBr na presença de concentrações crescentes de EtBr, na ausência e na presença de glucose a 0,4%, para a estirpe *E. coli* AG100 usando o Rotor-Gene 3000 (A e C) e o Synergy HT Microplate Reader (B e D). As concentrações de EtBr são apresentadas em [µg/ml]. G – glucose.

No ensaio de acumulação efectuado no fluorímetro e termociclador em tempo real Rotor-Gene verifica-se acumulação mínima de EtBr com concentrações até 1 µg/ml. A

concentração de equilíbrio de EtBr para *E. coli* AG100 é de 1 µg/ml (máximo 10 unidades de fluorescência (UF)). No ensaio efectuado no fluorímetro de placas Synergy HT verifica-se uma acumulação mínima de EtBr com concentrações até 4 µg/ml (máximo 10 UF). Deste modo, a concentração de equilíbrio de EtBr para *E. coli* AG100 usando o Synergy HT é de 4 µg/ml. Os mesmos ensaios realizados na presença de glucose mostram um ligeiro decréscimo dos níveis de fluorescência, como esperado uma vez que a adição de glucose funciona como fonte de energia para o funcionamento das bombas de efluxo resultando assim numa menor acumulação de EtBr. A concentração de equilíbrio manteve-se nos mesmos valores na presença de glucose com os dois sistemas de detecção.

Com os resultados obtidos, podemos concluir que os níveis basais de acumulação de EtBr dependem não só da estirpe mas também da sensibilidade do sistema de detecção fluorométrico que se está a usar. Para *E. coli* AG100, a CMI do EtBr é de 150 µg/ml (Tabela 8) pelo que ambas as concentrações determinadas como concentração de equilíbrio, para além de estarem muito próximas, não apresentam qualquer efeito na viabilidade celular.

3.2.1.2. Determinação dos níveis de acumulação de EtBr na presença e ausência de inibidores de efluxo

Seguidamente foram realizados ensaios de acumulação de EtBr na concentração de equilíbrio determinada anteriormente, e para cada sistema de detecção, na presença e ausência dos inibidores de efluxo TZ, CPZ, NMP e CCCP. Pretendemos avaliar o efeito dos inibidores de efluxo na acumulação intracelular em tempo real de EtBr para a estirpe *E. coli* AG100 e avaliar qual a variação entre os dois sistemas de detecção. Os inibidores de efluxo foram testados a ¼ da respectiva CMI na presença e ausência de glucose. Os resultados obtidos estão representados na Figura 15.

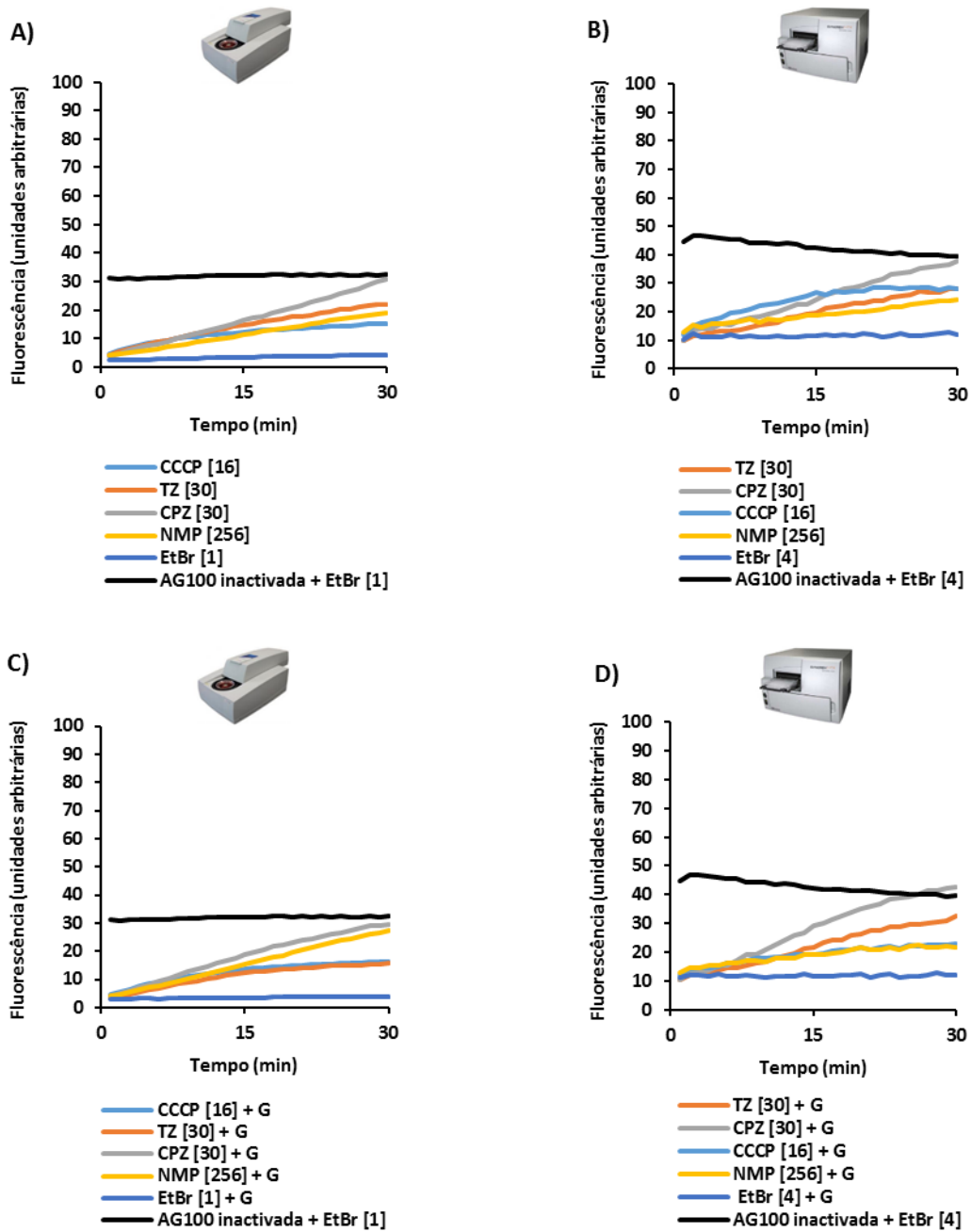


Figura 15. Gráficos representativos dos ensaios de acumulação de EtBr na presença e ausência de inibidores de efluxo, com e sem glucose a 0,4%, para a estirpe *E. coli* AG100, usando o Rotor-Gene 3000 (A e C) e o Synergy HT Microplate Reader (B e D). A curva a preto corresponde às células inativadas por calor e posteriormente incubadas na presença de EtBr na concentração de equilíbrio. As concentrações de compostos são apresentadas em [µg/ml].

Com base nos valores de fluorescência ao final dos 30 minutos de ensaio, determinamos o índice de FFR (ver material e métodos) que reflecte a capacidade de um inibidor de efluxo em potenciar a retenção de EtBr no interior da célula. Quanto maior o valor de FFR, maior é capacidade do inibidor em proporcionar acumulação intracelular de EtBr (Machado *et al.*, 2011). Os resultados foram realizados na presença e ausência de glucose e estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Valores de fluorescência final relativa para os inibidores de efluxo em estudo.

Inibidores de efluxo	Fluorescência Final Relativa			
	<i>E. coli</i> AG100			
	Rotor-Gene		Synergy HT	
	- glucose	+ glucose	- glucose	+ glucose
CPZ	6,44 ± 0,49	6,44 ± 0,20	2,17 ± 0,17	2,55 ± 0,18
TZ	4,30 ± 0,03	2,99 ± 0,49	1,33 ± 0,08	1,72 ± 0,39
CCCP	2,66 ± 0,02	3,05 ± 0,15	1,33 ± 0,08	0,92 ± 0,08
NMP	3,61 ± 0,51	5,88 ± 0,13	1,03 ± 0,05	0,81 ± 0,10

TZ - Tioridazina; CPZ - Clorpromazina; CCCP - Carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona; NMP – Arilpiperazina. Valores a bold indicam os inibidores mais eficientes.

Com base nos resultados obtidos, verificamos que o CPZ é o inibidor que apresenta maior capacidade para promover a acumulação de EtBr na célula, seguido da TZ, NMP e CCCP, resultados concordantes com os anteriormente obtidos na literatura (Viveiros *et al.*, 2005; Costa, 2009; Pinto, 2012; Machado *et al.*, 2017). Ambos os sistemas de detecção demonstram ser capazes de detectar acumulação de EtBr na presença de inibidores de efluxo. Na presença de glucose, o CPZ é o inibidor que apresenta novamente maior capacidade para promover a acumulação de EtBr na célula em ambos os sistemas. As tendências mantêm-se na presença de TZ mas na presença de CCCP e NMP, enquanto os valores de FFR aumentam relativamente à condição sem glucose quando testados no Rotor-Gene, no leitor de placas os níveis de acumulação decrescem. No entanto, e de um modo geral, os níveis de acumulação de EtBr e respectiva fluorescência relativa detectada na presença dos inibidores de efluxo, com e sem glucose,

decrecem quando testados no Synergy HT, uma vez mais evidenciando menos sensibilidade de detecção de sinal de fluorescência.

A acumulação máxima de EtBr na concentração de equilíbrio para AG100 com os sistemas de efluxo inativados pelo calor foi aproximadamente 25 UF superior relativamente às células com sistemas de efluxo activos (Rotor-Gene 3000) e 30 UF relativamente às células com sistemas de efluxo activos (Synergy). Estes resultados confirmam a existência de actividade de efluxo na estirpe AG100 e indicam que os inibidores CPZ, TZ e NMP conseguem promover a acumulação de EtBr a níveis similares ao de células cuja actividade de efluxo foi inactivada.

3.2.2. *E. coli* AG100A

3.2.2.1. Determinação da concentração de equilíbrio de EtBr

Foram realizados ensaios de acumulação de EtBr para *E. coli* AG100A na presença de diferentes concentrações de EtBr para determinar qual a concentração de equilíbrio de EtBr e avaliar qual a variação entre os dois sistemas de detecção.

Para os ensaios realizados no Rotor-Gene seguimos o protocolo em uso para *E. coli* tendo sido testadas concentrações de EtBr de 0,125 a 5 µg/ml. Nos ensaios usando o Synergy HT foram testadas concentrações de 0,25 a 256 µg/ml. Os ensaios foram realizados também na presença de glucose. Os resultados obtidos estão representados na Figura 16.

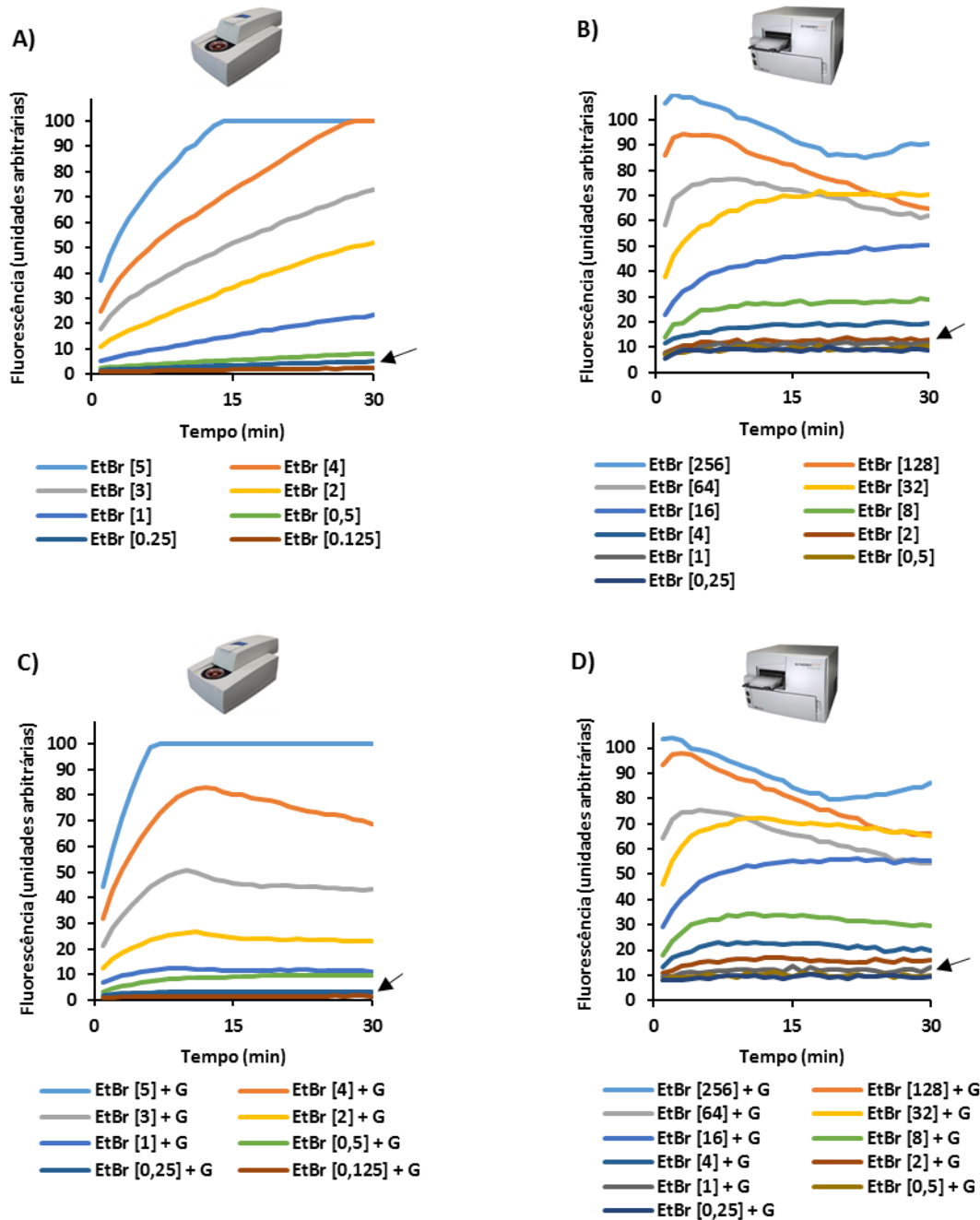


Figura 16. Gráficos representativos dos ensaios de acumulação de EtBr na presença de concentrações crescentes de EtBr, na ausência e na presença de glucose a 0,4%, para a estirpe *E.coli* AG100A usando o Rotor-Gene 3000 (A e C) e o Synergy HT Microplate Reader (B e D). As concentrações de EtBr são apresentadas em [µg/ml]. G – glucose.

No ensaio de acumulação efectuado no Rotor-Gene verifica-se uma acumulação mínima de EtBr com concentrações até 0,25 µg/ml. A concentração de equilíbrio de EtBr

para *E. coli* AG100A é de 0,25 µg/ml. No ensaio efectuado no Synergy HT verifica-se uma acumulação mínima de EtBr com concentrações até 1 µg/ml. Deste modo, a concentração de equilíbrio de EtBr para *E. coli* AG100A usando o Synergy HT é de 1 µg/ml. Os mesmos ensaios realizados na presença de glucose mostram um ligeiro decréscimo dos níveis de fluorescência, como esperado uma vez que a adição de glucose funciona como fonte de energia para o funcionamento das bombas de efluxo resultando assim numa menor acumulação de EtBr. A concentração de equilíbrio manteve-se na presença de glucose com os dois sistemas de detecção.

Como verificado anteriormente para a estirpe *E. coli* AG100, estes resultados demonstram que os níveis basais de acumulação de EtBr dependem não só da estirpe mas também da sensibilidade do sistema de detecção fluorométrico que se está a usar. Para *E. coli* AG100A, a CMI do EtBr é de 5 µg/ml sendo que o aumento da concentração de equilíbrio de EtBr, quando testado no Synergy HT, não é suficiente para influenciar a viabilidade celular.

3.2.2.2. Determinação dos níveis de acumulação de EtBr na presença e ausência de inibidores de efluxo

Seguidamente foram realizados ensaios de acumulação de EtBr na concentração de equilíbrio determinada anteriormente, e para cada sistema de detecção, na presença e ausência dos inibidores de efluxo TZ, CPZ, NMP e CCCP. Pretendemos avaliar o efeito dos inibidores de efluxo na acumulação intracelular de EtBr para a estirpe *E. coli* AG100A e avaliar qual a variação entre os dois sistemas de detecção. Os inibidores de efluxo foram testados a ¼ da respectiva CMI na presença e ausência de glucose. Os resultados obtidos estão representados na Figura 17.

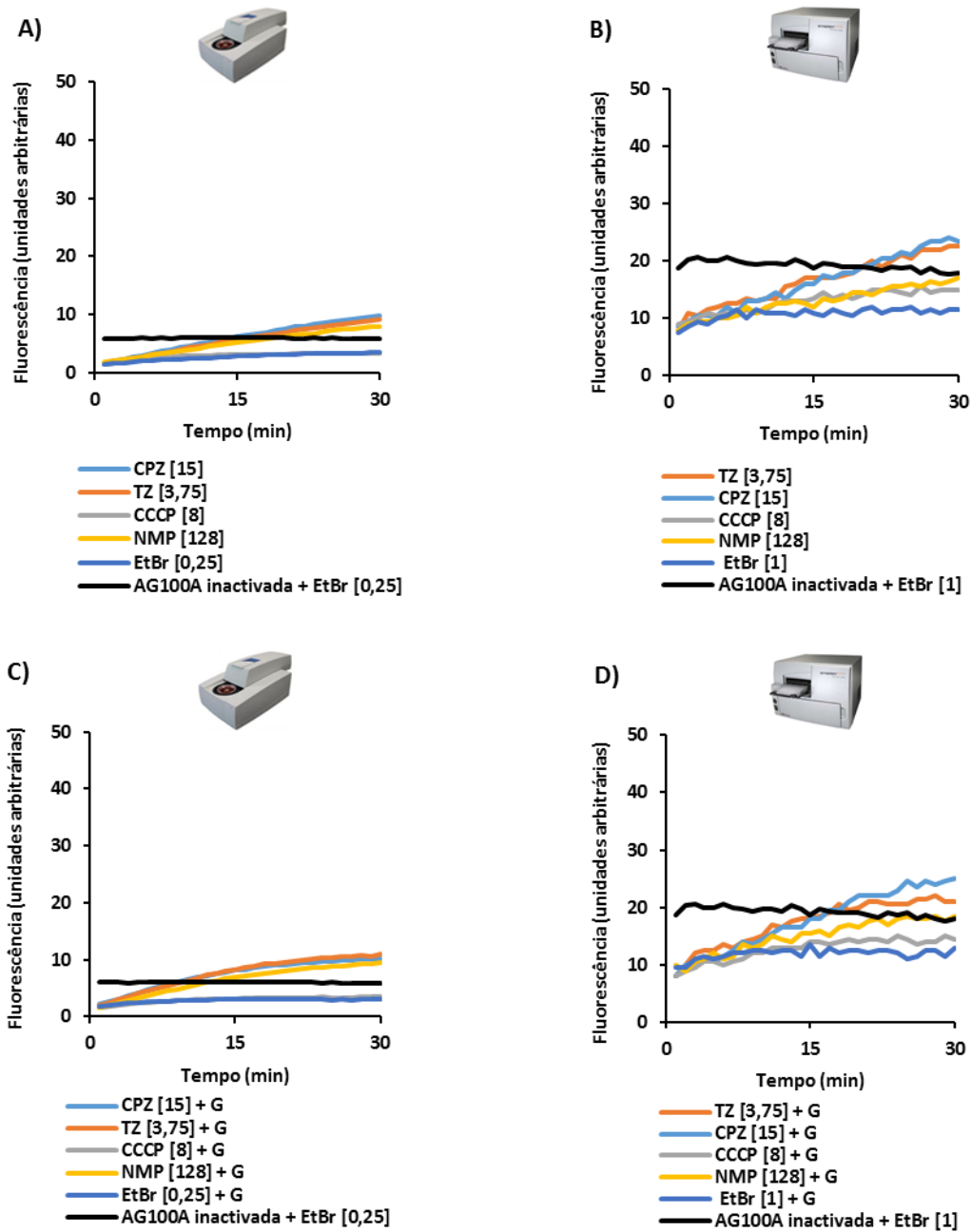


Figura 17. Gráficos representativos dos ensaios de acumulação de EtBr na presença e ausência de inibidores de efluxo, com e sem glucose a 0,4%, para a estirpe *E. coli* AG100A, usando o Rotor-Gene 3000 (A e C) e o Synergy HT Microplate Reader (B e D). A curva a preto corresponde às células inativadas por calor na presença de EtBr na concentração de equilíbrio. As concentrações de compostos são apresentadas em [µg/ml]. G – glucose.

Com base nos valores de fluorescência ao final dos 30 minutos de ensaio, determinamos o índice de FFR. Os resultados foram realizados na presença e ausência de glucose e estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Valores de fluorescência final relativa para os inibidores de efluxo em estudo.

Inibidores de efluxo	Fluorescência Final Relativa			
	<i>E. coli</i> AG100A			
	Rotor-Gene		Synergy HT	
	- glucose	+ glucose	- glucose	+ glucose
CPZ	1,75 ± 0,05	2,40 ± 0,11	1,04 ± 0,18	0,92 ± 0,00
TZ	1,60 ± 0,02	2,63 ± 0,04	0,96 ± 0,06	0,62 ± 0,00
CCCP	0,05 ± 0,11	0,14 ± 0,16	0,30 ± 0,24	0,12 ± 0,05
NMP	1,25 ± 0,12	2,14 ± 0,37	0,48 ± 0	0,42 ± 0,05

TZ - Tioridazina; CPZ - Clorpromazina; CCCP - Carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona; NMP – Arilpiperazina. Valores a bold indicam os inibidores mais eficientes.

Com base nos resultados obtidos, verificamos que o CPZ é o inibidor que apresenta maior capacidade para promover a acumulação de EtBr na célula, seguido da TZ e NMP, também em sintonia com a literatura (Viveiros *et al.*, 2005; Costa, 2009; Pinto, 2012; Machado *et al.*, 2017). Na presença de glucose, a TZ é o inibidor que apresenta maior capacidade para promover a acumulação de EtBr na célula. No entanto, e de um modo geral, os níveis de acumulação de EtBr na presença dos inibidores de efluxo, com e sem glucose decrescem quando testados no Synergy HT.

A acumulação máxima de EtBr na concentração de equilíbrio para AG100A com o sistema de efluxo AcrAB inativado geneticamente e os restantes sistemas de efluxo inativados pelo calor foi aproximadamente 3 UF superior relativamente às células com sistemas de efluxo activos (Rotor-Gene 3000) e 7 UF relativamente às células com sistemas de efluxo activos (Synergy). Estes resultados confirmam que a AG100A possui reduzida actividade de efluxo uma vez que os níveis de acumulação de EtBr são semelhantes entre si estando os sistemas de efluxo activos ou inactivos. Verificou-se também que os inibidores CPZ, TZ e NMP conseguem promover a acumulação de EtBr

a níveis similares ou ligeiramente superiores ao de células cuja actividade de efluxo foi inactivada. Os resultados obtidos foram similares entre os dois sistemas de detecção demonstrando a eficiência do Synergy HT para a análise de actividade de efluxo e teste de compostos usando estirpes com sistemas de efluxo comprometidos.

Combinados os resultados obtidos com as estirpes controlo Gram-negativas, *E. coli* AG100 e AG100A, demonstra-se que o fluorímetro Synergy HT é capaz de fornecer resultados semelhantes aos obtidos com o fluorímetro e termociclador Rotor-Gene 3000, embora com um nível de sensibilidade mais baixo, reproduzindo os resultados obtidos previamente pelo nosso grupo de trabalho (Viveiros *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2017).

3.2.3. *L. plantarum* ATCC14917

Após optimizada a técnica e realizados os ensaios com as estirpes controlo analisamos a capacidade do aparelho Synergy HT para a detecção de sistemas de efluxo activos numa bactéria Gram-positiva e para tal seleccionamos *L. plantarum*. Seleccionamos esta espécie principalmente por ser uma bactéria não patogénica ideal para ser usada como modelo em optimização de novos métodos/protocolos experimentais e novos fármacos/compostos inibidores. Associamos ainda o facto de não haver estudos que descrevam a detecção em tempo real de actividade de efluxo nesta bactéria apesar de estarem já descritos casos de resistência aos antibióticos associada a efluxo (ver capítulo Introdução ponto 1.5.2).

3.2.3.1. Determinação da concentração de equilíbrio de EtBr

Foram realizados ensaios de acumulação de EtBr para *L. plantarum* ATCC14917 na presença de diferentes concentrações de EtBr para determinar qual a concentração de equilíbrio de EtBr e avaliar qual a variação entre os dois sistemas de detecção.

Nos ensaios usando o Rotor-Gene foram testadas concentrações de EtBr de 0,0315 a 5 µg/ml. Nos ensaios usando o Synergy HT foram testadas concentrações de 0,25 a 256 µg/ml. Os ensaios foram realizados na presença de glucose. Os resultados obtidos estão representados na Figura 18.

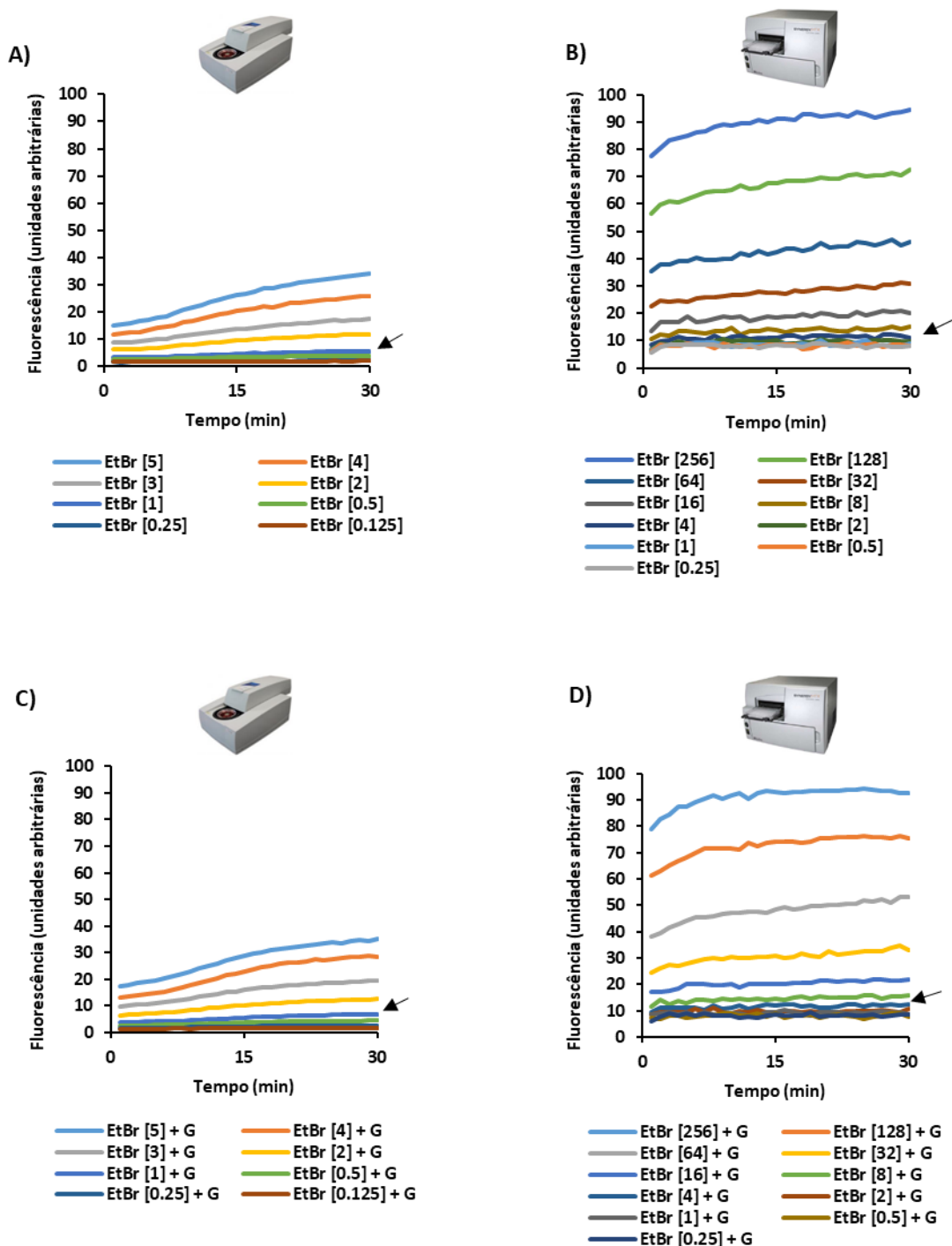


Figura 18. Gráficos representativos dos ensaios de acumulação de EtBr na presença de concentrações crescentes de EtBr, na ausência e na presença de glicose a 0,4%, para a estirpe *L. plantarum* ATCC14917 usando o Rotor-Gene 3000 (A e C) e o Synergy HT Microplate Reader (B e D). As concentrações de EtBr são apresentadas em [µg/ml]. G – glicose.

No ensaio de acumulação efectuado no Rotor-Gene verifica-se uma acumulação mínima de EtBr com concentrações até 1 µg/ml. A concentração de equilíbrio de EtBr para *L. plantarum* ATCC14917 é de 1 µg/ml. No ensaio efectuado no Synergy HT verifica-se uma acumulação mínima de EtBr com concentrações até 4 µg/ml. Deste modo, a concentração de equilíbrio de EtBr para *L. plantarum* ATCC14917 usando o Synergy HT é de 4 µg/ml. Os mesmos ensaios realizados na presença de glucose mostram um ligeiro decréscimo dos níveis de fluorescência, como esperado uma vez que a adição de glucose funciona como fonte de energia para o funcionamento das bombas de efluxo resultando assim numa menor acumulação de EtBr. A concentração de equilíbrio manteve-se na presença de glucose com os dois sistemas de detecção.

Estes resultados corroboram as tendências obtidas com as estirpes controlo Gram-negativas de *E. coli* pelo que se podem tirar inferências semelhantes, *i.e.*, que os níveis basais de acumulação de EtBr dependem não só da estirpe mas também da sensibilidade do sistema de detecção fluorométrico que se está a usar. Para *L. plantarum* ATCC14917, a CMI do EtBr é de 4 µg/ml. Apesar de estarem muito próximas, concentração de equilíbrio obtida no Synergy HT corresponde ao valor CMI do EtBr para esta estirpe. Nos ensaios de acumulação com EtBr na presença de inibidores de efluxo usamos esta concentração por ser a concentração que corresponde as condições previamente estabelecidas em que a concentração de equilíbrio corresponde aquela que não excede as 10 UF. No entanto, analisando Figura 18-B) verificamos que também as concentrações 2 e 1 µg/ml de EtBr poderiam ter sido seleccionadas como concentrações de equilíbrio uma vez que apresentam os mesmos níveis de fluorescência obtidos a 4 µg/ml. Isto indicando que estas concentrações poderão também ser usadas futuramente como concentração de equilíbrio para esta bactéria.

3.2.3.2. Determinação dos níveis de acumulação de EtBr na presença e ausência de inibidores de efluxo

Seguidamente foram realizados ensaios de acumulação de EtBr na concentração de equilíbrio determinada anteriormente, e para cada sistema de detecção, na presença e ausência dos inibidores de efluxo TZ, CPZ, NMP e CCCP. Pretendemos avaliar o efeito dos inibidores de efluxo na acumulação intracelular de EtBr para a estirpe *L. plantarum* ATCC14917 e avaliar qual a variação entre os dois sistemas de detecção. Os inibidores de efluxo foram testados a $\frac{1}{4}$ da respectiva CMI na presença e ausência de glucose. Os resultados obtidos estão representados na Figura 19.

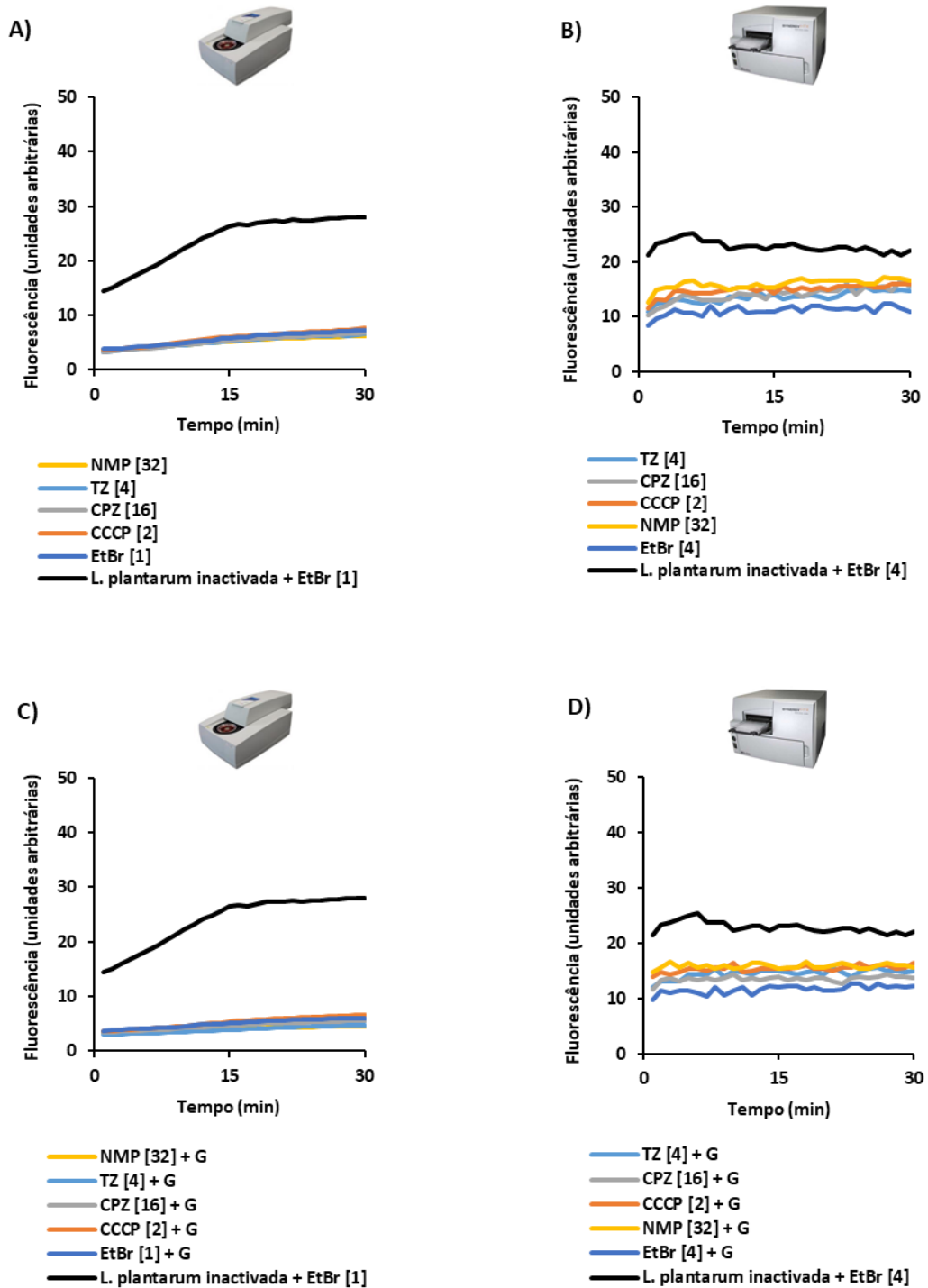


Figura 19. Gráficos representativos dos ensaios de acumulação de EtBr na presença e ausência de inibidores de efluxo, com e sem glicose a 0,4%, para a estirpe *L. plantarum* ATCC14917, usando o Rotor-Gene 3000 (A e C) e o Synergy HT Microplate Reader (B e D). A curva a preto corresponde às células inativadas por calor na presença de EtBr na concentração de equilíbrio. As concentrações dos compostos são apresentadas em [µg/ml]. G – glicose.

Com base nos valores de fluorescência ao final dos ensaios, determinamos o índice de FFR. Os resultados foram realizados na presença e ausência de glucose e estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Valores de fluorescência final relativa para os inibidores de efluxo em estudo.

Inibidores de efluxo	Fluorescência Final Relativa			
	<i>L. plantarum</i> ATCC14917			
	Rotor-Gene		Synergy HT	
	- glucose	+ glucose	- glucose	+ glucose
CPZ	-0,07 ± 0,00	-0,08 ± 0,03	0,44 ± 0,05	0,11 ± 0,05
TZ	-0,10 ± 0,01	-0,22 ± 0,03	0,30 ± 0,10	0,22 ± 0,00
CCCP	0,05 ± 0,09	0,09 ± 0,01	0,45 ± 0,09	0,32 ± 0,05
NMP	-0,14 ± 0,05	-0,26 ± 0,04	0,05 ± 0,05	0,27 ± 0,05

TZ - Tioridazina; CPZ - Clorpromazina; CCCP - Carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona; NMP – Arilpiperazina. Valores de FFR negativos indicam que existe menos acumulação de EtBr na presença do inibidor do que no controle apenas com EtBr.

Com base nos resultados obtidos, verificamos que a acumulação intracelular de EtBr é de quase nula. Por razões desconhecidas, foi possível detectar acumulação de EtBr na presença dos inibidores de efluxo usando o Synergy HT e não com o Rotor-Gene 3000. CCCP e CPZ são os inibidores que apresentam maior capacidade para promover a acumulação de EtBr na célula, seguindo-se a TZ. Os ensaios na presença de glucose não apresentam diferenças significativas em relação aos ensaios na ausência de glucose.

A acumulação máxima de EtBr na concentração de equilíbrio para *L. plantarum* com os sistemas de efluxo inactivados foi aproximadamente 20 UF superior relativamente às células com sistemas de efluxo activo (Rotor-Gene 3000) e 15 UF relativamente às células com sistemas de efluxo activos (Synergy). Estes resultados confirmam que *L. plantarum* possui elevada actividade de efluxo uma vez que os níveis de acumulação de EtBr da estirpe com sistemas de efluxo activos diferem significativamente da estirpe com sistemas de efluxo inactivos. Verificou-se também que os inibidores CCCP, CPZ, TZ e NMP não conseguem promover a acumulação de EtBr a níveis similares ao de células

cuja actividade de efluxo foi inactivada. Futuramente poderão ser testados outros inibidores como p.ex., o verapamil que possui actividade inibitória de efluxo em *S. aureus* (Gram-positiva) (Costa *et al.*, 2013) e é praticamente ineficaz como inibidor de efluxo em *E. coli* (dados não publicados).

4. Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram-nos concluir:

a) Que os inibidores de efluxo testados, tioridazina, clorpromazina, carbonil cianeto *m*-clorofenilhidrazona e a arilpiperazina possuem efeito sinérgico significativo nos níveis de resistência intrínseca aos antibióticos nestas duas espécies modelos testadas, diminuindo significativamente a CMI destes antibióticos. Em *E. coli* o efeito modulador variou de 4x a 32x enquanto em *L. plantarum* variou de 64x a 128x o que demonstra a capacidade de adjuvância destes compostos inibidores de efluxo no tratamento destas infecções;

b) Quais as diferenças existentes entre os métodos de análise e quantificação do efluxo de EtBr em tempo real usando o método desenvolvido no IHMT/NOVA usando o fluorímetro e termociclador em tempo real Rotor-Gene 3000 e o método fluorométrico desenvolvido por Coldham *et al.*, (2010) que recorre a um leitor de placas, apresentando-se as suas vantagens e suas desvantagens na Tabela 16.

Tabela 16. Comparação entre o fluorímetro e termociclador em tempo real Rotor-Gene 3000 e fluorímetro Synergy HT Microplate Reader.

Rotor-Gene 3000™ (Corbett Research)	Synergy HT Microplate Reader (BioTek Instruments)
- Rotor para 36 microtubos de 200 µl	- Formato “high-throughput” em microplacas de 96 poços para 200 µl
-Permite a análise de um reduzido número de amostras simultaneamente (36)	- Permite a análise de um elevado número de amostras simultaneamente (96)
- Possibilita expor as amostras a diferentes condições experimentais – “screening” limitado	- Possibilita expor as amostras a diferentes e variadas condições experimentais – “screening” mais alargado
- Elevada sensibilidade devido as características de detecção – rotor que permite a concentração das amostras aumentando a sensibilidade da detecção	- Menor sensibilidade devido ao formato do ensaio – placas de 96 poços, sem agitação, dispersão das amostras reduzindo a sensibilidade da detecção
- Variabilidade intra- e inter-ensaio elevada	- Variabilidade intra- e inter-ensaio reduzida

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que o fluorímetro Synergy HT Microplate Reader pode ser considerado uma alternativa ao fluorímetro e termociclador em tempo real Rotor-Gene 3000. Ambos os aparelhos apresentaram resultados e capacidades analíticas semelhantes permitindo efectuar as análises comparativas de capacidade de efluxo equivalentes.

O fluorímetro Synergy HT Microplate Reader em comparação com o fluorímetro e termociclador em tempo real Rotor-Gene 3000 apresenta uma menor sensibilidade devido à diferença nas características de detecção e formato do ensaio, sendo essa a sua maior desvantagem. Estes ensaios foram realizados utilizando placas de fluorimetria com fundo plano o que poderá proporcionar uma maior dispersão da fluorescência emitida no poço diminuindo a sensibilidade da detecção. Uma das alterações que se poderá efectuar futuramente para aumentar a sensibilidade do ensaio passa pela utilização de placas de fluorimetria com fundo redondo o que poderá permitir a concentração da amostra no poço com menor dispersão do sinal. O Synergy HT apresenta vantagens importantes em relação ao Rotor-Gene 3000, tais como, um formato “high-throughput” em microplacas de 96 poços, a possibilidade de usar um maior número de amostras, um “screening mais alargado” e a reduzida variabilidade intra- e inter-ensaio (Tabela 16).

Com base nos resultados obtidos e características do aparelho, pode-se considerar que este método em placa de 96 poços para a detecção de efluxo em bactérias confiável e reprodutível e pode ser uma alternativa segura do ponto de vista da biossegurança para a determinação da actividade de efluxo em tempo real em estirpe clínicas MDR auxiliando no estudo e desenvolvimento de novos fármacos que possam inibir o efluxo de antibióticos e assim funcionarem como adjuvantes da terapêutica antibiótica prevenindo a aquisição de resistência (Blair and Piddock, 2016).

5. Referências bibliográficas

1. Aendekerk, S., Ghysels, B., Cornelis, P., Baysse, C. (2002). Characterization of a new efflux pumps, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiology*, 148(8), 2371-2381.
2. Alegria, E.G., López, I., Ruiz, J. Ignacio., Sáenz, J., Fernández, E., Zarazaga, M., Dizy, M., Torres, C., Ruiz-Larrea, F. (2004). High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiology Letters*, 230, 53-61.
3. Ammor, M.S., Gueimonde, M., Danielsen, M., Zagoree, M., van Hoek, A H.A.M., de los Reyes-Gavilán, C.G., Mayo, B., Margolles, A. (2008). Two different tetracycline resistance mechanisms, plasmid-carried tet (L) and chromosomally located transposon-associated tet (M), coexist in *Lactobacillus sakei* rits 9. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 1394-1401.
4. Anes, J., McCusker, M. P., Fanning, S., & Martins, M. (2015). The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 587.
5. Ashraf, R., Shah, NP. (2011). Antibiotic resistance of probiotic organisms and safety of probiotic dairy products. *Internacional Food Research*, 18, 837-853.
6. Azevedo. C., Sunkel, C.E., (2012). *Biologia celular e molecular*. 5ª Edição, Lisboa, LIDEL - Edições Técnicas.
7. Bambeke, V. F., Pagès J.M., Lee V.J. (2006). Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. *Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery*, 1(2), 157-75.
8. Barroso, H., Meliço-Silvestre, A., Taveira, N. (2014). *Microbiologia Médica*, Volume 1 e 2. Lisboa, LIDEL - Edições Técnicas.

9. Baucheron, S., Imberechts, H., Chaslus-Dancla, E., Cloeckert, A. (2002). The AcrB multidrug transporter plays a major role in high-level fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium phage type DT204. *Microbial drug resistance*, 8(4), 281-289.
10. Blair, J.M., Piddock, L.J.V. (2009). Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Current Opinion in Microbiology*, 12(5), 512-519.
11. Blair, J.M., Piddock, L.J.V. (2016). How to measure export via bacterial multidrug resistance efflux pumps. *mBio*, 7(4), e00840-16.
12. Bohnert, J.A., Karamian, B., Nikaido, H. (2010). Optimized Nile Red efflux assay of AcrAB-TolC multidrug efflux system shows competition between substrates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 3770-3775.
13. Bohnert, J.A., Kern, W.V. (2016). Antimicrobial Drug Efflux Pump Inhibitors. Em: Li XZ., Elkins C., Zgurskaya H. editors. Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Adis, Cham: Springer International Publishing*, 775- 795.
14. Chen, H.D., Frankel, G. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiology Letters*, 29, 83-98.
15. Chuanchuen, R., Murata, T., Gotoh, N., Schweizer, H. P. (2005). Substrate-dependent utilization of OprM or OpmH by the *Pseudomonas aeruginosa* MexJK efflux pump. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), 2133-2136.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2005). Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Proposed Guideline. CLSI document M45-P. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2016). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
18. Coelho, T., Machado, D., Couto, I., Maschmann, R., Ramos, D., von Groll, A., Rossetti, M.L., Silva, P.A., Viveiros, M. (2015). Enhancement of antibiotic activity by efflux inhibitors against multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil. *Frontiers in Microbiology*, 6(330), 1-12.
19. 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*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 1655-1663.
20. Costa, S. (2009). Caracterização preliminar da bioenergética do efluxo pelo sistema AcrAB-TolC em *Escherichia coli*. Dissertação para a obtenção do grau de mestre em Microbiologia Médica. Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Universidade Nova de Lisboa.
21. Costa, S.S., Viveiros, M., Amaral, L., Couto, I. (2013). Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. *The Open Microbiology Journal*, 7, 59-71.
22. Coudeyras, S., Nakusi, L., Charbonnel, N., Forestier, C. (2008). A tripartite efflux pump involved in gastrointestinal colonization by *Klebsiella pneumoniae* confers a tolerance response to inorganic acid. *Infection and Immunity*, 76(10), 4633-4641.
23. Coyne¹, S., Rosenfeld, N., Lambert, T., Courvalin, P., Périchon, B. (2010). Overexpression of Resistance-Nodulation-Cell Division Pump AdeFGH Confers Multidrug Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 4389-4393.

24. Cristóbal, R.E., Vincent P. A., Salomón R. A. (2006). Multidrug resistance pump AcrAB-TolC is required for high-level, Tet (A) -mediated tetracycline resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(1), 31-36.
25. Damier-Piolle, L., S. Magnet, S. Bremont, T. Lambert, and P. Courvalin. 2008. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 557-562.
26. Danielson, M., Wind, A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agentes: *Internacional Journal of Food Microbiology*, 82, 1-11.
27. De Sousa, J. C. (2006). Manual de antibióticos antibacterianos. 2ª Edição. Porto. Edições Universidade Fernando Pessoa.
28. De Vuyst, L., Degeest, B. (1999), Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 153-177.
29. Edgar, R., Bibi, E. (1997). MdfA, an *Escherichia coli* multidrug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition. *Journal of Bacteriology*, 179(7), 2274-2280.
30. Elbourne, L.D.H., Tetu, S., Hassan, K., Paulsen, I. T. (2017 - in press). TransportDB 2.0: a database for exploring membrane transporters in sequenced genomes from all domains of life. *Nucleic Acids Research*. (<http://www.membranetransport.org/transportDB2/index.html> - Acedido em 13 Junho 2017)
31. Elkins, C. A., Nikaido, H. (2002). Substrate Specificity of the RND-Type Multidrug Efflux Pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* is determined

- predominately by two large periplasmic loops. *Journal of Bacteriology*, 184(23), 6490-6498.
32. Farnworth, E.R. (2008). Handbook of fermented functional foods. 2º Edição. CRC Press.
33. Ferreira, W.F., Sousa, J.C. (2000). Microbiologia. 1º Edição. Volume 2. Lisboa. Lidel.
34. Gevers, D., Danielsen, M., Huys, G., & Swings, J. (2003). Molecular characterization of tet (M) genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 1270-1275.
35. Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R., Pavilionis, A. (2011). Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas)*, 47(3), 137-46.
36. Hagman, K.E., Lucas, C.E., Balthazar, J.T., Snyder, L., Nilles, M., Judd, R.C., Shafer, W.M. (1997). The MtrD protein of *Neisseria gonorrhoeae* is a member of the resistance/nodulation/division protein family constituting part of an efflux system. *Microbiology*, 143(7), 2117-2125.
37. He, G.-X., Zhang, C., Crow, R. R., Thorpe, C., Chen, H., Kumar, S., Varela, M. F. (2011). SugE, a new member of the SMR family of transporters, contributes to antimicrobial resistance in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(8), 3954-3957.
38. He, G.-X., Thorpe, C., Wash, D., Crow, R., Chen, H.-Z., Kumar, S., Varela, M. F. (2011). EmmdR, a new member of the MATE family of multidrug transporters, extrudes quinolones from *Enterobacter cloacae*. *Archives of Microbiology*, 193(10), 759-765.

39. He, G.-X., Kuroda, T., Mima, T., Morita, Y., Mizushima, T., Tsuchiya, T. (2004). An H⁺-coupled multidrug efflux pump, PmpM, a member of the MATE family of transporters, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 186(1), 262-265.
40. Johansson, M.-L., Molin, G., Jeppsson, B., Nobaek, S., Ahrné, S., and Bengmark, S. (1993). Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: In vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 15-20.
41. Kobayashi, N., Nishino, K., Yamaguchi, A. (2001). Novel Macrolide-Specific ABC-Type Efflux Transporter in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 183 (19), 5639-5644.
42. Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123-40.
43. Kawamura-Sato, K., Shibayama, K., Horii, T., Iimuma, Y., Arakawa, Y. Ohta, M. (1999), Role of multiple efflux pumps in *Escherichia coli* in indole expulsion. *FEMS Microbiology Letters*, 179, 345-352.
44. Kern W. V., Steinke P., Schumacher A., Schuster S., von Baum H., Bohnert J. A. (2006). Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57, 339-343.
45. Kleerebezem M, Boekhorst J, van Kranenburg R, Molenaar D, Kuipers OP, Leer R, Tarchini R, Peters SA, Sandbrink HM, Fiers MW. et al., (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus Plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4), 1990-1995.

46. Kumar, A., Schweizer, HP. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1486-1513.
47. Kummerer, K. (2003). Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52, 5-7.
48. Lee, E.H., Shafer, W.M. (1999). The farAB-encoded efflux pump mediates resistance of gonococci to long-chained antibacterial fatty acids. *Molecular Microbiology*, 33(4), 839-845.
49. Levy, S. B., and Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10, 122-129.
50. Li, Y., Mima, T., Komori, Y., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T., Tsuchiya, T. (2003). A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW–OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52 (4), 572-575.
51. Li X.-Z., Nikaido, H. (2009) Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: an Update. *Drugs*, 69(12), 1555-1623.
52. Li, X-Z., Nikaido, H. (2004). Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*, 64(2), 159-204.
53. Lomovskaya, O., Lewis, K. (1992). Emr, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 8938-8942.
54. Lomovskaya, O., Watkins, W.J. (2001). Efflux pumps: their role in antibacterial drug discovery. *Current Medicinal Chemistry*, 8(14), 1699-711.

55. Ma, D., Cook, D. N., Alberti, M., Pon, N. G., Nikaido, H., Hearst, J. E. (1995). Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 16, 45-55.
56. Machado, D., Coelho, T. S., Perdigão, J., Pereira, C., Couto, I., Portugal, I., Viveiros, M. (2017). Interplay between mutations and efflux in drug resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 711.
57. 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.
58. Madej, M. G., Kaback, H. R. (2013). Evolutionary mix-and-match with MFS transporters II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(50), E4831-E4838.
59. Magnet, S., Courvalin, P., Lambert, T. (2001). Resistance-Nodulation-Cell Division-Type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(12), 3375-3380.
60. Mahamoud, A., Chevalier, J., Alibert-Franco, S., Kern, W. V., Pagès, J.-M. (2007). Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(6), 1223-1229.
61. Marquez, B. (2005). Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie*, 87(12), 1137-1147.
62. Martins, M., Viveiros, M., Couto, I., Costa, S.S., Pacheco, T., Fanning, S., Pagès, J.M., Amaral, L. (2011). Identification of efflux pump-mediated multidrug-

- resistant bacteria by the ethidium bromide-agar cartwheel method. *In Vivo*, 25(2), 171-8.
63. Moussatova, A., Kandt, C., O'Mara, M., L., Tieleman, D. P. (2008). ATP binding cassette transporters in *Escherichia coli*. *Biochimic and Biophysica Acta*, 1778, 1757-1771.
64. Naroditskaya V., Schlosser M. J., Fang N. Y., Lewis K. (1993). An *E. coli* gene emrD is involved in adaptation to low energy shock. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 196, 803-809.
65. Nelson, D. L., Cox, M. M. (2014). Princípios de bioquímica de lehninger. 6º Edição. Porto Alegre: Artmed.
66. Nikaido, H. (2011). Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 77, 1-60.
67. Nishino, K., Yamaguchi, A. (2001). Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 183(20), 5803-5812.
68. Nishino, K., Latifi, T. and Groisman, E. A. (2006), Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 59, 126-141.
69. Normark, B. H., Normark, S. (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine*, 252, 91-106.
70. Ogawa, W., Koterasawa, M., Kuroda, T., Tsuchiya, T. (2006). KmrA multidrug efflux pump from *Klebsiella pneumoniae*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29, 550-553.

71. Olmsted, J., Kearns, D.R. (1977). Mechanism of ethidium bromide fluorescence enhancement on binding to nucleic acids. *Biochemistry*, 16, 3647-3654.
72. Padilla, E., Llobet, E., Doménech-Sánchez, A., Martínez-Martínez, L., Bengoechea, J. A., & Albertí, S. (2010). *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(1), 177-183.
73. Paixão, L., Rodrigues, L., Couto, I., Martins, M., Fernandes, P., de Carvalho, C., Monteiro, G., Sansonetty, F., Amaral, L., Viveiros, M. (2009). Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Engineering*, 3, 18.
74. Pallasch, T.J. (2003). Antibiotic resistance. *Dental Clinics of North America*, 47(4), 623-39.
75. Pao, S.S., Paulsen I.T., Saier M.H. Jr. (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(1), 1-34.
76. Perez, F., Rudin, S. D., Marshall, S. H., Coakley, P., Chen, L., Kreiswirth, B. N., Bonomo, R. A. (2013). OqxAB, a quinolone and Olaquinox efflux pump, is widely distributed among multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates of human origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(9), 4602-4603.
77. Piddock, L.J.V. (2006). Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(2), 382-402.
78. Pinto, A. (2012). Resistência mediada por efluxo em *Escherichia coli*: novas estratégias terapêuticas utilizando antibióticos e inibidores de efluxo. Dissertação

para a obtenção do grau de mestre em Ciências Biomédicas. Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Universidade Nova de Lisboa.

79. Poole, K., Srikumar, R. (2001). Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa* components, mechanisms and clinical significance. *Current Topics in Medical Chemistry*, 1, 59-71.
80. Pradel, E., Pagès J.M. (2002). The AcrAB-TolC efflux pump contributes to multidrug resistance in the nosocomial pathogen *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(8), 2640-2643.
81. Purewal, A.S. (1991). Nucleotide sequence of the ethidium efflux gene from *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 82, 229-232.
82. Putman M., Veen H.W. V., Konings W. N. (2000). Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1092, 672-693.
83. Rajamohan, G., Srinivasan, V. B., Gebreyes, W. A., (2010). Novel role of *Acinetobacter baumannii* RND efflux transporters in mediating decreased susceptibility to biocides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 228-232.
84. Rao, M.S., Pintado, J., Stevens, W.F., Guyot, J.P. (2004). Kinetic growth parameters of different amyolytic and non-amyolytic *Lactobacillus* strains under various salt and pH conditions. *Bioresource Technology*, 94(3), 331-7.
85. Richmond, G. E., Chua, K. L., Piddock, L. J. V. (2013). Efflux in *Acinetobacter baumannii* can be determined by measuring accumulation of H33342 (bis-benzamide). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(7), 1594-1600.
86. Roca, I., Marti, S., Espinal, P., Martínez, P., Gibert, I., Vila, J. (2009). CraA, a Major Facilitator Superfamily efflux pump associated with chloramphenicol

- resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(9), 4013-4014.
87. Rosenberg, E. Y., Ma, D., Nikaido, H. (2000). AcrD of *Escherichia coli* is an Aminoglycoside Efflux Pump. *Journal of Bacteriology*, 182(6), 1754-1756.
88. Rouquette-Loughlin, C., Dunham, S. A., Kuhn, M., Balthazar, J. T., Shafer, W. M. (2003). The NorM efflux pump of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* recognizes antimicrobial cationic compounds. *Journal of Bacteriology*, 185(3), 1101-1106.
89. Rouquette-Loughlin C. E., Balthazar J. T., Shafer W. M. (2005). Characterization of the MacA-MacB efflux system in *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, 856-860.
90. Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12, 163-171.
91. Siezen, R. J., van Hylckama Vlieg, J. E. (2011). Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. *Microbial Cell Factories*, 10, 1-13.
92. Songisepp, E., Hütt, P., Rätsep, M., Shkut, E., Kõljalg, S., Truusalu, K., Stsepetova, J., Smidt, I., Kolk, H., Zagura, M., Mikelsaar, M. (2012). Safety of a probiotic cheese containing *Lactobacillus plantarum* Tensia according to a variety of health indices in different age groups. *Journal of Dairy Science*, 95(10), 5495-509.
93. Srikumar, R., Kon, T., Gotoh, N., Poole, K. (1998). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-

- OprJ in a multidrug-sensitive *Escherichia coli* strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(1), 65-71.
94. Srinivasan, V.B., Rajamohan, G., Gebreyes, W. A. (2009). Role of AbeS, a novel efflux pump of the SMR family of transporters, in resistance to antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 5312-5316.
95. Su, X,-Z., Chen, J., Mizushima, T., Kuroda, T., Tsuchiya, T. (2005). AbeM, an H⁺ coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 4362-4364.
96. Thaker, M., Spanogiannopoulos, P., Wright, G.D. (2010). The tetracycline resistome. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, 419.
97. Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L. (2016). Microbiology: an introduction. 12ª edição. Artmed Editora.
98. Turner, R. J., Taylor, D. E., Weiner, J. H. (1997). Expression of *Escherichia coli* TehA gives resistance to antiseptics and disinfectants similar to that conferred by multidrug resistance efflux pumps. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(2), 440-444.
99. Viveiros, M., Jesus, A., Brito, M., Leandro, C., Martins, M., Ordway, D., Molnar, A., Molnar, J., Amaral, L. (2005). Inducement and Reversal of Tetracycline Resistance in *Escherichia coli* K-12 and Expression of Proton Gradient-Dependent Multidrug Efflux Pump Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(8), 3578-3582.
100. Viveiros, M., Martins, A., Paixão, L., Rodrigues, L., Martins, M., Couto, I., Fahnrich, E., Kern, W., Amaral, L. (2008). Demonstration of intrinsic efflux

- activity of *Escherichia coli* K-12 AG100 by an automated ethidium bromide method. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31(5), 458-62.
101. 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. *Methods in Molecular Biology*, 642, 159-72.
102. Wachter-Rodarte, M. del C., Trejo-Muñúzuri, T. P., Montiel-Aguirre, J. F., Drago-Serrano, M. E., Gutiérrez-Lucas, R. L., Castañeda-Sánchez, J. I., Sainz-Espuñes, T. (2016). Antibiotic resistance and multidrug-resistant efflux pumps expression in lactic acid bacteria isolated from pozol, a nonalcoholic Mayan maize fermented beverage: *Food Science & Nutrition*, 4(3), 423-430.
103. Wannmacher, L. (2004). Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? *Uso Racional de Medicamentos*, 1(4), 1-6.
104. Webber, M. A., Piddock, L. J. V. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(1), 9-11.