



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Reposicionamento de fármacos com atividade sobre o efluxo e a
formação de biofilmes em *Staphylococcus epidermidis*

Joana Franco de Matos e Silva Neves

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

JANEIRO, 2023



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902





Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Reposicionamento de fármacos com atividade sobre o efluxo e a formação de biofilmes em *Staphylococcus epidermidis*

Autora: Joana Franco de Matos e Silva Neves

Orientadora: Doutora Sofia Santos Costa

Coorientadora: Professora Doutora Liliana Rodrigues

Coorientadora: Professora Doutora Isabel Couto

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de
Mestre em Microbiologia Médica

Apoio financeiro do projeto BIOSAFE, LISBOA-01-0145-FEDER-030713, PTDC/CAL-EST/30713/2017, financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER)/Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) e do projeto DREBI, Ref. 2022.07931.PTDC, financiado pela FCT.



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902



Comunicações

Os resultados desta Dissertação foram submetidos, em co-autoria, para apresentação em congresso internacional:

Neves J*, Antunes C*, Andrade M, Couto I, Rodrigues L, Costa SS. Drug repurposing for identification of new efflux pump inhibitors and/or antibiofilm agents against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Abstract submetido ao 33rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 15–18 Abril 2023, híbrido *online*/Copenhaga, Dinamarca.

* Estes autores contribuíram de igual forma para o trabalho.

Agradecimentos

À Doutora Sofia Santos Costa, que me guiou durante todo este processo, pela orientação e conhecimentos transmitidos, pela paciência que teve para os meus stresses e ansiedades, pela simpatia e por estar sempre disponível para me ajudar. Muito obrigada.

À professora Doutora Liliana Rodrigues, pela orientação, pela disponibilidade e por toda a ajuda ao longo deste trabalho. Muito obrigada.

À Professora Doutora Isabel Couto, pela orientação, pelos conhecimentos transmitidos ao longo do mestrado e pela oportunidade de trabalhar no seu laboratório. Muito obrigada.

À Mariana, por me ter dado a conhecer o laboratório, pelas conversas e pela companhia no laboratório e nas horas de almoço. Obrigada por todo o apoio e motivação.

À Carolina, que me acompanhou ao longo da tese. Obrigada pela entreaajuda e pela companhia no laboratório.

Aos restantes membros da equipa do projeto BIOSAFE, por me terem recebido e se mostrarem sempre disponíveis para ajudar.

À Unidade de Microbiologia Médica, por todo o apoio ao longo deste ano.

À coordenação da décima edição do Mestrado em Microbiologia Médica e a todos os professores que me transmitiram os seus conhecimentos, que contribuíram para a realização desta dissertação.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram em todas as etapas da vida e sem os quais não teria sido possível chegar aqui. Muito obrigada por todo o apoio financeiro, mas, principalmente, por todo o apoio emocional e por acreditarem sempre em mim e nas minhas capacidades e me apoiarem nos momentos mais difíceis.

Aos meus irmãos, que me apoiaram ao longo de todo este percurso. Em especial, à minha irmã, que me acompanha desde sempre em todos os momentos e que viveu comigo todos os stresses e ansiedades durante a escrita desta Dissertação. Muito obrigada.

A todos os meus restantes familiares, que sempre me apoiaram e acreditaram nas minhas capacidades. Obrigada.

Ao Filipe, por todas as palavras de encorajamento e motivação, por acreditar em mim e me ter apoiado sempre ao longo deste caminho, por me fazer ver o lado positivo nos momentos mais complicados. Obrigada por tudo.

À Jéssica e à Joana, por me terem acompanhado ao longo de todo o mestrado, por todas as conversas, conselhos e desabafos que partilhámos. Obrigada pela vossa amizade e pelo vosso apoio.

Resumo

A espécie *Staphylococcus epidermidis* é um importante agente patogénico nosocomial, geralmente associado a elevada resistência aos compostos antimicrobianos mediada por diversos mecanismos, incluindo o efluxo. Adicionalmente, a sua capacidade de formar biofilmes permite-lhe sobreviver quando exposto a compostos antimicrobianos, tornando as infeções resilientes à terapêutica. Vários estudos sugerem uma potencial associação entre o efluxo e a formação de biofilmes. Este trabalho teve como objetivo a identificação de novos fármacos capazes de inibir a atividade de efluxo e/ou formação de biofilmes em *S. epidermidis* através de reposicionamento de fármacos, usando uma abordagem de quimiogenómica *in silico*.

O trabalho teve início na criação de uma biblioteca de potenciais alvos terapêuticos em *S. epidermidis*, consistindo em 321 transportadores de membrana, incluindo bombas de efluxo, e 39 proteínas envolvidas na formação de biofilme. A partir da base de dados DrugBank compilou-se uma lista de 233 fármacos potencialmente ativos contra transportadores de membrana e/ou biofilmes. Foram selecionados sete fármacos (tariquidar, cloroquina, amlodipina, desipramina, sulpirida, topiramato, atovaquone) para avaliação *in vitro* das suas atividades, sendo estas comparadas com inibidores de efluxo (IEs) conhecidos. Todos os compostos foram testados em dois pares de estirpes isogénicas de *S. epidermidis* diferindo na expressão do gene *norA*, que codifica para a bomba de efluxo NorA, e capacidade de formação de biofilme, nomeadamente ATCC 12228 (*ica*⁻) e ATCC 12228_EtBr (*norA* sobreexpresso) e ATCC 35984 (*ica*⁺) e ATCC 35984_EtBr (*norA* sobreexpresso).

A atividade inibitória de efluxo dos fármacos foi avaliada pela sua capacidade para reduzir a concentração mínima inibitória (CMI) de oito compostos antimicrobianos usando o método de microdiluição em placa. O tariquidar, cloroquina, amlodipina e desipramina reduziram em $\geq 4x$ as CMIs dos compostos antimicrobianos substratos de NorA e foram considerados potenciais IEs. O topiramato, sulpirida e atovaquone promoveram uma redução $\leq 2x$, sendo classificados como potenciais IEs fracos ou sem atividade inibitória de efluxo.

Seguidamente, realizaram-se ensaios de *checkerboard* para determinar um potencial sinergismo entre os fármacos e compostos antimicrobianos. O tariquidar e a amlodipina

foram os únicos que demonstraram sinergismo com todos os compostos antimicrobianos testados a concentrações equivalentes a 1/64 CMI (2 mg/L) e 1/4 CMI (16 mg/L), respetivamente. A desipramina e a cloroquina apresentaram sinergismo com ciprofloxacina ou ausente, respetivamente.

A inibição da formação de biofilme foi avaliada pelo método de adesão em microplaca com coloração por violeta de cristal. A atividade antibiofilme dos fármacos variou consoante a estirpe testada, tendo a amlodipina apresentado atividade em ATCC 12228, enquanto a cloroquina e a desipramina inibiram a formação de biofilme em ATCC 35984 e na sua derivada, ATCC 35984_EtBr.

Resumindo, neste trabalho identificou-se a amlodipina como inibidor de efluxo e agente antibiofilme; o tariquidar como um potente inibidor de efluxo; e a cloroquina e a desipramina como apresentando principalmente potencial como novos agentes antibiofilme em *S. epidermidis*. Demonstrou-se que a estratégia de reposicionamento de fármacos usada permitiu a identificação rápida e pouco dispendiosa de novos fármacos para combater infeções por *S. epidermidis* e servir de *leads* para o desenvolvimento de fármacos mais eficazes.

Palavras-chave: *Staphylococcus epidermidis*, efluxo, biofilme, reposicionamento de fármacos, resistência aos compostos antimicrobianos

Abstract

Staphylococcus epidermidis is an important opportunistic nosocomial pathogen, usually associated with a high burden of antimicrobial resistance mediated by several mechanisms, including efflux. Also, its ability to form biofilms allows it to survive when exposed to antimicrobials, rendering infections hard to treat. Several studies have suggested a potential association between efflux and biofilm formation. This work aimed to identify new drugs capable of inhibiting efflux activity and/or biofilm formation in *S. epidermidis* through drug repurposing, using an *in silico* chemogenomics approach.

A library of potential therapeutic targets in *S. epidermidis* was created, consisting of 321 membrane transporters, including efflux pumps, and 39 proteins involved in biofilm formation. The DrugBank database was then used to compile a list of 233 drugs potentially active against membrane transporters and/or biofilms. Seven drugs (tariquidar, chloroquine, amlodipine, desipramine, sulpiride, topiramate, atovaquone) were selected for *in vitro* evaluation and their activities compared with known efflux inhibitors (EIs). All compounds were tested in two pairs of *S. epidermidis* isogenic strains differing in expression of the efflux pump gene *norA* and their capacity to form biofilm, namely ATCC 12228 (*ica*⁻) and ATCC 12228_EtBr (*norA* overexpressed) and ATCC 35984 (*ica*⁺) and ATCC 35984_EtBr (*norA* overexpressed).

The efflux inhibitory activity was assessed by determining the drugs' capacity to reduce the minimum inhibitory concentration (MIC) of eight antimicrobials using the microdilution method. Tariquidar, chloroquine, amlodipine and desipramine reduced the MICs of antimicrobials that are NorA substrates by ≥ 4 -fold and were considered potential EIs. Topiramate, sulpiride and atovaquone promoted a reduction by ≤ 2 -fold and were classified as potential weak EIs or with no efflux inhibitory activity.

Checkerboard assays were performed to evaluate a potential synergism between the drugs and antimicrobials. Tariquidar and amlodipine were the only drugs showing synergism with all antimicrobials tested at concentrations equivalent to 1/64 MIC (2 mg/L) and 1/4 MIC (16 mg/L), respectively. Desipramine and chloroquine showed synergism with ciprofloxacin or it was absent, respectively.

Inhibition of biofilm formation was assessed by the plate adhesion method with crystal violet staining. The antibiofilm activity of the drugs varied according to the strain, with amlodipine showing activity in ATCC 12228, while chloroquine and desipramine inhibited biofilm formation in ATCC 35984 and its derivative ATCC 35984_EtBr.

In summary, in this work we identified amlodipine as an efflux inhibitor and antibiofilm agent; tariquidar as a potent efflux inhibitor; and chloroquine and desipramine as new potential antibiofilm agents in *S. epidermidis*. We show that the drug repurposing strategy used allowed a fast and inexpensive identification of new drugs to fight *S. epidermidis* infections or to serve as leads for the development of more effective drugs.

Keywords: *Staphylococcus epidermidis*, efflux, biofilm, drug repurposing, antimicrobial resistance

ÍNDICE

Comunicações.....	i
Agradecimentos.....	ii
Resumo.....	iv
Abstract.....	vi
Índice de figuras.....	xii
Índice de tabelas.....	xiii
Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos	xv
1 Introdução	1
1.1 Género <i>Staphylococcus</i>	1
1.1.1 Características gerais de <i>S. epidermidis</i>	2
1.1.2 Importância clínica de <i>S. epidermidis</i>	2
1.1.3 Terapêutica de infeções causadas por <i>S. epidermidis</i>	4
1.2 Resistência aos compostos antimicrobianos	5
1.2.1 Compostos antimicrobianos.....	5
1.2.2 Mecanismos de resistência aos compostos antimicrobianos	8
1.2.3 Sistemas de efluxo	10
1.2.4 Biofilmes.....	13
1.2.5 Relação entre efluxo e biofilmes	18
1.3 Descoberta e desenvolvimento de compostos antimicrobianos	19
1.3.1 Reposicionamento de fármacos	20
1.3.1.1 Exemplos de fármacos propostos para reposicionamento em estafilococos	21
1.4 Objetivos	23
2 Material e Métodos.....	25

2.1	Material	25
2.1.1	Estirpes bacterianas.....	25
2.1.2	Meios de cultura e soluções	26
2.2	Métodos.....	28
2.2.1	Identificação de fármacos candidatos por quimiogenómica – reposicionamento <i>in silico</i>	28
2.2.1.1	Criação de uma biblioteca de potenciais alvos terapêuticos associados ao transporte membranar	29
2.2.1.2	Criação de uma biblioteca de potenciais alvos terapêuticos associados aos biofilmes.....	29
2.2.1.3	Criação de uma biblioteca de fármacos potencialmente eficazes contra o efluxo e/ou biofilmes	29
2.2.2	Validação <i>in vitro</i> das atividades inibitória de efluxo e antibiofilme dos fármacos candidatos.....	30
2.2.2.1	Crescimento das estirpes bacterianas	32
2.2.2.2	Determinação de CMIs	32
2.2.2.3	Determinação de CMIs dos compostos antimicrobianos na presença dos IEs controlo e fármacos candidatos	34
2.2.2.4	Determinação de efeito de sinergismo entre compostos através de ensaios de <i>checkerboard</i>	35
2.2.2.5	Avaliação da atividade antibiofilme dos IEs controlo e fármacos candidatos	39
3	Resultados	43
3.1	Criação de uma biblioteca de potenciais alvos terapêuticos associados ao efluxo.....	43
3.2	Criação de uma biblioteca de potenciais alvos terapêuticos associados aos biofilmes.....	43

3.3	Criação de uma biblioteca de fármacos potencialmente eficazes contra o efluxo e os biofilmes	44
3.4	Validação <i>in vitro</i> das atividades inibitória de efluxo e/ou antibiofilme dos fármacos candidatos	49
3.4.1	Determinação de concentrações mínimas inibitórias.....	49
3.4.2	Determinação de CMIs dos compostos antimicrobianos na presença dos IEs controlo ou fármacos candidatos	50
3.4.3	Avaliação de sinergismo entre compostos através de ensaios de <i>checkerboard</i>	55
3.4.4	Determinação da atividade antibiofilme	58
4	Discussão e Conclusões.....	65
4.1	Identificação de fármacos candidatos com potencial ação contra o efluxo e biofilmes por quimiogenómica	65
4.2	Validação do modelo experimental para avaliação <i>in vitro</i> de atividades de inibição de efluxo e antibiofilme.....	68
4.3	Avaliação da atividade biológica dos fármacos candidatos.....	71
5	Referências bibliográficas.....	81
6	Anexos.....	103

Índice de figuras

Figura 1. Fases de formação do biofilme e fatores envolvidos em cada fase.....	13
Figura 2. Fluxograma usado para identificação de fármacos candidatos com possível atividade contra o efluxo e/ou biofilmes em <i>S. epidermidis</i>	28
Figura 3. Fluxograma usado para validação <i>in vitro</i> das atividades inibitória de efluxo e antibiofilme dos fármacos candidatos.....	31
Figura 4. Esquema do método de microdiluição em placa de 96 poços para determinação de CMIs.	33
Figura 5. Esquema do método de microdiluição em placa de 96 poços para determinação das CMIs na presença dos IEs controle e dos fármacos candidatos.	34
Figura 6. Esquema do ensaio de <i>checkerboard</i> para avaliação de sinergismo entre os compostos antimicrobianos e os IEs controle ou fármacos candidatos. .	38
Figura 7. Esquema do ensaio de adesão em microplaca com coloração com violeta de cristal para determinação da atividade antibiofilme dos IEs controle e fármacos candidatos.....	40
Figura 8. Resultados obtidos com a aplicação do fluxograma para identificação de fármacos contra o efluxo e a formação de biofilmes em <i>S. epidermidis</i>	45
Figura 9. Distribuição dos fármacos candidatos de acordo com a sua superclasse química (A) e indicação terapêutica (B).	47
Figura 10. Exemplos de ensaios de <i>checkerboard</i> para as combinações EtBr + TAR e EtBr + VER na estirpe <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984_EtBr.	57
Figura 11. Efeito dos IEs controle e fármacos candidatos na produção de biofilme na estirpe <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.....	61
Figura 12. Efeito dos IEs controle e fármacos candidatos na produção de biofilme na estirpe <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984.....	62
Figura 13. Efeito dos IEs controle e fármacos candidatos na produção de biofilme na estirpe <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984_EtBr.	63

Índice de tabelas

Tabela 1. Características genotípicas e fenotípicas de interesse das estirpes em estudo.	25
Tabela 2. Composição dos meios de cultura utilizados ao longo do trabalho.	26
Tabela 3. Composição das soluções utilizadas.	26
Tabela 4. Composição das soluções <i>stock</i> e de trabalho dos compostos estudados.	27
Tabela 5. Gamas de concentrações testadas para a determinação de CMI dos compostos para as quatro estirpes em estudo.	33
Tabela 6. Gamas de concentrações testadas usadas na re-determinação de CMI dos compostos antimicrobianos na presença dos IEs controle e dos fármacos candidatos.	35
Tabela 7. Gamas de concentrações dos IEs controle, dos fármacos candidatos e dos compostos antimicrobianos testadas nos ensaios de <i>checkerboard</i>	36
Tabela 8. Lista de genes envolvidos na formação de biofilmes em <i>S. epidermidis</i> e a sua função.	43
Tabela 9. Superclasse química e indicação terapêutica dos fármacos candidatos selecionados para a experimentação <i>in vitro</i>	48
Tabela 10. CMI dos compostos antimicrobianos, IEs controle e fármacos candidatos para as quatro estirpes de <i>S. epidermidis</i> em estudo.	49
Tabela 11. Concentrações usadas na re-determinação das CMI dos compostos antimicrobianos na presença dos IEs controle ou fármacos candidatos para as quatro estirpes de <i>S. epidermidis</i> em estudo.	51
Tabela 12. CMI dos compostos antimicrobianos e EtBr na presença dos IEs controle para as quatro estirpes de <i>S. epidermidis</i> em estudo.	51
Tabela 13. CMI dos compostos antimicrobianos e EtBr na presença dos fármacos candidatos para as quatro estirpes de <i>S. epidermidis</i> em estudo.	53

Tabela 14. Valores de FICI obtidos para cada combinação de composto antimicrobiano-IE controlo/fármaco candidato para as duas estirpes de <i>S. epidermidis</i> adaptadas.	56
Tabela 15. Efeito dos fármacos candidatos e IEs controlo na redução de formação de biofilme nas estirpes <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228, ATCC 35984 e ATCC 35984_EtBr.	58
Tabela 16. Número de transportadores codificados nos genomas de <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 e ATCC 35984 de acordo com a classe a que pertencem.	67
Tabela 17. Valores mínimos de concentração associados a sinergismo e efeito antibiofilme em <i>S. epidermidis</i>	77
Tabela A1. Distribuição dos transportadores identificados na base de dados Transport DB 2.0 por classe e família.	103
Tabela A2. Distribuição dos fármacos identificados na base de dados DrugBank por superclasses químicas.	116

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

% (p/v) – percentagem massa/volume

% (v/v) – percentagem volume/volume

ABC – *ATP-binding cassette*

AML – amlodipina

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATO – atovaquone

ATP – adenosina trifosfato

BAC – cloreto de benzalcónio

CA-MHB – meio Mueller Hinton líquido ajustado a catiões, do inglês *cation-adjusted Mueller Hinton broth*

CHX – clorexidina

CIP – ciprofloxacina

CLO – cloroquina

CMI – concentração mínima inibitória

CoNS – estafilococos não produtores de coagulase, do inglês *coagulase-negative staphylococci*

CoPS – estafilococos produtores de coagulase, do inglês *coagulase-positive staphylococci*

CPZ – clorpromazina

DES – desipramina

DNA – ácido desoxirribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*

ECDC – *European Centre for Disease Prevention and Control*

eDNA – ácido desoxirribonucleico extracelular, do inglês *extracellular deoxyribonucleic acid*

ERI – eritromicina

EtBr – brometo de etídio

EUCAST – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FDA – *U.S. Food and Drug Administration*

FICI – índice de concentração inibitória fracionária, do inglês *fractional inhibitory concentration index*

GEN – gentamicina

h – hora

IE – inibidor de efluxo

L – litro

MATE – *multidrug and toxic-compound extrusion*

MDR – multirresistência, do inglês *multidrug resistance*

MFS – *major facilitator superfamily*

mg – miligrama

MHB – meio Mueller Hinton líquido, do inglês *Mueller Hinton broth*

min – minuto

mL – mililitro

mm – milímetro

mmol – milimole

MRSE – *Staphylococcus epidermidis* resistente à meticilina, do inglês *methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis*

MSCRAMMS – componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas de adesão da matriz, do inglês *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*

MSSE – *Staphylococcus epidermidis* suscetível à meticilina, do inglês *methicillin-susceptible Staphylococcus epidermidis*

nm – nanómetro

°C – graus Celsius

OD – densidade óptica, do inglês *optical density*

PBP – proteína de ligação à penicilina, do inglês *penicillin-binding protein*

PBS – tampão fosfato-salino, do inglês *phosphate-buffered saline*

PIA – polissacarídeo de adesão intercelular, do inglês *polysaccharide intercellular adhesin*

PSM – modulinas solúveis em fenol, do inglês *phenol-soluble modulins*

QAC – composto de amónio quaternário, do inglês *quaternary ammonium compound*

RES – reserpina

RNA – ácido ribonucleico, do inglês *ribonucleic acid*

RND – *resistance-nodulation-cell division*

rpm – rotações por minuto

S – Svedberg

SD – desvio padrão

SMR – *small multidrug resistance*

SUL – sulpirida

TAR - tariquidar

TET – tetraciclina

TOP – topiramato

TPP – brometo de tetrafenilfosfônio

TSA – meio de triptona de soja sólido, do inglês *tryptone soya agar*

TSB – meio de triptona de soja líquido, do inglês *tryptone soya broth*

TZ – tioridazina

UFC – unidade formadora de colônias

VER – verapamil

μL – microlitro

μm – micrómetro

μM - micromolar

1 Introdução

1.1 Género *Staphylococcus*

O género *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae* e engloba 63 espécies e 10 subespécies, sendo *Staphylococcus aureus* a espécie tipo deste género (1). Os membros do género *Staphylococcus* apresentam um conteúdo em guanina+citosina (G+C) de cerca de 30 a 39 mol% (2). As bactérias deste género apresentam coloração de Gram positiva e morfologia esférica em forma de coco, com um diâmetro de 0,5 a 1,5 µm (2), podendo ocorrer como células isoladas, em pares, tétrades, cadeias ou aglomerados em forma de cacho de uva (2). De facto, o nome deste género deriva do grego *staphylê* – cacho de uvas – e *kokkos* – grão ou semente (1,3).

Os estafilococos são bactérias não móveis, que não formam esporos, são geralmente não encapsuladas, possuem uma parede celular composta por peptidoglicano e ácidos teicoicos, produtoras de catalase e não produtoras de oxidase. Estas bactérias são anaeróbias facultativas, crescendo preferencialmente em condições aeróbicas, e apresentam metabolismo respiratório e fermentativo (2,4). A temperatura de crescimento destas bactérias situa-se entre os 18 e os 40 °C, sendo a temperatura ótima de crescimento entre 34 a 37 °C (4), e são capazes de crescer na presença de um teor salino (NaCl) até 10% (2,5).

Os estafilococos são comensais da pele e membranas mucosas de humanos e outros animais (6). De acordo com a sua capacidade de produzir ou não a enzima coagulase, este género pode ser dividido em dois grupos: estafilococos produtores de coagulase (CoPS, do inglês *coagulase-positive staphylococci*) e estafilococos não produtores de coagulase (CoNS, do inglês *coagulase-negative staphylococci*). Dentro do grupo dos CoPS, destaca-se *S. aureus*, a espécie mais relevante a nível clínico em humanos (2,7).

Os CoNS, constituem um grupo heterogéneo de espécies de estafilococos com elevada diversidade genómica (8). Uma destas espécies é *Staphylococcus epidermidis* (6,8). Comparativamente a *S. aureus*, os CoNS possuem um menor arsenal de fatores de virulência, pelo que a suscetibilidade do hospedeiro desempenha um papel fundamental na transição de comensais a agentes oportunistas (8). Anteriormente considerados pouco relevantes a nível clínico, os CoNS têm vindo a ganhar destaque como importantes

agentes patogênicos nas últimas décadas (6), nomeadamente como agentes etiológicos de infecções nosocomiais (2). Esta emergência deve-se a fatores como o uso incorreto de antibióticos, o aumento de procedimentos cirúrgicos que envolvem a inserção de dispositivos médicos e um aumento no número de indivíduos suscetíveis a este tipo de infecção, como doentes imunocomprometidos e recém-nascidos (2,8). O aumento do número de estipes resistentes à meticilina (MRSE, do inglês *methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis*) com suscetibilidade reduzida aos glicopéptidos, e a sua capacidade de formação de biofilmes (8) limitam as opções de tratamento destas infecções, destacando a sua importância.

1.1.1 Características gerais de *S. epidermidis*

As células de *S. epidermidis* têm um diâmetro de 0,8 a 1,0 μm . Esta bactéria forma colônias de 2,5 a 4,0 mm de diâmetro em meio sólido, que são geralmente não pigmentadas, lisas, brilhantes e salientes (4). Contrariamente a algumas bactérias do mesmo género, *S. epidermidis* é capaz de crescer até concentrações salinas de apenas 7,5%, apresentando um crescimento fraco a 10%. As bactérias desta espécie são capazes de reduzir nitratos e produzir urease e são resistentes à lisozima. Apresentam um conteúdo em G+C de 30 a 37 mol% (4).

Esta espécie é considerada um organismo comensal, que se encontra de forma ubíqua na pele e membranas mucosas de humanos e outros animais (9). Distribui-se amplamente por todo o corpo (10), sendo mais prevalente em áreas húmidas, como as axilas, as áreas perineal e inguinal (8), narinas e membranas interdigitais (4). *S. epidermidis* é a espécie de *Staphylococcus* mais frequentemente isolada em humanos (8).

1.1.2 Importância clínica de *S. epidermidis*

Comparativamente a *S. aureus*, *S. epidermidis* apresenta um menor número de determinantes de virulência como toxinas, enzimas e adesinas, pelo que, é um agente patogénico menos virulento (4).

S. epidermidis raramente provoca infeção em tecidos saudáveis (11). A maioria das infeções por esta bactéria está associada a dispositivos médicos e tem origem endógena por contaminação destes aquando da sua implantação (8). *S. epidermidis* é o principal agente de infeções associadas à implantação de dispositivos médicos, como válvulas cardíacas, próteses, cateteres e *shunts* cerebrais (2,8). *S. epidermidis* é responsável por cerca de 40% dos casos de endocardite associada à infeção de válvulas prostéticas (8). A análise de 780 casos de endocardite associada a válvulas prostéticas na Suécia revelou que, a seguir a estreptococos α -hemolíticos, *S. aureus* e enterococos, os CoNS são alguns dos agentes etiológicos mais frequentes, correspondendo a 12% dos casos (12). Numa análise de 14 estudos com mais de 2 400 amostras, os CoNS e *S. aureus* foram os principais responsáveis por infeções associadas a próteses da anca e joelho, tendo ambos estado na origem de 27% das infeções (13). O mesmo se verificou noutro estudo, tendo tanto os CoNS como *S. aureus* sido responsáveis por 19% de um total de 997 infeções associadas a próteses do joelho (14). Num estudo realizado num hospital na Polónia de 2015 a 2017, os CoNS resistentes à meticilina foram o agente mais comum de infeções da corrente sanguínea associadas a cateter venoso central, tendo sido responsáveis por 45% destas infeções (15). Noutro estudo realizado no Japão, *S. epidermidis* foi a principal causa deste tipo de infeção, correspondendo a um total de 12,5% dos isolados (16). Num estudo retrospectivo em que foram analisadas 78 amostras de líquido cefalorraquidiano de infeções associadas a *shunts* cerebrais, os CoNS foram os agentes mais prevalentes, tendo sido detetados em 37% das amostras (17).

S. epidermidis é também um importante agente de bacteriemia e septicemia em recém-nascidos e em doentes imunocomprometidos (18). Numa análise dos casos de septicemia neonatal em diversas áreas geográficas ao longo de diferentes períodos, a percentagem de casos causados por CoNS variou, tendo o valor máximo correspondido a 77,9 % dos casos (19). Um estudo reportou que os CoNS corresponderam a 23,3 % de todos os isolados em 50 casos de bacteriemia em doentes neutropénicos febris (20), sendo o principal agente associado a este tipo de infeção.

As bactérias da espécie *S. epidermidis* podem também originar outros tipos de infeção, como infeções urinárias (8).

Segundo o relatório do *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) sobre a incidência e mortalidade atribuída a infeções hospitalares em unidades de cuidados intensivos na Europa, com dados relativos ao período de 2012 – 2018, os CoNS foram os agentes mais frequentes de infeções da corrente sanguínea adquiridas nos cuidados intensivos (23,8 %), sendo *S. epidermidis* responsável pela maioria destas infeções. Mais concretamente, em Portugal, os CoNS foram responsáveis por 18,5 % dos casos. Os CoNS foram também identificados como agentes etiológicos em 1,8 % e 1,9 % dos casos de pneumonia e infeções do trato urinário adquiridas nos cuidados intensivos, respetivamente, na Europa. Em Portugal, foram responsáveis por 0,5 % dos casos de ambos os tipos de infeção. *S. epidermidis* foi novamente responsável pela maioria destes casos (21).

1.1.3 Terapêutica de infeções causadas por *S. epidermidis*

Grande parte das estirpes nosocomiais de *S. epidermidis* é multirresistente, sendo cerca de 75 a 90% resistente à penicilina (22) e mais de 80% MRSE (8). Infeções por estirpes MSSE (do inglês *methicillin-susceptible Staphylococcus epidermidis*) podem ser tratadas com oxacilina ou nafcilina (23). Na terapêutica de infeções por estirpes MRSE são usados preferencialmente antibióticos da classe dos glicopéptidos, como a vancomicina (22,23) ou a teicoplanina, usada em monoterapia ou em terapia combinada com rifampicina (24). A rifampicina não deve ser usada em monoterapia, devido à propensão para o desenvolvimento de resistência (8,22). Casos de estirpes com resistência ou suscetibilidade reduzida à vancomicina foram também já reportados (8,22). Em alternativa a estes antibióticos, podem ser usados o lipopéptido daptomicina (24), a glicilciclina tigeciclina, as estreptograminas quinupristina/dalfopristina (22,24), as cefalosporinas de quinta geração ceftarolina e ceftobiprole, os lipoglicopéptidos dalbavancina e telavancina, o glicopéptido oritavancina ou as oxazolidinonas tedizolida e linezolida. À exceção do último, as resistências a estes antibióticos são ainda incomuns (22).

A elevada prevalência de estirpes multirresistentes de *S. epidermidis* em ambiente hospitalar, bem como a proteção que lhes é conferida pelo biofilme representam um problema para o tratamento das infeções por elas causadas, muitas vezes com carácter

crônico (8), limitando o número de opções terapêuticas disponíveis (6,9) e requerendo, muitas vezes, a remoção do dispositivo médico e desbridamento do local de infecção (22).

1.2 Resistência aos compostos antimicrobianos

A resistência aos compostos antimicrobianos ocorre de forma natural nas bactérias e estas têm no seu genoma elementos de resistência que têm vindo a evoluir ao longo de milhares de anos (25,26). No entanto, a pressão seletiva exercida pelo uso irracional ou excessivo de antibióticos não só na clínica humana, mas também na indústria animal e na agricultura, promove e acelera a emergência de estirpes resistentes (27,28). Adicionalmente, o uso incorreto de biocidas, como antissépticos e desinfetantes, pode também promover resistência cruzada a alguns antibióticos (29–31).

1.2.1 Compostos antimicrobianos

Os antibióticos são compostos com atividade seletiva, que atuam em alvos específicos e são usados a baixas concentrações (29) no tratamento de infeções bacterianas. A sua ação pode ser bactericida, quando provoca a morte das células bacterianas, ou bacteriostática, quando inibe apenas o seu crescimento (29,32).

Os biocidas são compostos usados na esterilização e desinfecção de superfícies, áreas e líquidos e como antissépticos na eliminação de microrganismos na pele e membranas de animais e humanos (33). Contrariamente aos antibióticos, os biocidas atuam simultaneamente em múltiplos alvos (29,34) e são usados a concentrações elevadas, geralmente múltiplas vezes superiores às suas concentrações mínimas inibitórias (CMIs) (31,35). De modo semelhante aos antibióticos, podem apresentar ação bactericida ou bacteriostática (29,32). No entanto, esta ação varia consoante a concentração a que são usados. Estes compostos apresentam atividade bacteriostática quando usados a concentrações sub-letais ou na sua CMI e atividade bactericida quando usados a concentrações elevadas (34). A sua eficácia depende não apenas da concentração a que são utilizados, mas também de outros fatores, como o tempo de exposição, a presença de matéria orgânica, o pH e a temperatura a que são usados, bem como propriedades intrínsecas dos microrganismos sobre os quais atuam (30).

Os antibióticos exercem a sua ação através de diferentes mecanismos, sendo os principais a inibição da síntese da parede celular, a inibição da síntese proteica e a inibição da síntese de ácidos nucleicos (36).

A inibição da síntese da parede celular ocorre através da interferência no processo de formação do peptidoglicano, o principal componente da parede celular bacteriana, culminando na lise celular. Esta estrutura consiste em cadeias de glicanos que são unidas por pontes interpeptídicas através da ação de enzimas, denominadas proteínas de ligação à penicilina (PBPs, do inglês *penicillin-binding proteins*), com domínios responsáveis pela atividade de transglicosilase e/ou transpeptidase (36,37). Os antibióticos β -lactâmicos são capazes de se ligar ao domínio responsável pela atividade de transpeptidase destas proteínas, impedindo que ocorra o *cross-linking* entre as cadeias de glicanos (38). Os glicopéptidos inibem também a síntese da parede celular, embora atuem sobre um alvo diferente. Estes antibióticos ligam-se aos terminais D-ala-D-ala dos precursores do peptidoglicano, impedindo a sua incorporação na cadeia crescente do peptidoglicano pelas PBPs (38,39).

Existem diversas classes de antibióticos que atuam por inibição da síntese proteica, a qual pode ocorrer ao nível da subunidade 30S ou da subunidade 50S do ribossoma 70S (36). As tetraciclínas e os aminoglicosídeos atuam ao nível da subunidade ribossomal 30S, ligando-se a esta e gerando leituras incorretas do mRNA e impedindo a ligação do tRNA à subunidade ribossomal, respetivamente. Os antibióticos das classes dos macrólidos, lincosamidas, oxazolidinonas e fenicóis exercem a sua ação através da inibição da subunidade 50S (36). Os macrólidos e lincosamidas interferem com a translocação do ribossoma ao longo do mRNA, impedindo o alongamento das cadeias peptídicas e levando à libertação precoce de cadeias peptídicas incompletas. As oxazolidinonas ligam-se à subunidade 50S e inibem a formação do complexo ribossomal 70S, impedindo que a tradução se inicie (36). A inibição da síntese proteica leva a uma interrupção do crescimento bacteriano, pelo que, tipicamente, estes antibióticos exercem uma atividade bacteriostática. Os aminoglicosídeos apresentam atividade bactericida devido à sua capacidade de se ligarem irreversivelmente ao ribossoma (36).

Os antibióticos que inibem a síntese de ácidos nucleicos fazem-no através de dois mecanismos, impedindo a replicação do DNA ou terminando precocemente a sua

transcrição. Estes antibióticos apresentam atividade bactericida, uma vez que a interferência na produção de ácidos nucleicos põe em causa a sobrevivência das bactérias. Os antibióticos das classes das quinolonas e fluoroquinolonas ligam-se às topoisomerasas bacterianas, enzimas responsáveis pelo superenrolamento do DNA aquando da sua replicação, criando um complexo enzima-DNA que impede a movimentação da forquilha de replicação ao longo das cadeias de DNA (40).

Os biocidas podem denominar-se antissépticos, desinfetantes ou conservantes. Os antissépticos são usados para inibir ou eliminar o crescimento de microrganismos em tecidos humanos ou de outros animais. Os desinfetantes são utilizados com o mesmo fim em superfícies inanimadas. Os conservantes são usados com a finalidade de controlar e prevenir a multiplicação de microrganismos em produtos farmacêuticos e alimentares (29). Estes compostos têm ação contra bactérias e também contra outros tipos de microrganismos, como fungos, parasitas e vírus (41).

Os biocidas podem atuar, de forma simultânea, sobre múltiplos alvos, nomeadamente na parede celular, sobre proteínas e sobre ácidos nucleicos (42). De acordo com o seu mecanismo de ação, podem ser classificados como oxidantes, eletrofílicos, compostos líticos ou protonóforos (35).

Os biocidas com ação oxidante incluem peróxidos e compostos libertadores de halogéneos, como iodo e cloro (35). Estes compostos exercem a sua ação através da libertação de radicais livres, que desnaturam proteínas e enzimas bacterianas, culminando na morte da bactéria (29,33). O iodo é capaz de penetrar nas células e oxidar grupos tiol no citoplasma, interferindo com a estrutura e síntese de proteínas e ácidos nucleicos (29,43). O cloro oxida grupos sulfidril de enzimas e aminoácidos (43).

Os biocidas eletrofílicos incluem os aldeídos, isotiazolonas e derivados de metais pesados. Os aldeídos interagem com proteínas, DNA e RNA, formando *cross-links* nas suas estruturas, impedindo que desempenhem as suas funções na célula (33). As isotiazolonas inibem enzimas que contêm grupos tiol, nomeadamente desidrogenases. Consequentemente, ocorre acumulação de radicais livres na célula, que danificam proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, provocando a morte da célula (33). Os iões de prata

e cobre têm afinidade para proteínas da superfície celular, interferindo com a sua estrutura e função. Ambos atuam sobre grupos amina e grupos tiol, sendo os últimos particularmente sensíveis à sua ação (33).

Alguns biocidas, como as biguanidas, os QACs (compostos de amônio quaternário), os fenóis e os álcoois, apresentam um efeito lítico, atuando ao nível da membrana celular e provocando a lise celular. Os QACs atuam como surfactantes catiónicos, que penetram na membrana celular com as suas longas cadeias hidrofóbicas de grupos alquil, destabilizando-a e aumentando a sua permeabilidade, resultando na libertação de enzimas autolíticas (41,44). As biguanidas associam-se a fosfolípidos e proteínas da membrana celular, reduzindo a sua fluidez e capacidade osmorregulatória, levando à extravasão de componentes intracelulares (45). Os fenóis aumentam a permeabilidade da parede celular, originando a libertação de componentes intracelulares. Os álcoois interferem com os componentes lipídicos da membrana celular, levando à perda da sua integridade e função (33).

Por fim, biocidas como os ácidos fracos e os parabenos, são protonóforos, interferindo com a força motriz protónica necessária para o *uptake* de nutrientes, causando uma disrupção nos processos metabólicos (33).

1.2.2 Mecanismos de resistência aos compostos antimicrobianos

Algumas bactérias apresentam características morfológicas que as tornam intrinsecamente resistentes a certas classes de antibióticos. As bactérias de coloração de Gram negativa e micobactérias possuem uma membrana exterior com elevado conteúdo lipídico, que impede a entrada de antibióticos hidrofílicos na célula. Em bactérias de coloração de Gram positiva, tal não acontece, pois possuem uma parede celular permeável à maioria dos antibióticos (46,47). As bactérias apresentam um repertório diverso de mecanismos que lhes conferem resistência a diferentes antibióticos ou classes de antibióticos, que incluem a inativação ou modificação do antibiótico, a modificação do alvo bacteriano e a redução da concentração intracelular do antibiótico (47,48).

A inativação do antibiótico pode ocorrer por degradação enzimática por hidrólise, por exemplo, através da ação de amidases, como as β -lactamases (49). As β -lactamases

hidrolisam o anel β -lactâmico de antibióticos β -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), causando a sua abertura e impedindo que se liguem ao seu alvo, as PBPs (47), continuando a ocorrer a síntese de peptidoglicano. Podem estar codificadas no cromossoma bacteriano ou em plasmídeos (50). Por outro lado, as esterases e epoxidases hidrolisam outros antibióticos, como os macrólidos e a fosfomicina, respetivamente (49,51). Os aminoglicosídeos, as estreptograminas, as fluoroquinolonas, os macrólidos, as lincosamidas e o cloranfenicol podem ser modificados através da adição de grupos químicos por acetiltransferases, fosfotransferases e nucleotidil- ou adenililtransferases (47–49,51). Outro exemplo de modificação do antibiótico consiste na oxidação ou redução do antibiótico por enzimas bacterianas, sendo o exemplo mais estudado a oxidação de tetraciclinas pela enzima Tet(X) (49).

A modificação do alvo bacteriano de diferentes classes de antibióticos tem como efeito uma menor afinidade do antibiótico para o seu alvo alterado, limitando ou inibindo a interação do antibiótico com o alvo. Como exemplo deste mecanismo contam-se mutações nos genes que codificam para a DNA girase (genes *gyrA/B*) ou para a topoisomerase IV (genes *griA/B* ou *parC/E*), alvos das fluoroquinolonas (40). Outro exemplo de modificação do alvo bacteriano é a metilação de um resíduo de adenina no rRNA 23S por metiltransferases, codificadas pelos genes *erm* presentes em plasmídeos ou transposões, impedindo a ligação dos macrólidos ao ribossoma (48). A presença de genes *van* está associada à produção de pentapéptidos precursores do peptidoglicano modificados com afinidade reduzida para a vancomicina (48).

A redução da concentração intracelular do antibiótico pode ocorrer devido a uma permeabilidade reduzida da célula ou ao efluxo do antibiótico para fora da célula. Todas as bactérias possuem bombas de efluxo que fazem a extrusão de antibióticos (52,53). A exposição das bactérias a determinados antibióticos desencadeia a sobreexpressão destas bombas de efluxo, aumentando a extrusão do antibiótico e impedindo que alcance a concentração necessária para exercer a sua ação (54,55). Em bactérias de coloração de Gram negativa, a permeabilidade reduzida pode ocorrer por redução da expressão ou mutação de porinas, canais localizados na membrana exterior responsáveis pela entrada na célula de vários antibióticos com carácter hidrofílico, ou por alteração dos lipopolissacáridos. Em bactérias de coloração de Gram positiva, a resistência aos antibióticos mediada por permeabilidade reduzida é rara, sendo exemplo o fenótipo de

resistência intermédia à vancomicina em *S. aureus*, onde ocorre um espessamento da parede celular, o qual limita a interação da vancomicina com o seu alvo celular (46).

Outro mecanismo de resistência importante em estafilococos e responsável pelo fenótipo de resistência à meticilina é a produção de uma PBP alternativa, a PBP2a, codificada pelo gene *mecA*, localizado no elemento genético móvel *SCCmec* (50), para a qual os antibióticos β -lactâmicos têm menor afinidade (48).

Contrariamente ao que se verifica para os antibióticos, a resistência a biocidas mediada por mecanismos com alvos específicos é rara, devido ao facto de estes atuarem sobre diversos alvos. A exceção é o caso do biocida triclosan, que tem como alvo específico a enzima enoil redutase, codificada pelo gene *fabI* (56).

As bactérias podem tornar-se menos suscetíveis à ação de biocidas através da sobreexpressão de bombas de efluxo (57,58). Diversos genes que codificam para bombas de efluxo, nomeadamente as bombas de efluxo Smr, QacG, QacH, QacJ, QacA/B e NorA estão presentes em estafilococos e são responsáveis pela extrusão de biocidas, como os QACs (55). Além do transporte de QACs, estas bombas de efluxo são também responsáveis pelo transporte de alguns antibióticos, pelo que, a sua sobreexpressão pode conferir resistência cruzada a esses antibióticos (55).

Os biofilmes são estruturas multicelulares que conferem às células que os constituem proteção contra a ação de agentes antimicrobianos, incluindo antibióticos e biocidas, que são incapazes de penetrar nesta estrutura e de se ligarem ao seu alvo bacteriano (6). O papel dos sistemas de efluxo e dos biofilmes na resistência a compostos antimicrobianos é abordado mais detalhadamente nas secções seguintes.

1.2.3 Sistemas de efluxo

As bombas de efluxo são proteínas de transporte membranas presentes em todas as espécies bacterianas e desempenham vários papéis fisiológicos, nomeadamente na extrusão de metabolitos nocivos para as células, na secreção de fatores de virulência, na resposta das células ao stress e na comunicação intercelular (53,57,59). Os genes que codificam para estas bombas de efluxo podem estar presentes no cromossoma bacteriano ou em elementos genéticos móveis, como plasmídeos (58).

As bombas de efluxo estão também envolvidas no transporte de uma variedade de antibióticos e outros compostos antimicrobianos, como biocidas e corantes (48,55). A sua ação pode ser específica sobre um antibiótico ou uma classe de antibióticos ou podem realizar o transporte de antibióticos pertencentes a múltiplas classes (55), estando, muitas vezes, associadas a fenótipos de multirresistência (MDR, do inglês *multidrug resistance*), razão pela qual estes sistemas são designados por bombas de efluxo MDR. Esta variedade de substratos deve-se, em parte, à multiplicidade de possíveis locais de ligação ao substrato nestas proteínas (60).

A extrusão de compostos antimicrobianos pelas bombas de efluxo permite às bactérias resistir à sua ação, ao impedir que seja atingida a concentração necessária no interior da célula para que tenha o efeito desejado sobre o seu alvo. Os sistemas de efluxo constituem geralmente uma resposta inicial à presença dos compostos antimicrobianos, que permite às bactérias sobreviver durante o tempo necessário à aquisição de novos mecanismos de resistência mais estáveis e robustos (55,61).

Atualmente, estão descritas seis famílias de sistemas de efluxo MDR, nomeadamente a família ABC (do inglês *ATP-binding cassette*), a superfamília MFS (do inglês *major facilitator superfamily*), a família MATE (do inglês *multidrug and toxic-compound extrusion*), a família SMR (do inglês *small multidrug resistance*), a superfamília RND (do inglês *resistance-nodulation-cell division*) e a família PACE (do inglês *proteobacterial antimicrobial compound efflux*). A primeira família é constituída por transportadores ativos primários, que utilizam diretamente o ATP como fonte de energia para o transporte de compostos. As restantes cinco famílias englobam transportadores ativos secundários, que utilizam a força motriz protónica como fonte de energia para o transporte (53). Uma exceção são as bombas de efluxo da família MATE, que são também capazes de obter energia através do gradiente de sódio da membrana (55).

Embora não exclusivamente, os sistemas de efluxo RND são encontrados principalmente em bactérias de coloração de Gram negativa (58,59). Contrariamente aos sistemas de efluxo das restantes famílias, que geralmente funcionam como sistemas de um único componente que fazem o transporte de substratos através da membrana citoplasmática, as bombas de efluxo RND funcionam geralmente como um sistema tripartido que se estende ao longo de toda a parede das bactérias de coloração de Gram

negativa, ocorrendo o transporte de substratos através da membrana citoplasmática para o espaço periplásmico e, de seguida, para o exterior da célula através da membrana externa (53).

Em *S. aureus*, são conhecidos numerosos sistemas de efluxo MDR. A maioria destes sistemas pertence à família MFS, nomeadamente as bombas de efluxo NorA, NorB, MdeA, NorC, SdrM, LmrS, QacA e QacB (55). Estas bombas fazem o efluxo de antibióticos como as fluoroquinolonas, tetraciclina, ácido fusídico, fenicóis e oxazolidinonas, de biocidas e de corantes. Várias bombas de efluxo codificadas em plasmídeos pertencentes à família SMR (QacG, QacH, QacJ e Smr) são também encontradas nesta espécie, todas elas responsáveis apenas pelo transporte de biocidas, como QACs (55). Estão também presentes em *S. aureus* a bomba de efluxo MepA, pertencente à família MATE, responsável pelo efluxo de fluoroquinolonas, glicilciclinas, QACs e corantes (55), bem como a bomba de efluxo MsrA, pertencente à família ABC e responsável pelo transporte de macrólidos e estreptograminas (53).

Na espécie *S. epidermidis*, ainda pouco se conhece sobre os mecanismos de efluxo responsáveis pela resistência a compostos antimicrobianos. No entanto, Juárez-Verdayes *et al.* demonstraram que esta espécie expressa constitutivamente genes da família *nor* (62) e num estudo de Costa *et al.* foram identificados homólogos de NorA/B/C e de outros transportadores ativos secundários putativos em vários genomas de *S. epidermidis* (54). Este estudo demonstrou também que a sobreexpressão do gene *norA* na estirpe *S. epidermidis* ATCC 12228 adaptada ao brometo de etídio (EtBr), um substrato da bomba de efluxo NorA, é responsável por um fenótipo de resistência a fluoroquinolonas e suscetibilidade reduzida a biocidas como QACs e biguanidas (54).

Os sistemas de regulação destes transportadores são, por vezes, complexos (53,60). A expressão destas bombas de efluxo encontra-se sob controlo de genes reguladores locais (como QacR, que regula QacA/B) ou globais, como MgrA (60). Este último regula não só as bombas de efluxo MDR de *S. aureus* NorA, NorB e NorC, mas também algumas bombas de efluxo não-MDR, como Tet(38), genes associados à autólise, genes de virulência e outros genes envolvidos no metabolismo de *S. aureus* (55).

1.2.4 Biofilmes

Os biofilmes são estruturas tridimensionais, que consistem em comunidades de células bacterianas embebidas numa matriz extracelular por elas produzida, constituída por água, proteínas, polissacarídeos e DNA extracelular (eDNA) (6,63), aderentes a uma superfície biótica ou abiótica (64). A sua formação ocorre em resposta a estímulos nutricionais e metabólicos, mas também à presença de concentrações subinibitórias de agentes antimicrobianos (65). O processo de formação de biofilmes divide-se em quatro fases principais (66) (Figura 1): 1) adesão a uma superfície biótica ou abiótica, através de diversos mecanismos e fatores, como proteínas de adesão, ácidos teicoicos da parede celular, alteração da hidrofobicidade da superfície celular e produção de eDNA; 2) proliferação celular, ocorrendo formação de aglomerados de bactérias designados por microcolónias; 3) maturação do biofilme, na qual se origina a estrutura tridimensional do biofilme, com canais que permitem o acesso de nutrientes a todas as células; e 4) dispersão das células do biofilme, contribuindo para a disseminação da infeção para outros locais do corpo (6,67).

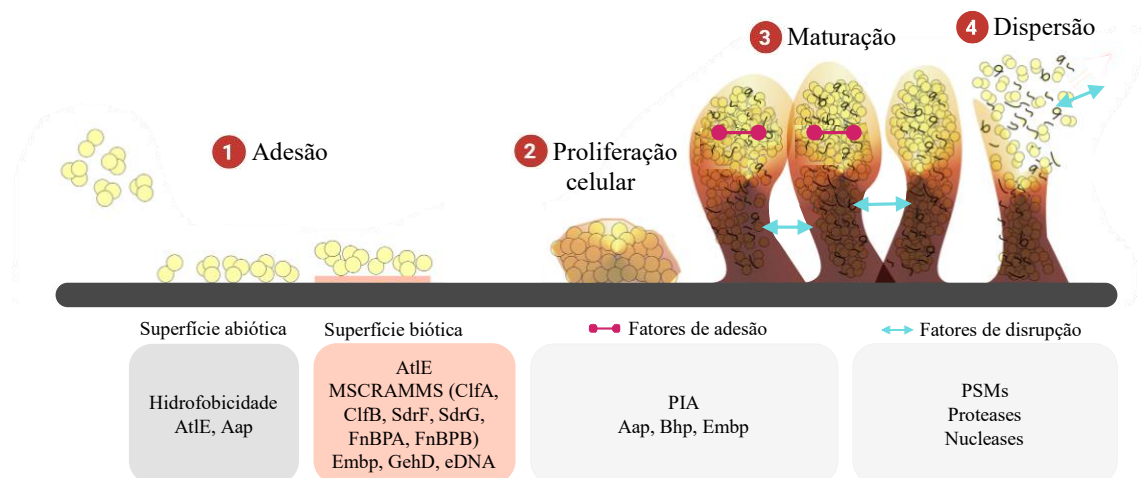


Figura 1. Fases de formação do biofilme em estafilococos e fatores envolvidos em cada fase. AtlE: autolisina; Aap: proteína associada à acumulação; MSCRAMMS: componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas de adesão da matriz; ClfA: fator de coagulação A; ClfB: fator de coagulação B; SdrF: proteína F da família Sdr; SdrG: proteína G da família Sdr; FnBPA: proteína de ligação à fibronectina A; FnBPB: proteína de ligação à fibronectina B; Embp: proteína de ligação à matriz extracelular; GehD: lipase de triacilglicerol; eDNA: ácido desoxirribonucleico extracelular; PIA: polissacarídeo de adesão intercelular; Bhp: proteína homóloga do biofilme; PSMs: modulinas solúveis em fenol. Adaptada de (63).

1) Adesão a superfícies

A adesão das células bacterianas pode ocorrer a uma superfície biótica, como o tecido humano, ou a uma superfície abiótica, como a de um cateter ou de uma prótese. Vários fatores estão envolvidos na adesão das bactérias aos diferentes tipos de superfícies. A adesão a superfícies abióticas depende maioritariamente da hidrofobicidade destas (6,68). A autolisina AtlE, uma hidrolase do peptidoglicano, e a proteína Aap, proteína associada à acumulação, estão envolvidas na adesão a superfícies abióticas, como o polistireno (6,68,69). É ainda importante referir que a autolisina AtlE é também capaz de aderir a superfícies abióticas através da ligação a fatores do hospedeiro, como a vitronectina, o fibrinogénio, a fibronectina e o colagénio, que, *in vivo*, cobrem as superfícies de próteses e outros dispositivos médicos (63,68,70,71). A ligação a fatores do hospedeiro envolve ainda outras proteínas, nomeadamente os MSCRAMMS (do inglês *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) (63). Em *S. epidermidis*, estão presentes cerca de 12 proteínas deste tipo (63), entre elas os fatores de coagulação ClfA e ClfB (63,68); as proteínas da família Sdr (do inglês *serine-aspartate repeat proteins*), nomeadamente SdrF, que se liga ao colagénio do tipo I, e SdrG, que faz a ligação ao fibrinogénio (6,68,70), e FnBPA e FnBPB, proteínas de ligação à fibronectina (63). Além destas, outras proteínas, como Embp (63) e GehD (70), interagem também com componentes da matriz do hospedeiro. A autolisina AtlE é ainda capaz de promover indiretamente a adesão das células do biofilme através da libertação de eDNA aquando da lise celular, o qual funciona como uma adesina intercelular e tem um papel importante na proliferação do biofilme (68,70).

2) Proliferação celular

Após a adesão das células do biofilme a uma superfície, estas começam a proliferar e a produzir a matriz extracelular (68). Nesta fase, são expressas adesinas celulares, responsáveis pela agregação celular e formação de uma estrutura multicelular (70). Entre elas, destaca-se o polissacarídeo de adesão intercelular (PIA, do inglês *polysaccharide intercellular adhesin*), codificado pelos genes do operão *ica* (70). Este operão é constituído pelos genes *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*, que codificam para as proteínas IcaA, IcaB, IcaC e IcaD, respetivamente (63,72). As proteínas IcaA e IcaD constituem uma N-

acetil glucosamina (GlcNAc) transferase que adiciona unidades GlcNAc à cadeia de PIA, que, por sua vez, é exportada da célula pela proteína de membrana IcaC. Uma vez na superfície da célula, a enzima IcaB conduz à desacetilação das unidades GlcNAc, conferindo à molécula carga positiva (63). As moléculas de PIA carregadas positivamente atraem ácidos teicoicos da parede celular e eDNA com carga negativa, promovendo a agregação celular (6). O operão *ica* é regulado pelo repressor IcaR, codificado pelo gene *icaR*, transcrito na direção oposta aos genes *icaADBC* (63). A expressão de todos os genes *ica* é necessária à produção de PIA funcional (70).

Em *S. epidermidis*, a formação de biofilme através da produção de PIA é a mais frequente (63,72). No entanto, também pode ocorrer de uma forma independente de PIA, uma vez que se verifica formação de biofilme em estirpes que não possuem o operão *ica* (63,68). Nestas estirpes, este processo está dependente de diversas proteínas (72), entre as quais se destaca Aap, presente em cerca de 90% dos isolados de *S. epidermidis* (73). Esta proteína apresenta dois domínios principais com diferentes funções, o domínio A, associado à adesão inicial a superfícies abióticas, e o domínio B, que promove a adesão intercelular (74). Para funcionar como adesina intercelular, a proteína Aap tem de sofrer clivagem pela protease SepA (63) ou por proteases do hospedeiro, como a tripsina, a elastase ou a catepsina G (75), originando uma proteína Aap madura, que não possui o domínio A (74) e que forma fibrilhas entre as células bacterianas (63,68,72,73). Outras proteínas frequentemente associadas à formação deste tipo de biofilme e que desempenham um papel importante na adesão intercelular são a proteína Bhp (76,77) e Embp (6,8,73), estando presentes em cerca de 4 a 46% e 79 a 94% dos isolados clínicos de *S. epidermidis* (78–81), respetivamente.

Os biofilmes formados de forma dependente ou independente de PIA diferem quanto à sua estrutura e à sua estabilidade (70,72,82), tendendo os primeiros a ter uma estrutura mais robusta e estável (83). Além disso, a sua composição é influenciada por outros fatores como a exposição a stress mecânico e exposição a diferentes substratos e fatores do hospedeiro (68,70).

3) Maturação

Na fase de maturação ocorre a formação de uma estrutura tridimensional da matriz extracelular com formação de múltiplas camadas celulares e canais, preenchidos de fluido, que facilitam o acesso de nutrientes a células localizadas nas camadas mais profundas do biofilme (63,68). Esta estrutura resulta da ação combinada de fatores de adesão acima mencionados, assim como de fatores de disrupção, nomeadamente enzimas e PSMs (do inglês *phenol-soluble modulins*), que degradam os principais componentes da matriz do biofilme, nomeadamente PIA, proteínas e eDNA (68,84).

As PSMs são moléculas com propriedades surfactantes capazes de quebrar interações não covalentes entre células (63,68), contribuindo para a formação de canais na estrutura do biofilme. Estas moléculas são capazes de atuar tanto em biofilmes formados de modo dependente de PIA como em biofilmes formados de modo independente de PIA (85).

As proteases são capazes de degradar a matriz em biofilmes formados de forma independente de PIA. Em *S. epidermidis*, estão descritas três proteases principais, nomeadamente SepA, Esp (63) e EcpA (68,86). As nucleases são responsáveis pela degradação do eDNA. Em *S. aureus*, estão descritas duas nucleases, codificadas pelos genes *nuc1* e *nuc2*, nenhuma delas presente em *S. epidermidis* (87). Em *Staphylococcus* não está descrita a produção de enzimas capazes de degradar PIA. Atualmente, apenas uma enzima capaz de degradar PIA é conhecida, a dispersina B sintetizada por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (82,85,88).

4) Dispersão

A importância da dispersão das células do biofilme reside no papel destas células na disseminação e estabelecimento da infeção noutras locais do hospedeiro. Esta dispersão pode ocorrer de forma passiva ou através da expressão de fatores disruptivos, como os mencionados anteriormente. Além do seu papel na maturação do biofilme, estes fatores facilitam também a dispersão das células do biofilme. Alguns estudos indicam que o eDNA possa também desempenhar um papel neste processo. Por exemplo, Berne *et al.* verificaram que o eDNA é capaz de estimular a dispersão de células do biofilme de

Caulobacter crescentus (89). No entanto, evidências *in vivo* parecem contradizer esta hipótese (85).

A formação de biofilmes é um importante fator de virulência, muitas vezes responsável pela cronicidade das infecções. Estas estruturas conferem às células proteção contra a ação de agentes antimicrobianos, não só por constituírem uma barreira à sua penetração nas células, mas também devido a alterações no próprio metabolismo das células em biofilme (6), representando um obstáculo ao tratamento destas infecções (90).

Foi demonstrado que os biofilmes apresentam subpopulações de células em diferentes estados metabólicos, nomeadamente células com crescimento aeróbio, células com crescimento fermentativo, células dormentes e células mortas (68,91). A escassez de oxigénio em camadas mais profundas do biofilme gera um ambiente anaeróbio que promove a acumulação de produtos ácidos, que inibem a ação de certos antibióticos. Adicionalmente, a acumulação de metabolitos e a depleção de substratos pode induzir algumas bactérias a entrar numa fase de dormência, impedindo a ação de antibióticos que têm como alvo células em crescimento. Além disso, as células que constituem o biofilme apresentam um fenótipo distinto das células planctónicas, apresentando uma expressão génica diferencial, como diminuição na expressão de genes envolvidos em processos biológicos básicos, como a tradução e a transcrição, e no metabolismo, por exemplo, na produção anaeróbia de energia, e um aumento na expressão de outros genes que codificam para fatores envolvidos na resistência e em mecanismos de defesa contra o hospedeiro (92). Todas estas características permitem às células em biofilme sobreviver à ação de antibióticos e outros agentes antimicrobianos que têm como alvo processos envolvidos no crescimento celular.

Também o microambiente que se gera dentro do biofilme pode contribuir para a resistência a compostos antimicrobianos destas células. Estima-se que as células presentes no biofilme possam ter níveis de resistência a antibióticos e biocidas muito superiores aos de células planctónicas (92,93). A elevada proximidade das células no biofilme facilita também a transferência de genes de resistência (68,94).

Outro fator que parece estar envolvido na resistência aos antibióticos nos biofilmes é a expressão de bombas de efluxo (30,95), um fator que será discutido na secção seguinte.

1.2.5 Relação entre efluxo e biofilmes

Ao longo dos últimos anos, o papel que as bombas de efluxo desempenham na formação dos biofilmes tem sido o foco de inúmeros estudos, que descrevem uma expressão aumentada de genes que codificam para bombas de efluxo e outros transportadores membranares nas bactérias presentes no biofilme (96). Num estudo de Yao *et al.*, observou-se a sobreexpressão de dois genes, SE0225 e SE1243, que codificam para transportadores ABC, em biofilmes de *S. epidermidis* (92). Em *S. aureus*, ocorreu sobreexpressão de diversos genes que codificam para transportadores membranares após 6 e 8 h de crescimento em biofilme (97). Em *E. coli*, Hancock *et al.* demonstraram que 128 genes que codificam para bombas de efluxo e transportadores membranares se encontravam sobreexpressos em células em biofilme e que três inibidores de efluxo (IEs) foram capazes de reduzir significativamente a formação de biofilme (98). No entanto, outros estudos indicam que não existe uma relação entre a sobreexpressão de bombas de efluxo e a formação do biofilme (52). Türkel *et al.* demonstraram que a sobreexpressão de bombas de efluxo promove uma redução na formação de biofilme em *Klebsiella pneumoniae* (99). Um estudo de Kievit *et al.* revelou que não há um aumento na expressão de quatro bombas de efluxo descritas em *P. aeruginosa* nas células em biofilme (100). Num estudo de Baugh *et al.*, 10 mutantes da estirpe *Salmonella enterica* serovar Typhimurium L828, cada um sem uma das bombas de efluxo MDR presentes nesta estirpe, foram incapazes de produzir biofilmes competentes, tendo-se observado uma diferença significativa na sua capacidade de formar matriz extracelular relativamente à estirpe parental (101).

Foi já estudada a ação de vários IEs sobre células planctónicas, mas existem poucos dados relativamente ao efeito destes IEs em bactérias no biofilme (102). Tang *et al.* demonstraram que o IE CCCP (carbonilcianeto 3-clorofenil-hidrazona) é capaz de inibir a formação de biofilme em *K. pneumoniae* de forma dependente da concentração (102). Noutro estudo em *Pseudomonas fluorescens*, quatro IEs foram capazes de aumentar a suscetibilidade de células em biofilme, que sobreexpressavam dois sistemas de efluxo, à

ação do glutaraldeído (103). Dawan *et al.* demonstraram que, quando expostas a diferentes antibióticos na presença de PA β N (fenilalanina-arginina β naftilamida), um IE, estirpes de *S. enterica* ser. Typhimurium são incapazes de formar biofilme (104). Num estudo mencionado anteriormente, foi demonstrado que, na presença deste mesmo IE e de dois outros (CCCP e clorpromazina (CPZ)), a estirpe L8S8 de *S. enterica* ser. Typhimurium é também incapaz de produzir biofilme (101). Observou-se noutro estudo que, na presença dos IEs tioridazina (TZ), PA β N e 1(1-naftilmetil)-piperazina (NMP), a capacidade de produção de biofilme reduziu significativamente em estirpes de *S. aureus* e *Pseudomonas putida* (96).

Estudos sobre o papel das bombas de efluxo em biofilmes sugerem que estas proteínas podem desempenhar variadas funções em diferentes espécies bacterianas, nomeadamente na extrusão de moléculas necessárias para a formação da matriz do biofilme, como substâncias poliméricas da matriz extracelular, e envolvidas na regulação do biofilme, como moléculas associadas aos *quorum sensing*; no efluxo de metabolitos e moléculas tóxicas, como compostos antimicrobianos; na prevenção ou promoção da adesão intercelular e adesão a superfícies; e na regulação indireta de fatores de transcrição envolvidos na formação do biofilme (52,105).

1.3 Descoberta e desenvolvimento de compostos antimicrobianos

Segundo o relatório epidemiológico anual para 2020 do ECDC sobre a resistência aos compostos antimicrobianos na EU/EEA, esta é considerada uma das maiores ameaças à saúde pública a nível global e, a cada ano, ocorrem cerca de 670 000 infeções por bactérias resistentes a antibióticos, que resultam diretamente na morte de cerca de 33 000 pessoas (106). Estas infeções têm também impacto ao nível económico, estando associadas a internamentos e tratamentos mais prolongados, com maiores custos associados (107). De facto, o mesmo relatório do ECDC estima um custo associado a estas infeções de 1,1 mil milhões de euros anuais na EU/EEA (108).

A resistência aos compostos antimicrobianos deriva, sobretudo, do uso incorreto destes compostos, que inclui o uso empírico de antibióticos de largo espectro (26), a prescrição incorreta de antibióticos devido a um diagnóstico tardio ou incorreto, a falha

na adesão à terapêutica por parte de doentes, a utilização de antibióticos sem prescrição (109), bem como o uso de antibióticos como profiláticos ou promotores de crescimento e de biocidas como desinfetantes na indústria animal. Todos estes fatores promovem a transmissão de bactérias multirresistentes entre humanos, animais e o ambiente (109–111).

A emergência da resistência aos compostos antimicrobianos a quase todas as classes de antibióticos e a dispersão de estirpes multirresistentes limitam seriamente o número de opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de infeções causadas por essas bactérias (112). Por outro lado, ao longo das últimas décadas, tem vindo a observar-se um declínio e um desinteresse na descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos pelas grandes empresas farmacêuticas multinacionais, com apenas um número reduzido ainda a investir no desenvolvimento deste tipo de fármacos (26,108,113).

Para além dos fatores acima referidos responsáveis pela resistência aos compostos antimicrobianos, outro problema consiste na falta de diversidade de alvos dos antibióticos e no facto de grande parte dos antibióticos desenvolvidos pertencer a classes já existentes e, conseqüentemente, estar sujeita a algumas das mesmas resistências existentes para membros da mesma classe (26,113).

Todos estes fatores, juntamente com a falta de investimento na descoberta e desenvolvimento de fármacos pelas grandes empresas farmacêuticas, tornam necessária a utilização de diferentes estratégias para identificar novos compostos já existentes ou desenvolver novos antibióticos de modo a solucionar a problemática da falta de opções terapêuticas para infeções causadas por bactérias multirresistentes.

1.3.1 Reposicionamento de fármacos

Comparativamente aos métodos tradicionais de descoberta e desenvolvimento de fármacos, o reposicionamento de fármacos permite reduzir o tempo implicado neste processo, requer um menor investimento financeiro e está associado a uma maior taxa de sucesso, uma vez que os fármacos identificados foram previamente submetidos a ensaios pré-clínicos e a sua segurança e toxicidade foi já testada (114–116). No entanto, algo a ter em conta no reposicionamento de fármacos é o facto de a dose de um fármaco

requerida para se obter um efeito terapêutico contra determinada doença poder ser diferente daquela determinada para a sua indicação original (117).

A quimiogenômica surgiu da fusão de duas áreas da ciência, a química e a genômica (118), e é definida como o *screening* de um universo de compostos químicos contra um universo de alvos de fármacos com os quais interagem, assentando num princípio de homologia, em que duas proteínas homólogas deverão ser alvo do mesmo fármaco (119). Esta nova área tem como principal objetivo o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (118), permitindo expeditar este processo (120), reduzindo o período de desenvolvimento pré-clínico e o número de fármacos identificados sem êxito (118).

Atualmente, vários estudos descrevem o uso de estratégias de reposicionamento de fármacos em diversas aplicações terapêuticas, como o tratamento de diversos cânceros e outras doenças, disfunção erétil, queda de cabelo (115,121), bem como para o tratamento de doenças infecciosas. Num estudo de Neves *et al.*, foram identificados 115 fármacos com potencial ação contra *Schistosoma mansoni*, usando uma abordagem de quimiogenômica para o reposicionamento de fármacos *in silico* (114). Rodrigues *et al.* demonstraram que os IEs TZ, CPZ, verapamil (VER) e CCCP foram capazes de aumentar significativamente a suscetibilidade de *Mycobacterium avium* ATCC 25291 à eritromicina (122). Ferreira *et al.* demonstraram o potencial da antraciclina epirrubicina como agente antimalárico recorrendo também a este tipo de estratégia (123). Noutro estudo, de Oliveira *et al.* identificaram dois fármacos anticancerígenos com ação antifúngica significativa potencialmente eficazes no tratamento de paracoccidiodomicose (124).

1.3.1.1 Exemplos de fármacos propostos para reposicionamento em estafilococos

Alguns fármacos potencialmente eficazes contra estafilococos foram também já identificados através de reposicionamento. Miró-Canturri *et al.* demonstraram que três metabolitos de um agente anticancerígeno, tamoxifen, apresentaram atividade antibacteriana contra isolados MRSE num modelo animal (125). Oliveira *et al.* demonstraram que o ibuprofeno, um fármaco anti-inflamatório não esteroide, poderá ser

reposicionado como agente antimicrobiano contra *S. aureus*, tendo demonstrado ser eficaz contra células de algumas estirpes em biofilme (126).

Os IEs são compostos não antibióticos capazes de inibir bombas de efluxo. Estes, quando usados em conjunto com compostos antimicrobianos para os quais existe resistência mediada por efluxo, permitem restaurar a sua atividade antimicrobiana ao promover o aumento da sua concentração intracelular. Deste modo, são compostos de interesse como possíveis adjuvantes com potencial para mitigar a falta de opções terapêuticas para o tratamento de infeções por bactérias multirresistentes (61,105). Para além do mais, um número crescente de estudos tem também apontado o potencial destes compostos como agentes antibiofilme.

Os IEs podem interferir com a ação das bombas de efluxo de forma direta por ligação à bomba e consequente inibição da sua atividade. Podem também atuar de forma indireta, por modelação da expressão dos genes que as codificam ou interferência com a sua fonte de energia (127). No entanto, o uso e desenvolvimento destes IEs deve ter em conta que, numa bactéria, podem estar presentes variadas bombas de efluxo com sobreposição do seu perfil de substratos ou a existência de outros mecanismos de resistência que, não o efluxo, a um dado agente (58). Outro fator a ter em conta, responsável pelo uso limitado de IEs na prática clínica, é o facto de muitos dos compostos testados apresentarem elevada toxicidade em células humanas (127).

Em *S. aureus*, foi já estudado o efeito de numerosos fármacos para reposicionamento como IEs da bomba de efluxo NorA, como a reserpina (RES) (128) a TZ, a CPZ (66,129), o VER (130), o elacridar (131) e o celecoxib (132). Num estudo por Zimmermann *et al.* foi demonstrado que o inibidor da tirosina cinase, nilotinib, identificado através do *screening* de uma biblioteca de 1200 fármacos, tem potencial para ser usado como IE e, em conjunto com a ciprofloxacina, como agente antibiofilme em *S. aureus* (133). Mahey *et al.* identificaram seis fármacos, raloxifene, pirvínio, nefazodona, ezetimibe, clorprotixeno e propafenona como inibidores da bomba de efluxo NorA e potenciais adjuvantes terapêuticos capazes de restaurar a ação de fluoroquinolonas em *S. aureus* (134).

1.4 Objetivos

S. epidermidis é um comensal da pele de humanos e outros animais e um importante agente oportunista causador de infecções nosocomiais associadas, principalmente, à implantação de dispositivos médicos. O aumento do número de indivíduos suscetíveis a estas infecções e a emergência de estirpes resistentes a múltiplas classes de antibióticos dificultam o tratamento de infecções causadas por esta bactéria.

O objetivo desta Dissertação foi aplicar uma estratégia *in silico* de quimiogenómica, com vista ao reposicionamento de fármacos, identificando novos compostos que tenham como alvo transportadores de membrana e/ou a formação de biofilmes em *S. epidermidis*.

Para tal, pretendeu-se: (i) criar uma biblioteca de potenciais alvos terapêuticos, em particular transportadores de membrana e fatores envolvidos na formação de biofilmes. A partir desta, (ii) através de genómica comparativa, criar uma biblioteca de fármacos candidatos já aprovados para uso clínico, recorrendo à base de dados DrugBank para identificar proteínas homólogas aos alvos terapêuticos previamente identificados em *S. epidermidis*. Por fim, (iii) testar um fluxograma experimental para determinar *in vitro* a atividade destes fármacos candidatos contra o efluxo, avaliando o seu efeito na redução da CMI de compostos antimicrobianos efluxáveis; o seu efeito sinérgico com compostos antimicrobianos por *checkerboard assays*; e a sua atividade antibiofilme através de ensaios de adesão em microplaca com coloração por violeta de cristal.

Para a experimentação *in vitro* foi usado um painel de estirpes de referência que diferem quanto à capacidade de produzir biofilme, nomeadamente *S. epidermidis* ATCC 12228 (*ica*⁻) e *S. epidermidis* ATCC 35984 (*ica*⁺). Foram também usadas suas derivadas adaptadas ao brometo de etídio; *S. epidermidis* ATCC 12228_EtBr e *S. epidermidis* ATCC 35984_EtBr, com atividade de efluxo aumentada, devido à sobreexpressão do gene que codifica para a bomba de efluxo NorA.

Assim, este trabalho espera contribuir para a identificação de fármacos para reposicionamento como IEs e/ou agentes antibiofilme em *S. epidermidis*, que poderão, no futuro ser utilizados na prática clínica no tratamento de infecções causadas por esta bactéria ou servir de base para o desenvolvimento de novas moléculas com capacidade de inibição do efluxo e ação antibiofilme melhoradas.

2 Material e Métodos

2.1 Material

2.1.1 Estirpes bacterianas

Neste trabalho, foram estudados dois pares de estirpes isogênicas, nomeadamente *S. epidermidis* ATCC®12228™ e *S. epidermidis* ATCC 12228_EtBr (54), e *S. epidermidis* ATCC® 35984™ (também denominada RP62A) e *S. epidermidis* ATCC 35984_EtBr (135) (Tabela 1). A estirpe ATCC 12228 tem sido classificada como não formadora de biofilmes (136), uma vez que não apresenta o operão *ica* (77,136). No entanto, dados obtidos no laboratório indicam que tem a capacidade de formação de biofilme, embora mais reduzida e variável do que ATCC 35984 (137,138). Esta estirpe possui o gene *tet(K)* (136), que codifica para a bomba de efluxo Tet(K) associada à resistência a tetraciclinas. A estirpe ATCC 35984 é formadora de biofilmes, possuindo o operão *ica* (77). Esta é uma estirpe MRSE que apresenta um perfil MDR, sendo resistente, para além dos antibióticos β-lactâmicos, à eritromicina, clindamicina (139), aminoglicosídeos e ao trimetoprim-sulfametoxazol (135).

As estirpes *S. epidermidis* ATCC 12228_EtBr e ATCC 35984_EtBr resultam de um processo de adaptação das estirpes parentais ao EtBr (54), apresentando sobreexpressão do gene *norA*, que codifica para a bomba de efluxo NorA, associada à resistência a fluoroquinolonas e suscetibilidade reduzida a vários biocidas e corantes, como o EtBr.

Tabela 1. Características genotípicas e fenotípicas de interesse das estirpes em estudo.

Estirpe	Características fenotípicas e genotípicas
ATCC 12228	Não formadora de biofilmes (<i>ica</i> ⁻) Resistência a tetraciclinas (<i>tet(K)</i> ⁺) Resistência à penicilina (<i>blaZ</i> ⁺)
ATCC 35984	Formadora de biofilmes (<i>ica</i> ⁺) Resistência a β-lactâmicos (<i>mecA</i> ⁺ , <i>blaZ</i> ⁺) Resistência a aminoglicosídeos (<i>aph(3')</i> -IIIa ⁺ , <i>ant(6)</i> -Ia ⁺ , <i>aacA</i> ⁺) Resistência à eritromicina e/ou clindamicina (<i>msrA</i> ⁺ , <i>ermA</i> ⁺) Resistência à estreptotricina (<i>sat4</i> ⁺)
ATCC 12228_EtBr ¹ ATCC 35984_EtBr ¹	Resistência a fluoroquinolonas e suscetibilidade reduzida ao EtBr e biocidas (<i>norA</i> ↑↑ sobreexpresso)

(¹): Características idênticas às estirpes parentais, diferindo apenas na sobreexpressão do gene *norA*.

2.1.2 Meios de cultura e soluções

Todos os meios de cultura utilizados (Tabela 2) foram preparados com água desmineralizada e autoclavados a 121 °C durante 15 minutos.

Tabela 2. Composição dos meios de cultura utilizados ao longo do trabalho.

Meio de cultura	Composição (por litro)
Mueller-Hinton líquido (MHB) ¹	300 g infusão de carne desidratada; 17,5 g caseína hidrolisada; 1,5 g amido; 4 106 mg Ca ²⁺ ; 4 379 mg Mg ²⁺ ; pH 7,3 ± 0,1 a 25 °C
Mueller-Hinton líquido ajustado a catiões (CA-MHB)	Meio MHB; cálcio a 0,02 mg/L; magnésio a 0,008 mg/L
Tryptona de soja líquido (TSB) ¹	17 g peptona de caseína; 3,0 g peptona de soja; 5,0 g cloreto de sódio; 2,5 g fosfato dipotássico; 2,5 g glucose; pH 7,3 ± 0,2 a 25 °C
Tryptona de soja sólido (TSA) ^{1,2}	15 g peptona de caseína; 5,0 g peptona de soja; 5,0 g cloreto de sódio; 15 g agar; pH 7,3 ± 0,2 a 25 °C

(¹): Oxoid Ltda, Hants, Reino Unido; (²): VWR Chemicals BDH, Leuven, Bélgica – meio usado apenas para determinação de UFC/mL.

A composição das soluções utilizadas ao longo deste trabalho são apresentadas na Tabela 3. Todas as soluções foram preparadas em água desmineralizada.

Tabela 3. Composição das soluções utilizadas.

Solução	Composição
Solução de cálcio (Ca ²⁺) a 10 mg/mL	Cloreto de cálcio dihidratado ² Esterilização por autoclavagem a 121 °C por 15 min Alíquotas filtradas com filtro ¹ 0,22 µm
Solução de magnésio (Mg ²⁺) a 10 mg/mL	Cloreto de magnésio ² Esterilização por autoclavagem a 121 °C por 15 min Alíquotas filtradas com filtro ¹ 0,22 µm
Violeta de cristal a 0,1 % (p/v)	Violeta de cristal ¹ a 0,1 % (p/v) Filtração com papel de filtro qualitativo
Ácido acético a 33% (v/v)	Ácido acético glacial ² diluído a 33% (v/v)
Soro fisiológico (NaCl)	NaCl ³ a 0,85 % (p/v) Esterilização por autoclavagem a 121 °C por 15 min
Solução de glucose a 20% (p/v)	Glucose ² a 20 % (p/v) Esterilização por filtração com filtro ¹ 0,22 µm
Solução de fosfato salina (PBS) ⁴	NaCl 138 mmol/L, KCl 2,7 mmol/L, tampão fosfato 11,76 mmol/L; pH 7,4 ± 0,05 a 20 °C Esterilizada por autoclavagem a 121 °C por 15 min
Metanol a 99% (v/v) ⁵	Metanol a 99% (v/v)

(¹): Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Alemanha; (²): Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemanha; (³): Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha; (⁴): Nzytech, Lisboa, Portugal; (⁵): Mallinckrodt Baker B. V., Deventer, Países Baixos.

A preparação de soluções *stock* e de trabalho dos compostos químicos utilizados encontra-se indicada na Tabela 4. As soluções e diluições foram preparadas em água desmineralizada autoclavada, à exceção dos casos indicados. Todas as soluções foram mantidas a -20 °C, à exceção da solução de EtBr, a qual foi mantida a 4 °C.

Tabela 4. Composição das soluções *stock* e de trabalho dos compostos estudados.

	Composto	Solução <i>stock</i>	Fabricante
Compostos antimicrobianos e EtBr	Ciprofloxacina (CIP)	14 mg/mL	Sigma-Aldrich ¹ (Ref ^a 17850)
	Tetraciclina (TET)	10 mg/mL	Sigma-Aldrich ¹ (Ref ^a T7660)
	Eritromicina (ERI)	13 mg/mL em 96% etanol Diluições em água	Sigma-Aldrich ¹ (Ref ^a E-5389)
	Gentamicina (GEN)	11 mg/mL	Sigma-Aldrich ¹ (Ref ^a G3632)
	Brometo de etídio (EtBr)	10 mg/mL	Carl Roth ² (Ref ^a 2218.2)
	Cloreto de benzalcónio (BAC)	19 mg/mL	Sigma-Aldrich ¹ (Ref ^a B-6295)
	Clorexidina (CHX)	2 mg/mL	Sigma-Aldrich ¹ (Ref ^a 282227)
	Tetrafenilfosfónio (TPP)	22 mg/mL	Sigma-Aldrich ¹ (Ref ^a 218782)
IEs controlo	Tioridazina (TZ)	10 mg/mL	Sigma-Aldrich ¹ (Ref ^a T-9025)
	Clorpromazina (CPZ)	10 mg/mL	Sigma-Aldrich ¹ (Ref ^a C-8138)
	Verapamil (VER)	62 mg/mL	Sigma-Aldrich ¹ (Ref ^a V4629)
	Reserpina (RES)	5 mg/mL em 100% DMSO Diluições em água	Sigma-Aldrich ¹ (Ref ^a R0875)
Fármacos candidatos	Cloroquina (CLO)	30 mg/mL	Sigma-Aldrich ¹ (Ref ^a C-6628)
	Desipramina (DES)	10 mg/mL	Sigma-Aldrich ¹ (Ref ^a D-3900)
	Topiramato (TOP)	30 mg/mL em 100% DMSO Diluições em água	Sigma-Aldrich ¹ (Ref ^a PHR1600)
	Atovaquone (ATO)	30 mg/mL em 100% DMSO Diluições em água	Sigma-Aldrich ¹ (Ref ^a PHR1591)
	Amlodipina (AML)	10 mg/mL em 100% DMSO Diluições em água	Sigma-Aldrich ¹ (Ref ^a PHR1185)

Tabela 4. Continuação.

	Composto	Solução stock	Fabricante
Fármacos candidatos	Sulpirida (SUL)	10 mg/mL em 100% DMSO Diluições em água	Sigma-Aldrich ¹ (Ref ^a S8010)
	Tariquidar (TAR)	10 mg/mL em 100% DMSO- Diluições em água	Cayman Chemical ³ (Ref ^a 24180)

(¹): Sigma-Aldrich Chemie GmbH; (²): Carl Roth GmbH + Co. KG; (³): Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, EUA. IEs: inibidores controlo.

2.2 Métodos

2.2.1 Identificação de fármacos candidatos por quimiogenómica – reposicionamento *in silico*

A metodologia utilizada na identificação de fármacos por quimiogenómica – reposicionamento *in silico* está esquematizada na Figura 2 e explicada em detalhe nos pontos seguintes.

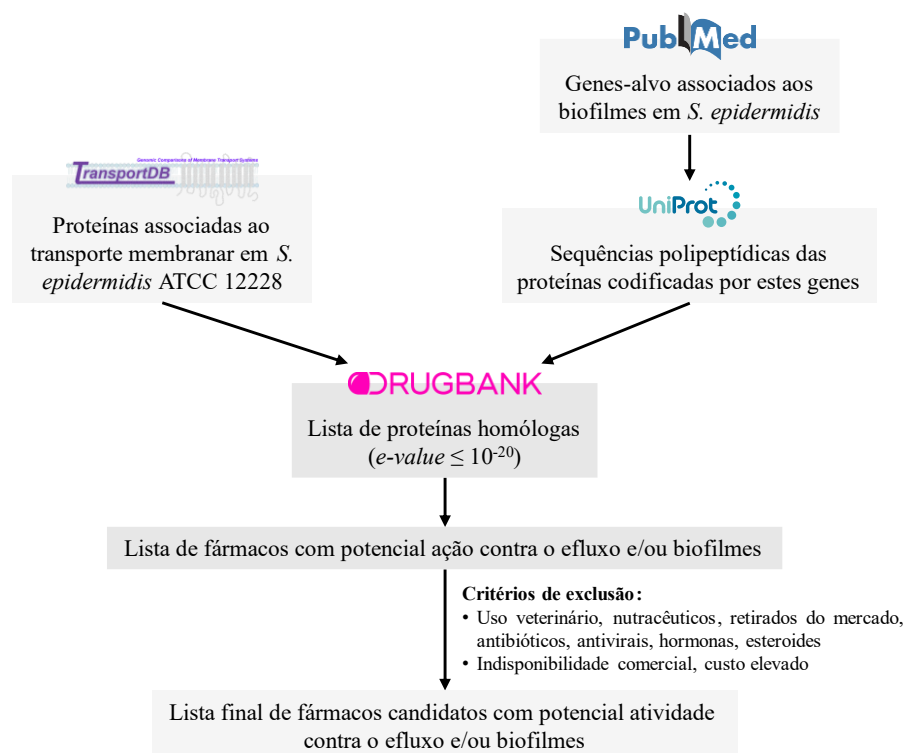


Figura 2. Fluxograma usado para identificação de fármacos candidatos com possível atividade contra o efluxo e/ou biofilmes em *S. epidermidis*.

2.2.1.1 Criação de uma biblioteca de potenciais alvos terapêuticos associados ao transporte membranar

A base de dados TransportDB 2.0 (<http://www.membranetransport.org/>) compila listas de transportadores membranares e respectivas famílias para um total de, até à data, 2558 bactérias com sequências genómicas completas. Para cada uma, é possível obter informação sobre as sequências nucleotídica e polipeptídica de cada um dos transportadores de membrana putativos codificados no seu genoma (140). Com recurso a esta base de dados, foi compilada uma lista de genes que codificam para transportadores de membrana putativos, identificados no genoma de *S. epidermidis* ATCC 12228 (número de acesso NC_004461), classificados de acordo com a família de transportadores a que pertencem. Para cada gene, obteve-se a respetiva sequência polipeptídica, em formato FASTA.

2.2.1.2 Criação de uma biblioteca de potenciais alvos terapêuticos associados aos biofilmes

Na ausência de uma base de dados dedicada aos biofilmes, compilando os genes e respetivas proteínas associadas, foi necessário efetuar um levantamento bibliográfico para a sua identificação em *S. epidermidis*. Estes genes de interesse foram posteriormente pesquisados nos genomas das estirpes ATCC 12228 e ATCC 35984, recorrendo à função Blast na base de dados Uniprot (<https://www.uniprot.org/>). Para cada um dos genes-alvo identificados selecionaram-se apenas as sequências polipeptídicas com *query cover* > 80% e *identity* > 60%, obtendo-se a respetiva sequência polipeptídica em formato FASTA.

2.2.1.3 Criação de uma biblioteca de fármacos potencialmente eficazes contra o efluxo e/ou biofilmes

Para a identificação de possíveis fármacos com ação contra o efluxo e/ou biofilmes (Figura 2), utilizou-se a base de dados DrugBank (<https://go.drugbank.com/>), que fornece informação sobre fármacos aprovados pela FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) e fármacos experimentais em processo de aprovação, os seus mecanismos, interações e alvos

(141). Esta pesquisa foi feita incluindo todas as categorias de fármacos disponíveis, nomeadamente *approved*, *vet approved*, *nutraceutical*, *illicit*, *withdrawn*, *investigational* e *experimental*. No menu “search target sequences”, foram usadas as sequências polipeptídicas anteriormente compiladas para interrogar a base de dados e identificar proteínas-alvo homólogas aos transportadores de membrana ou proteínas associadas aos biofilmes de *S. epidermidis* previamente identificados (pontos 2.2.1.1 e 2.2.1.2). Para esta pesquisa, utilizaram-se os parâmetros predefinidos, à exceção do *e-value* (*expectation value*), sendo apenas consideradas como possíveis alvos proteínas homólogas com um *e-value* $\leq 1 \times 10^{-20}$ (114). Após esta pesquisa obteve-se uma lista preliminar de fármacos organizados de acordo com a sua superfamília química, que atuam sobre as proteínas-alvo homólogas. Para cada fármaco, foi também obtida informação relativa às suas indicações clínicas e toxicidade. A lista final de fármacos candidatos foi obtida após aplicação de vários critérios de exclusão, nomeadamente, fármacos classificados como nutracêuticos, retirados do mercado, de uso veterinário, antibióticos, antivirais, esteroides ou hormonas, indisponibilidade comercial e disponibilidade financeira (custo elevado).

2.2.2 Validação *in vitro* das atividades inibitória de efluxo e antibiofilme dos fármacos candidatos

A atividade dos fármacos candidatos foi avaliada segundo um modelo experimental (Figura 3), utilizando estirpes de *S. epidermidis* que diferem na sua capacidade de efluxo e/ou de formação de biofilme, descritas no ponto 2.1.1 .

Inicialmente, determinaram-se as CMIs de oito compostos antimicrobianos, que incluem os substratos de NorA, CIP (antibiótico), EtBr (corante) e BAC, CHX e TPP (biocidas); o substrato da bomba de efluxo Tet(K), TET (antibiótico); e ERI e GEN (antibióticos não efluxáveis nas estirpes em estudo). Foram também determinadas as CMIs de sete fármacos candidatos – CLO, DES, TOP, ATO, AML, SUL e TAR – e quatro IEs controlo – TZ, CPZ, VER e RES. Os IEs controlo correspondem a compostos com ação inibitória de efluxo já demonstrada em *S. epidermidis* ou outros estafilococos (129,142), permitindo uma comparação com os resultados obtidos e a validação do racional deste trabalho.

Posteriormente, as CMIs dos compostos antimicrobianos foram re-determinadas na presença dos IEs controlo/fármacos candidatos a $\frac{1}{4}$ CMI. Cada composto classificado

como inibidor ou inibidor fraco de efluxo foi testado por ensaios de *checkerboard*, de modo a avaliar interações de sinergismo entre si e compostos antimicrobianos. Estes fármacos foram ainda submetidos a ensaios de adesão em microplaca com coloração por violeta de cristal, para determinar a sua atividade contra a formação de biofilmes.

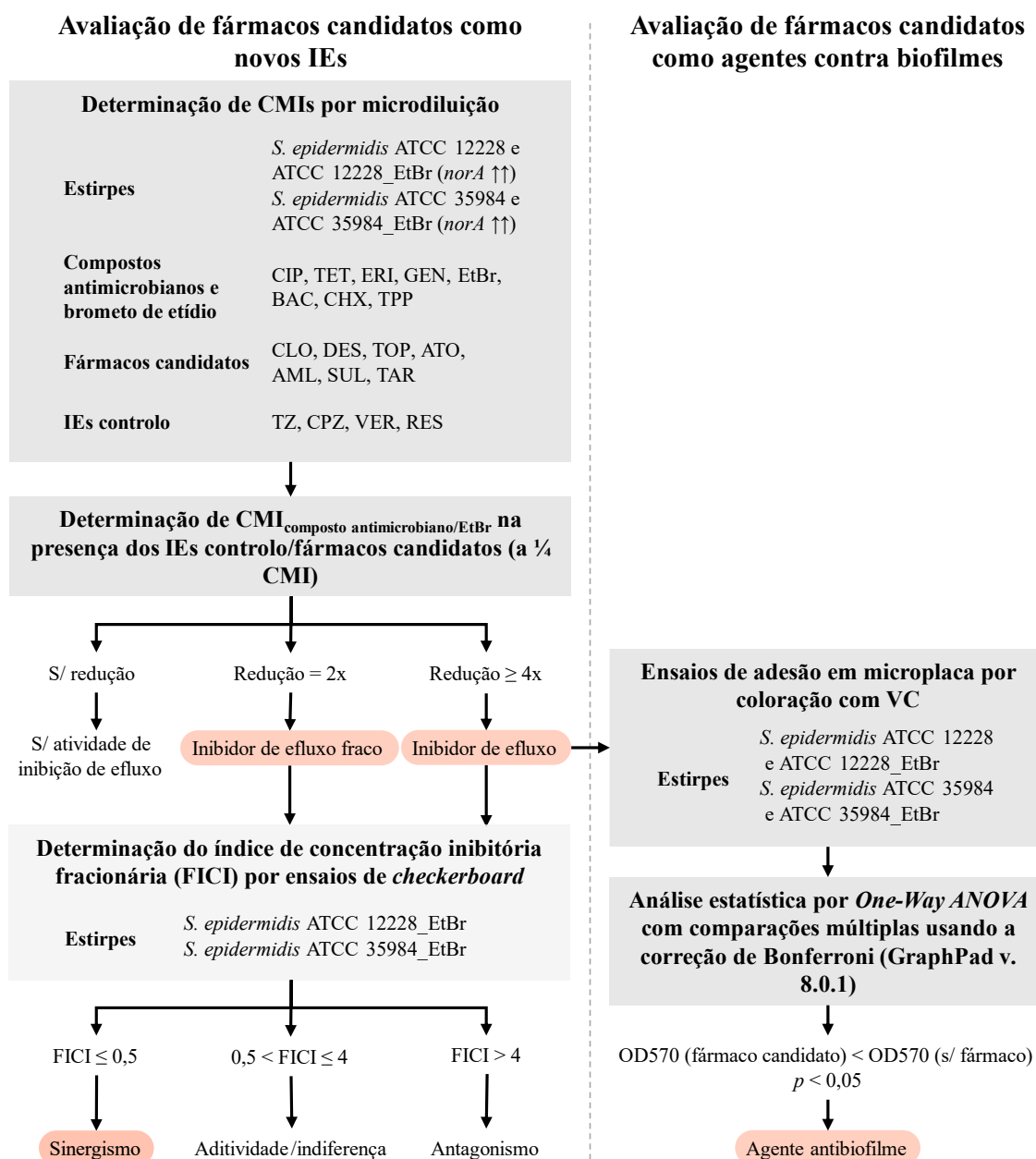


Figura 3. Fluxograma usado para validação *in vitro* das atividades inibitória de efluxo e antibiofilme dos fármacos candidatos. IEs: inibidores de efluxo; CMI: concentração mínima inibitória; FICI: índice de concentração inibitória fracionária; VC: violeta de cristal; OD₅₇₀: densidade óptica a 570 nm; CIP: ciprofloxacina; TET: tetraciclina; ERI: eritromicina; GEN: gentamicina; TZ: tioridazina; CPZ: clorpromazina; VER: verapamil; RES: reserpina; CLO: cloroquina; DES: desipramina; TOP: topiramato; ATO: atovaquone; AML: amlodipina; SUL: sulpirida; TAR: tariquidar.

2.2.2.1 Crescimento das estirpes bacterianas

As estirpes em estudo fazem parte da coleção bacteriana do laboratório, sendo mantidas em *stock* a -80 °C em meio TSB suplementado com 10% (v/v) de glicerol.

As estirpes foram crescidas em meio fresco TSA (*S. epidermidis* ATCC 12228 e ATCC 35984) ou TSA suplementado com 8 mg/L de EtBr (*S. epidermidis* ATCC 12228_EtBr e ATCC 35984_EtBr), com incubação a 37 °C por 24 h ou até 48 h (para a estirpe ATCC 12228_EtBr).

2.2.2.2 Determinação de CMIs

Os valores de CMI foram determinados pelo método de microdiluição utilizando placas de 96 poços de poliestireno com fundo em U (Paul Boettger GmbH, Bodenmais, Alemanha).

O inóculo bacteriano foi preparado, transferindo-se três a quatro colônias de uma placa de isolamento para 5 mL de meio MHB, sendo este incubado a 37 °C com agitação a 180 rpm durante 18 a 20 h. A partir desta cultura foi preparada uma suspensão celular equivalente à escala 0,5 de MacFarland por diluição 1:1000 em meio 10 mL de CA-MHB.

Cada placa de 96 poços foi preparada conforme a Figura 4. Sucintamente, foram distribuídos 100 µL de CA-MHB para cada poço das colunas 2 a 12 e 200 µL de CA-MHB a cada poço da coluna 1. De seguida, adicionaram-se 100 µL das soluções de trabalho de cada composto a testar, preparadas em meio CA-MHB a uma concentração 4x superior à maior concentração a ser testada (Tabela 5), ao respetivo poço na coluna 2. Posteriormente, foram feitas diluições seriadas 1:2 transferindo, 100 µL da coluna 2 para a coluna 3 e assim sucessivamente até à coluna 11, de onde foram descartados os 100 µL remanescentes. Por fim, foram adicionados 100 µL de inóculo a cada poço das colunas 2 a 12. Cada placa incluiu controlos de esterilidade (coluna 1) e controlos de crescimento (coluna 12). As placas foram incubadas a 37 °C durante 18 h, sendo a CMI registada como a menor concentração de composto à qual não se observou crescimento bacteriano. Cada ensaio foi efetuado, pelo menos, em duplicado.

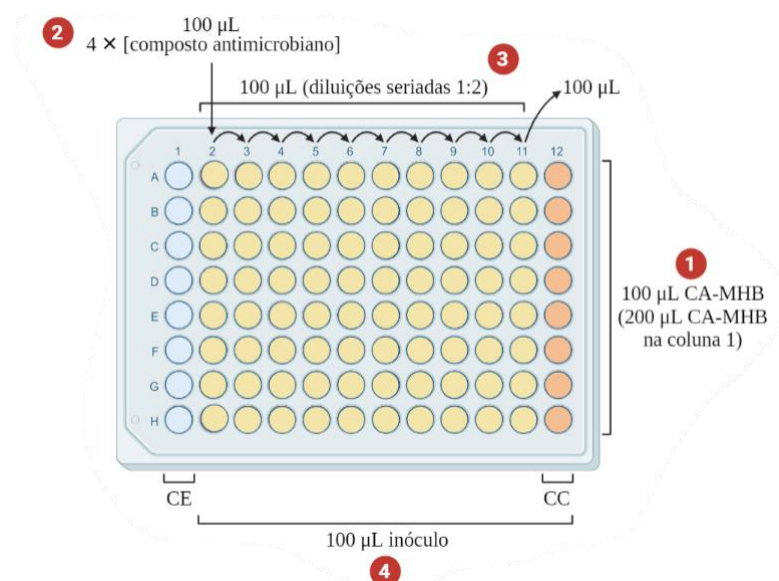


Figura 4. Esquema do método de microdiluição em placa de 96 poços para determinação de CMIs. CE: controle de esterilidade; CC: controle de crescimento. A numeração a vermelho indica a ordem de realização dos diversos passos.

Tabela 5. Gamas de concentrações testadas para a determinação de CMIs dos compostos para as quatro estirpes em estudo.

	Composto	Gama de concentrações testadas (mg/L)
Compostos antimicrobianos e EtBr	CIP	0,125 – 64
	TET	
	ERI	0,25 – 128
	GEN	
	EtBr	0,5 – 256
	BAC	0,03 – 16
	CHX	0,016 – 8
	TPP	0,5 – 256
IEs controle	TZ	0,25 – 128
	CPZ	
	VER	3,125 – 1600
	RES	0,06 – 32
Fármacos candidatos	CLO	2 – 1024
	DES	
	TOP	3,125 – 1600
	ATO	0,5 – 256
	AML	
	SUL	
	TAR	0,125 – 64

IEs: inibidores de efluxo; CIP: ciprofloxacina; TET: tetraciclina; ERI: eritromicina; GEN: gentamicina; EtBr: brometo de etídio; BAC: cloreto de benzalcónio; CHX: clorexidina; TPP: tetrafenilfosfónio; TZ: tioridazina; CPZ: clorpromazina; VER: verapamil; RES: reserpina; CLO: cloroquina; DES: desipramina; TOP: topiramato; ATO: atovaquone; AML: amlodipina; SUL: sulpirida; TAR: tariquidar.

2.2.2.3 Determinação de CMI dos compostos antimicrobianos na presença dos IEs controlo e fármacos candidatos

A capacidade de inibição de efluxo por parte dos IEs controlo e fármacos candidatos foi avaliada por re-determinação da CMI dos compostos antimicrobianos na presença destes IEs a uma concentração subinibitória, correspondente a $\frac{1}{4}$ CMI. Para tal, o método da microdiluição em placa foi realizado conforme indicado no ponto 2.2.2.2, à exceção das alterações a seguir descritas (Figura 5 e Tabela 6). Após a diluição seriada dos compostos antimicrobianos, foram adicionados aos poços das colunas 2 a 12 e linhas B a H, 10 μ L de solução de trabalho de cada IE ou fármaco candidato (preparada em CA-MHB de modo a obter uma concentração final equivalente a $\frac{1}{4}$ CMI). De seguida, foram adicionados 90 μ L de inóculo a cada um dos poços. Para cada ensaio, foi incluído um controlo de re-determinação de CMI do composto antimicrobiano na ausência de IE ou fármaco candidato. Cada ensaio foi realizado, pelo menos, em duplicado.

Cada placa foi incubada a 37 °C durante 18 h e registou-se a CMI como a menor concentração de composto à qual não se observou crescimento bacteriano. Considerou-se inibição de efluxo quando a adição de um fármaco/IE controlo resultou na redução de, pelo menos, 4x do valor de CMI de um composto antimicrobiano quando comparado com o seu valor original (ausência de fármaco/IE controlo) (143).

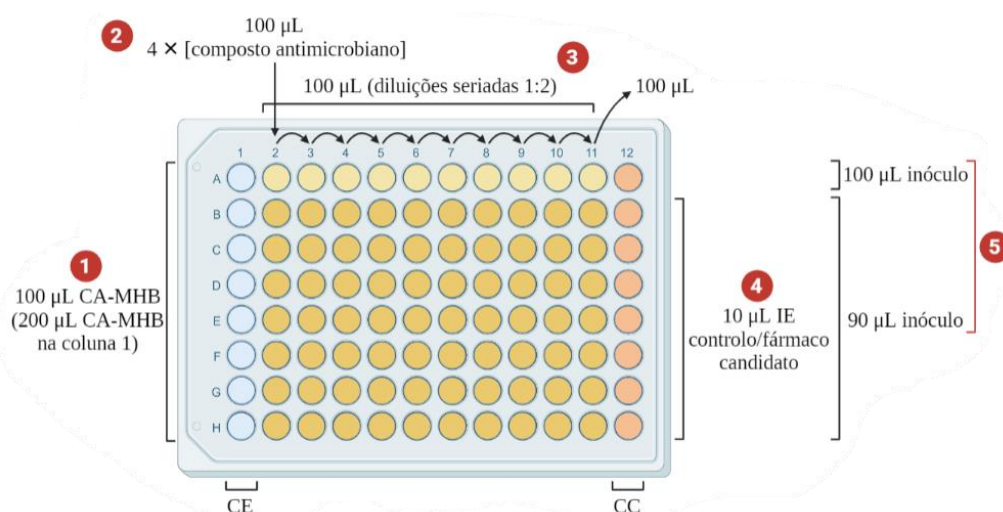


Figura 5. Esquema do método de microdiluição em placa de 96 poços para determinação das CMIs na presença dos IEs controlo e dos fármacos candidatos. IE: inibidor de efluxo; CE: controlo de esterilidade; CC: controlo de crescimento. A numeração a vermelho indica a ordem de realização dos diversos passos.

Tabela 6. Gamas de concentrações testadas usadas na re-determinação de CMI's dos compostos antimicrobianos na presença dos IEs controlo e dos fármacos candidatos.

Compostos antimicrobianos e EtBr	Estirpe	ATCC 12228	ATCC 12228_EtBr	ATCC 35984	ATCC 35984_EtBr
	Composto	Gama de concentrações testadas (mg/L)			
	CIP	0,004 – 2	0,06 – 32	0,002 – 1	0,016 – 8
	TET	0,5 – 256	0,5 – 256	0,016 – 8	0,008 – 4
	ERI	0,008 – 4	0,008 – 4	4 – 2048	4 – 2048
	GEN			1 – 512	0,5 – 256
	EtBr		0,125 – 64	0,008 – 4	0,25 – 128
	BAC	0,03 – 16	0,03 – 16		
	CHX	0,008 – 4	0,016 – 8		
TPP	0,03 – 16	1 – 512	0,03 – 16	1 – 512	

CIP: ciprofloxacina; TET: tetraciclina; ERI: eritromicina; GEN: gentamicina; EtBr: brometo de etídio; BAC: cloreto de benzalcónio; CHX: clorexidina; TPP: tetrafenilfosfónio.

2.2.2.4 Determinação de efeito de sinergismo entre compostos através de ensaios de *checkerboard*

Para avaliar o potencial efeito de sinergismo entre os IEs controlo/fármacos candidatos e os compostos antimicrobianos, foram realizados ensaios de *checkerboard* em placa de 96 poços de poliestireno com fundo em U, usando o método desenvolvido por Bellio *et al.* (144).

O inóculo bacteriano inicial foi preparado de modo semelhante ao descrito no ponto 2.2.2.2. A partir desta cultura foi preparada uma suspensão celular equivalente à escala 0,5 de MacFarland por diluição 1:1000 em soro fisiológico (10 µL de cultura para 10 mL de soro fisiológico).

Foram preparadas soluções, em meio 2 × CA-MHB, de IE controlo/fármaco candidato a uma concentração 4x (solução S_A) e 8x (2 × S_A) superior à maior concentração a testar e de composto antimicrobiano a uma concentração 4x (solução S_B) superior à maior concentração a testar. As gamas de concentrações testadas para cada composto estão indicadas na Tabela 7.

Tabela 7. Gamas de concentrações dos IEs controlo, dos fármacos candidatos e dos compostos antimicrobianos testadas nos ensaios de *checkerboard*.

	Estirpe	ATCC 12228_EtBr	ATCC 35984_EtBr
	Composto	Gama de concentrações testadas (mg/L)	
Compostos antimicrobianos e EtBr	CIP	0,03 – 8	0,02 – 4
	EtBr	0,125 – 32	0,25 – 64
	TPP	1 – 256	
IEs controlo	TZ	0,5 – 32	
	CPZ	2 – 128	
	VER	25 – 1600	
Fármacos candidatos	CLO	16 – 2048	32 – 2048
	DES	4 – 256	
	AML	2 – 128	
	TAR	0,03 – 2	2 – 128

IEs: inibidores de efluxo; CIP: ciprofloxacina; EtBr: brometo de etídio; TPP: tetrafenilfosfónio; TZ: tioridazina; CPZ: clorpromazina; VER: verapamil; CLO: cloroquina; DES: desipramina; AML: amlodipina; TAR: tariquidar.

Para cada ensaio de *checkerboard* preparou-se uma placa de 96 poços, de acordo com o esquema da Figura 6-A e B. Foram adicionados 100 µL de 2 × CA-MHB aos poços das colunas 2 a 12. De seguida, adicionou-se 100 µL da solução S_A aos poços A2 a A10 e 100 µL da solução 2 × S_A ao poço A11 e foram feitas diluições seriadas 1:2, transferindo-se 100 µL dos poços da linha A à linha G, de onde foram descartados os restantes 100 µL. Posteriormente, adicionaram-se 100 µL da solução S_B a cada poço da coluna 11 e foram feitas diluições seriadas 1:2, transferindo-se 100 µL dos poços da coluna 11 à coluna 3, descartando-se os últimos 100 µL. Por fim, adicionou-se 100 µL do inóculo aos poços das colunas 2 a 12. Cada placa foi incubada a 37 °C durante 18 h, período após o qual se registou a ausência/presença de crescimento bacteriano em cada poço. Cada ensaio incluiu controlos de esterilidade, controlos de crescimento e controlos contendo apenas o composto antimicrobiano ou o IE controlo/fármaco candidato. Cada ensaio foi realizado, no mínimo, em duplicado.

A partir dos valores de CMI obtidos e segundo a Equação 1, foi calculado o índice de concentração inibitória fracionária (FICI, do inglês *fractional inhibitory concentration index*), para todas as combinações de concentrações testadas.

$$FICI = \frac{CMI_{AB}}{CMI_A} + \frac{CMI_{BA}}{CMI_B}$$

Equação 1. Cálculo de FICI para cada combinação de composto antimicrobiano e IE controlo/fármaco candidato. A: IE controlo/fármaco candidato; B: composto antimicrobiano; CMI_{AB} : CMI do IE controlo/fármaco candidato na presença do composto antimicrobiano nas concentrações em teste; CMI_A : CMI original do composto A, CMI_{BA} : CMI do composto antimicrobiano na presença do IE controlo/fármaco candidato nas concentrações em teste; CMI_B : CMI original do composto B.

Os valores de FICI (média dos ensaios) foram interpretados por dois métodos. O método 1, desenvolvido por Den Hollander *et al.* (145), utiliza a média de todos os FICI do primeiro poço sem crescimento de cada linha e coluna ao longo da interface crescimento/ausência de crescimento para determinar um FICI final. O método 2 (146) considera que o FICI final corresponde ao menor FICI ao longo dessa interface (Figura 6-C).

Considerou-se que dois compostos apresentam um efeito de sinergismo quando o FICI $\leq 0,5$, aditividade/indiferença quando $0,5 < FICI \leq 4$ e antagonismo quando o FICI > 4 (147).

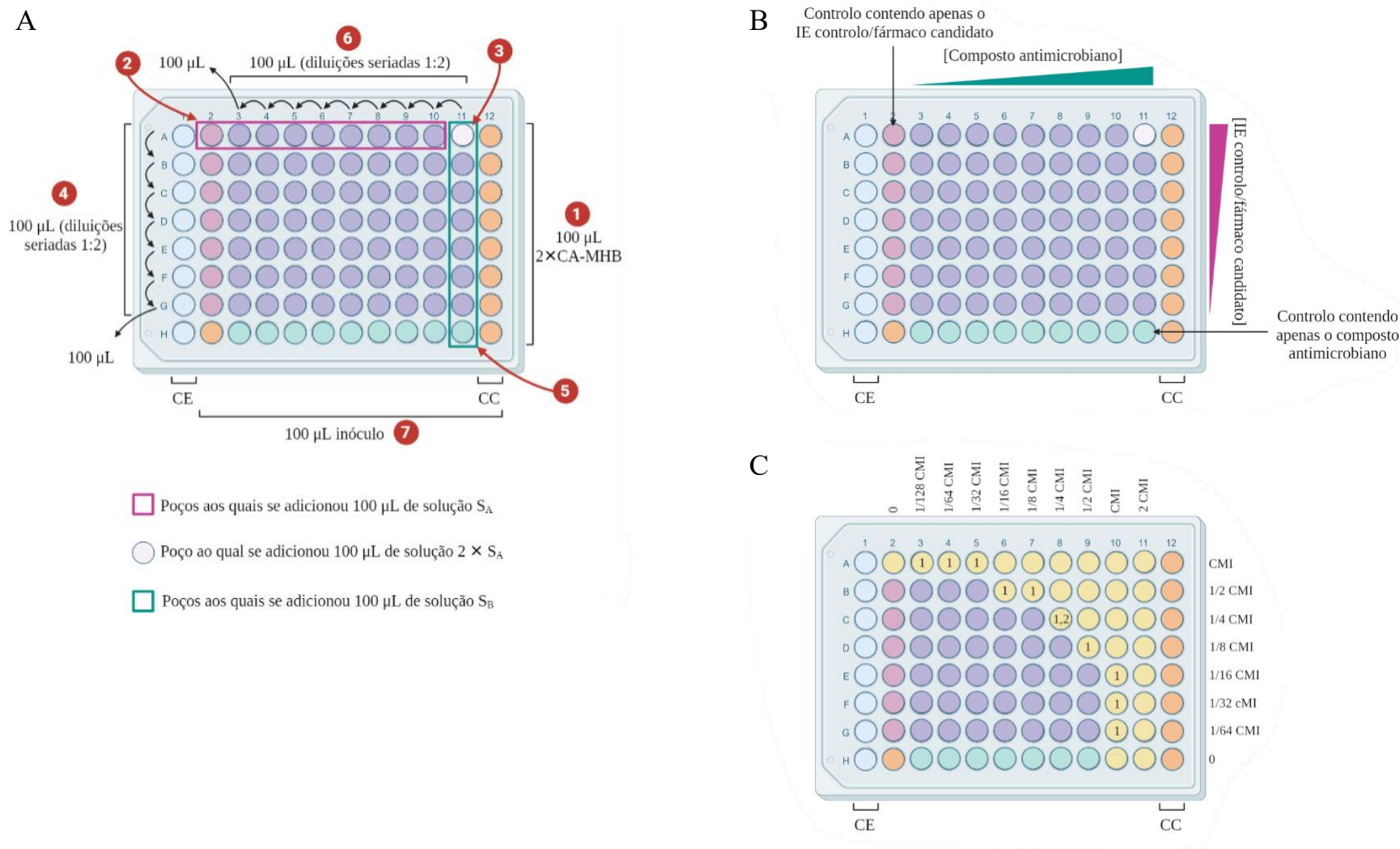


Figura 6. Esquema do ensaio de checkerboard para avaliação de sinergismo entre os compostos antimicrobianos e os IEs controle ou fármacos candidatos. (A) Modo de preparação de cada placa; (B) Configuração final de cada placa; (C) Esquema representativo dos métodos usados na análise dos resultados obtidos nos ensaios de checkerboard. IE: inibidor de efluxo; CMI: concentração mínima inibitória; CE: controle de esterilidade; CC: controle de crescimento; Os poços assinalados com (1) e (2) no painel (C) correspondem aos usados para a determinação do índice de concentração inibitória fracionária (FICI, *fractional inhibitory concentration index*) aplicando o método do cálculo da média dos valores de FICI na interface crescimento/ausência de crescimento (1) ou o método do menor valor de FICI calculado ao longo dessa interface (2). A numeração a vermelho indica a ordem de realização dos diversos passos.

2.2.2.5 Avaliação da atividade antibiofilme dos IEs controlo e fármacos candidatos

A atividade antibiofilme dos IEs controlo e fármacos candidatos foi avaliada através de ensaios de adesão em placa de 96 poços de cultura celular O (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Bélgica) com coloração por violeta de cristal. Os IEs controlo e fármacos candidatos foram testados numa gama de concentrações entre o valor da CMI e 1/256 CMI.

Transferiu-se três a quatro colónias isoladas em TSA (ATCC 12228 e ATCC 35984) ou em TSA + 8 µg/mL de EtBr (ATCC 12228_EtBr e ATCC 35984_EtBr) para 5 mL de TSB, o qual foi incubado a 37 °C sem agitação durante 18 a 24 h. A partir da cultura obtida, foi preparada uma suspensão celular em 10 mL de TSB ajustada a uma densidade óptica a 600 nm (OD_{600}) entre 0,09 e 0,12, equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Foram preparadas diluições 10^{-2} a 10^{-7} desta suspensão em soro fisiológico e plaqueadas alíquotas de 100 µL das diluições 10^{-5} a 10^{-7} em TSA para enumeração e confirmação da concentração celular da suspensão.

Preparou-se uma diluição 1:100 da suspensão celular ajustada, em TSB suplementado com 1% de glucose. Este inóculo foi alíquotado, sendo a cada alíquota adicionado IE controlo ou fármaco candidato de modo a obter uma das concentrações em estudo. A cada poço das colunas 2 a 10 da microplaca, foram adicionados 200 µL de cada suspensão celular final suplementada com IE controlo ou fármaco candidato conforme descrito na Figura 7. Aos poços da coluna 1, foram adicionados 200 µL da suspensão celular final (controlo de crescimento); aos poços da coluna 11 foi adicionado apenas TSB (controlo de esterilidade) e aos poços da coluna 12 foi adicionado, no dia da leitura da placa, ácido acético a 33% (branco). Cada placa foi incubada a 37 °C sem agitação durante 24 h.

Após incubação, foi medido o crescimento bacteriano através da leitura da OD_{600} num fluorímetro Synergy™ HT (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, EUA). De seguida, removeu-se o conteúdo de todos os poços com uma micropipeta multicanal e cada poço foi lavado três vezes com 100 µL de PBS para remover excedentes de meios de cultura e células não aderentes. De seguida, adicionou-se 150 µL de metanol a 99% e incubou-se durante 20 min para fixação das células aderentes. Após este período, o metanol foi removido com uma micropipeta multicanal e, posteriormente, por inversão e

pressão contra uma folha de papel absorvente. A placa foi deixada a secar ao ar em posição invertida durante a noite.

No dia seguinte, adicionaram-se 150 μL de violeta de cristal a 0,1% aos poços das colunas 1 a 11, deixando-se atuar por 15 minutos. O excesso de corante foi removido com uma micropipeta multicanal e a placa lavada três vezes em cada um de dois recipientes com água desmineralizada. Removeu-se o excesso de água da placa por pressão contra uma folha de papel, deixando-se a placa a secar ao ar durante 1 a 2 h, invertida. Depois da placa estar totalmente seca, adicionaram-se 150 μL de ácido acético a 33% para solubilizar o violeta de cristal, deixando-se atuar durante 30 min. A biomassa associada ao biofilme foi quantificada por medição da densidade óptica a 570 nm (OD_{570}) num fluorímetro SynergyTM HT (Bio-Tek Instruments, Inc.), usando a opção de leitura de toda a área do poço. Cada condição foi testada em quatro réplicas técnicas e cada ensaio foi realizado, pelo menos, em duplicado.

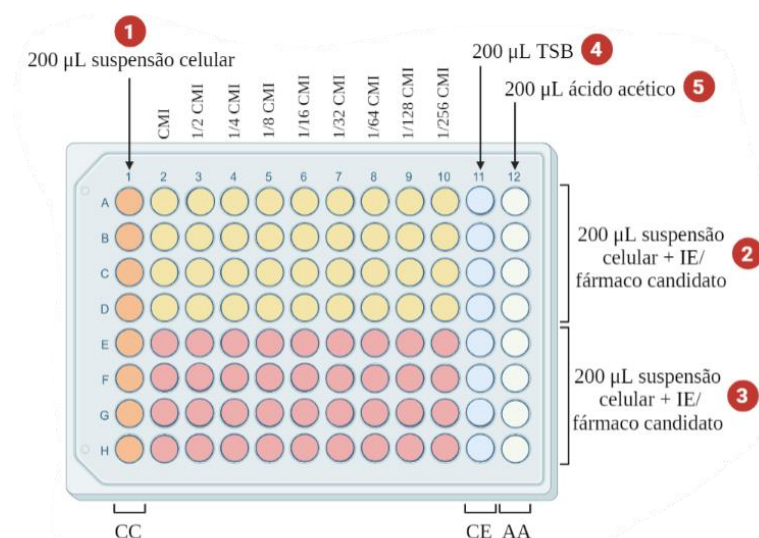


Figura 7. Esquema do ensaio de adesão em microplaca com coloração por violeta de cristal para determinação da atividade antibiofilme dos IEs controle e fármacos candidatos. IE: inibidor de efluxo; CMI: concentração mínima inibitória; CC: controle de crescimento; CE: controle de esterilidade; AA: branco. A numeração a vermelho indica a ordem de realização dos diversos passos.

Em cada ensaio, para cada condição teste, foi calculada a média das quatro medições da OD_{600} e OD_{570} , assim como o desvio padrão (SD) associado. Posteriormente, foi obtido o valor de OD média final (OD_{final}) para cada concentração em estudo por subtração da média do controle de esterilidade aos valores de média das várias concentrações. Os resultados obtidos intra-ensaio foram validados quando $\text{SD} \leq 15\%$ de OD_{final} . Os

resultados finais foram obtidos por determinação da média e SD associado de, pelo menos, dois ensaios independentes, sendo estes validados quando $SD \leq 20\%$ do valor da média obtida.

A atividade antibiofilme de cada IE controlo/fármaco candidato foi avaliada por análise estatística realizada usando o software GraphPad v. 8.0.1, comparando a produção de biofilme na presença de IE controlo/fármaco candidato relativamente à condição de não exposição. A análise foi feita por “One-Way ANOVA” com comparações múltiplas (vs. o grupo controlo – estirpe não exposta) usando a correção de Bonferroni. Cada comparação foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

3 Resultados

3.1 Criação de uma biblioteca de potenciais alvos terapêuticos associados ao efluxo

Este trabalho teve início com a compilação de uma lista de transportadores de membrana em *S. epidermidis* com recurso à base de dados TransportDB 2.0., utilizando a informação disponível sobre a estirpe ATCC 12228. Deste modo, foi obtida uma lista de 321 transportadores de membrana, assim como as respetivas sequências polipeptídicas. Destes, 149 (46,4%) são transportadores dependentes de ATP, 143 (44,5%) são transportadores secundários, 14 (4,4%) correspondem a sistemas de fosfotransferase (PTS), 8 (2,5%) a canais iónicos e 7 (2,2%) pertencem a famílias ainda não classificadas (Tabela A1).

3.2 Criação de uma biblioteca de potenciais alvos terapêuticos associados aos biofilmes

A partir de uma pesquisa na literatura disponível, foi compilada uma lista de 39 genes envolvidos na formação de biofilmes em *S. epidermidis* (Tabela 8). Recorrendo à base de dados Uniprot, foram obtidas as respetivas sequências polipeptídicas codificadas por estes genes, identificados na Tabela 8.

Tabela 8. Lista de genes envolvidos na formação de biofilmes em *S. epidermidis* e a sua função.

Função	Gene	Proteína
Adesão à parede celular	<i>aap</i>	Proteína associada à acumulação Aap
	<i>atlE</i>	Autolisina AtlE
	<i>embp</i>	Proteína de ligação à matriz extracelular Embp
	<i>gehD</i>	Lipase GehD
	<i>sdrC-H</i>	MSCRAMM (SdrC a SdrH)
	<i>ebpS</i>	Proteína de ligação à elastina
	<i>aae</i>	Autolisina/adesina Aae
	<i>clfA/B</i>	Fator de coagulação A/B
	<i>fnBPA/B</i>	Proteína de ligação à fibronectina A/B

Tabela 8. Continuação.

Função	Gene	Proteína
Acumulação e dispersão do biofilme	operão <i>ica</i> (<i>icaADBC</i>)	PIA/PNAG
	<i>bhp</i>	Proteína homóloga do biofilme Bhp
	<i>sesC</i>	Proteína de superfície C de <i>S. epidermidis</i>
	<i>sepA</i>	Elastase extracelular SepA
	<i>esp</i>	Proteína de superfície
	<i>sesE</i>	Proteína de superfície E de <i>S. epidermidis</i>
	<i>tagO</i>	Proteína TagO
	<i>ecpA</i>	Protease cisteína extracelular A
Regulação	<i>agr</i>	Regulador acessório
	<i>luxS</i>	S-ribosilhomocisteína liase
	<i>sarA</i>	Regulador
	<i>sarR</i>	Regulador
	<i>sarX</i>	Regulador
	<i>sarZ</i>	Regulador
	<i>mgrA</i>	Regulador transcricional
	<i>ccpA</i>	Proteína A de controlo de catabolitos
	<i>icaR</i>	Regulador transcricional do operão <i>ica</i>
	<i>cidA</i>	Proteína CidA <i>holin-like</i>
	<i>saeR</i>	Histidina-quinase do sistema regulador de dois componentes SaeRS
	<i>saeS</i>	Regulador de resposta do sistema regulador de dois componentes SaeRS

MSCRAMM: componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas de adesão da matriz; PIA: polissacarídeo de adesão intercelular; PNAG: poli-*N*-acetilglucosamina.

3.3 Criação de uma biblioteca de fármacos potencialmente eficazes contra o efluxo e os biofilmes

A pesquisa na base de dados DrugBank de todas as sequências polipeptídicas, obtidas nos pontos 3.1 e 3.2, resultou numa lista de 79 proteínas homólogas aos transportadores membranares de *S. epidermidis* ATCC 12228, alvos de 626 fármacos, assim como uma lista de 7 proteínas homólogas a proteínas envolvidas na formação de biofilmes, por sua vez associadas a 2 fármacos.

Os resultados das duas pesquisas foram compilados numa lista com 628 fármacos. Desta lista, foram excluídos fármacos de uso veterinário e nutracêuticos, fármacos retirados do mercado, antibióticos, antivirais, esteroides e hormonas, tendo a lista ficado reduzida a um total de 494 fármacos. Com base na sua indisponibilidade comercial e/ou no seu preço, foi excluído um conjunto adicional de fármacos, reduzindo a lista para 233 fármacos candidatos. A Figura 8 apresenta um esquema dos passos envolvidos na compilação da lista final de fármacos com potencial ação contra o efluxo e a formação de biofilmes em *S. epidermidis*.

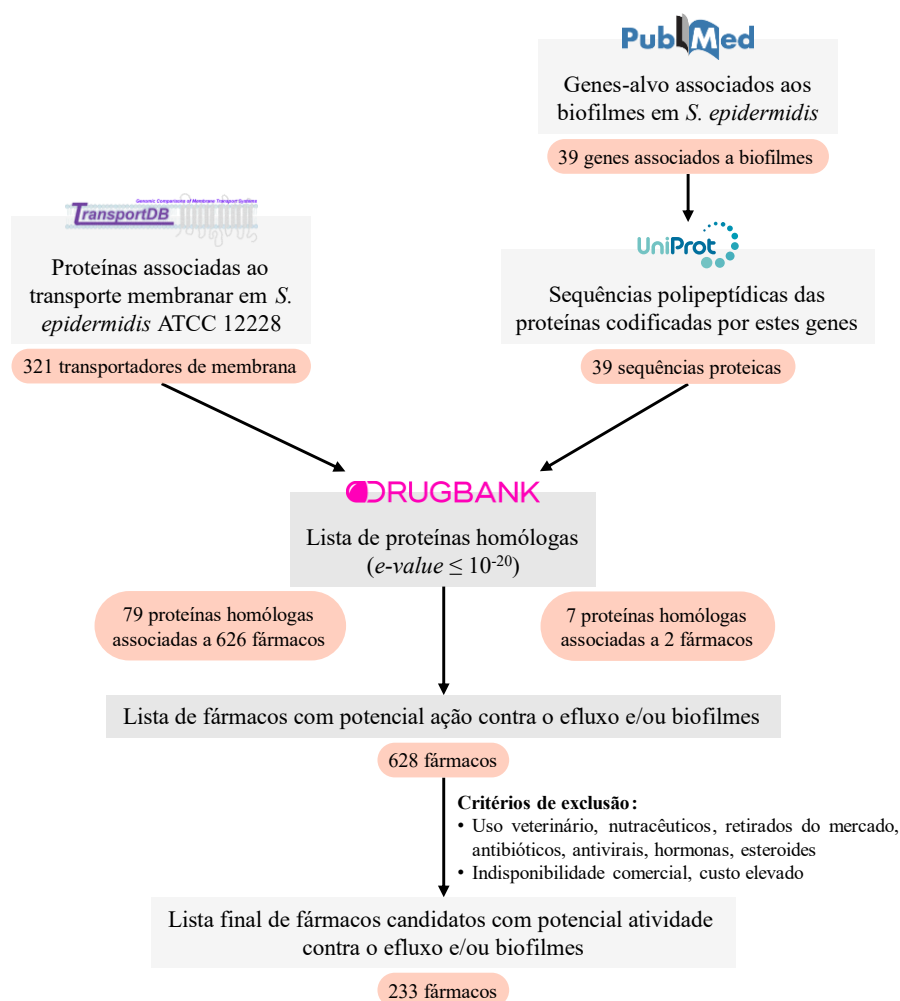


Figura 8. Resultados obtidos com a aplicação do fluxograma para identificação de fármacos contra o efluxo e a formação de biofilmes em *S. epidermidis*.

Por fim, os 233 fármacos desta lista foram agrupados de acordo com a superclasse química a que pertencem (Figura 9-A). No total, os fármacos foram divididos em 11 superclasses químicas, com a seguinte distribuição: compostos orgânicos heterocíclicos

(99/233, 42,5%); benzenoides (71/233, 30,5%); ácidos orgânicos e derivados (16/233, 6,9%); fenilpropanoides e policetídeos (13/233, 5,6%); alcaloides e derivados (12/233, 5,2%); compostos orgânicos de azoto (7/233, 3,0%); lípidos e moléculas *lipid-like* (6/233, 2,6%); compostos orgânicos de oxigênio (5/233, 2,1%); lignanos, neolignanos e compostos relacionados (2/233, 0,9%); compostos mistos de metais/não-metais (1/233, 0,4%); e compostos organossulfurados (1/233, 0,4%). A lista dos fármacos e sua distribuição de acordo com a superclasse química encontram-se na Tabela A2.

Adicionalmente, os fármacos candidatos foram também agrupados de acordo com a sua indicação terapêutica, consoante informação disponibilizada em DrugBank (Figura 9-B). Os fármacos foram divididos conforme a sua ação no sistema nervoso (57/233, 24,5%); no sistema cardiovascular (47/233, 20,2%); como antineoplásicos e agentes imunomoduladores (45/233, 19,3%); no trato alimentar e metabolismo (26/233, 11,2%); experimentais/investigacionais (13/233, 5,6%); no sistema músculo-esquelético (12/233, 5,2%); como antiparasitários, inseticidas e repelentes (11/233, 4,7%); no sistema respiratório (11/233, 4,7%); no trato génito-urinário e hormonas sexuais (6/233, 2,6%); no sangue e órgãos hematopoiéticos (5/233, 2,1%); de uso dermatológico (5/233, 2,1%); como antissépticos (4/233, 1,7%); com ação em órgãos sensoriais (1/233, 0,4%); e usados como agentes de diagnóstico (1/233, 0,4%). Alguns dos fármacos apresentam mais do que uma indicação terapêutica.

Com base em critérios como a classe química a que pertencem e a existência de estudos prévios sobre a sua ação contra o efluxo e/ou antibiofilme, foram selecionados para a experimentação *in vitro* sete fármacos representativos das duas superclasses químicas principais e cujas indicações terapêuticas estão descritas na Tabela 9.

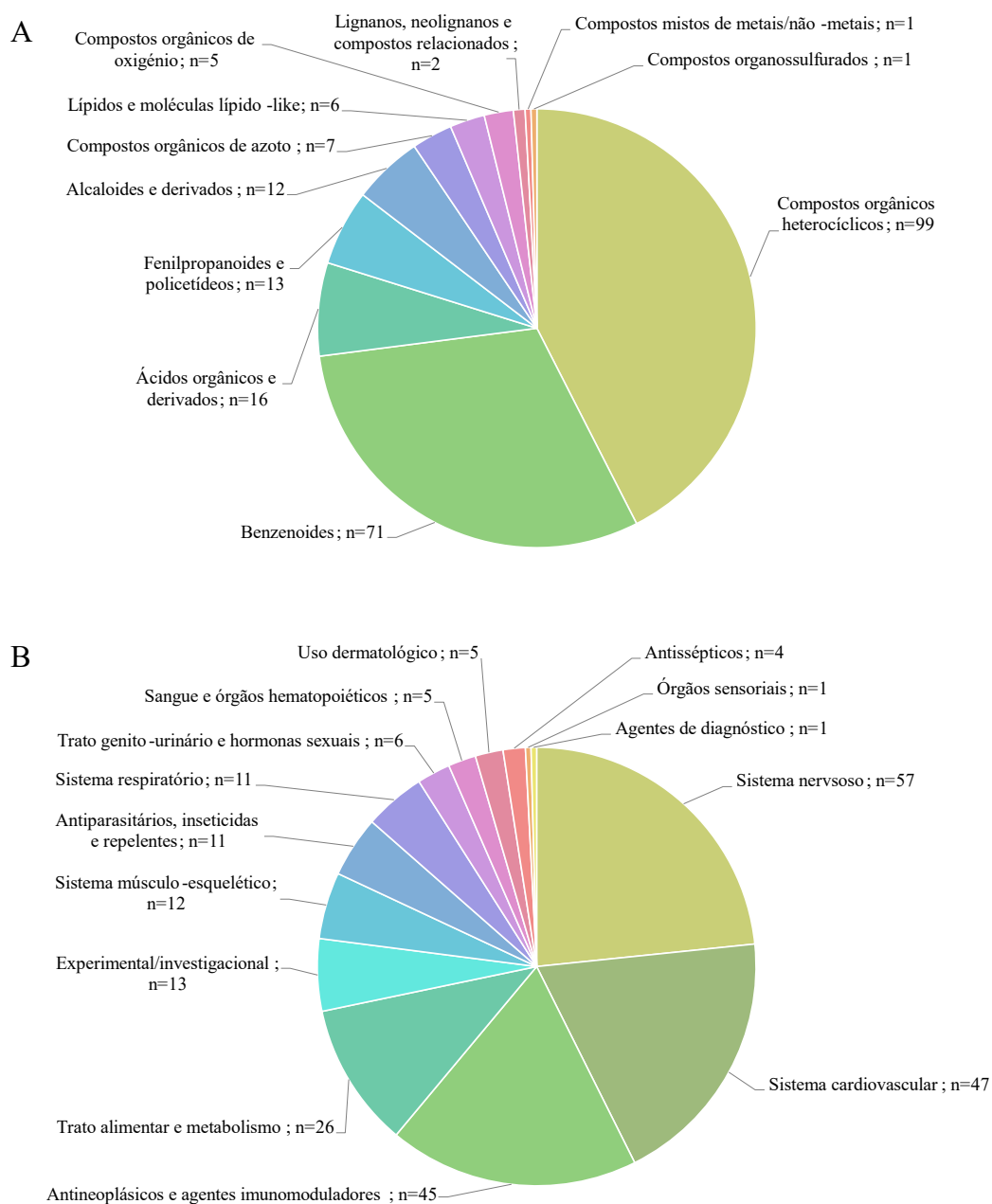


Figura 9. Distribuição dos fármacos candidatos de acordo com a sua superclasse química (A) e indicação terapêutica (B).

Tabela 9. Superclasse química e indicação terapêutica dos fármacos candidatos selecionados para a experimentação *in vitro*.

Fármaco candidato	Indicação terapêutica	Alvos
Compostos orgânicos heterocíclicos		
Cloroquina (CLO)	Antiparasitários, inseticidas e repelentes - Antimalárico (malária por <i>Plasmodium vivax</i>, <i>P. malariae</i>, <i>P. ovale</i> e estirpes suscetíveis de <i>P. falciparum</i>) - Amibíase extraintestinal - Profilaxia (vírus Zika) - Doenças reumáticas	- Glutathione S-transferase (<i>P. falciparum</i>) - Proteína HMGB1 (humano) - Fator de necrose tumoral (humano) - Recetor do tipo Toll 9 (humano) - Glutathione S-transferase A2 e Mu 1 (humano) - Enzima conversora da angiotensina 2 (humano)
Desipramina (DES)	Sistema nervoso - Antidepressivo (sintomas depressivos, distúrbios de ansiedade, TDAH) - Controlo de dor neuropática periférica crónica	- Transportadores de noradrenalina e serotonina dependentes de sódio - Recetores de 5-hidroxitriptamina 1A, 2A e 2C (humano) - Recetores adrenérgicos β-1 e 2 e α-1 e 2 (humano) - Esfingomielina fosfodiesterase (humano) - Recetor de histamina H1 (humano) - Recetores muscarínicos de acetilcolina M1-5 (humano) - Recetor de dopamina D2 (humano)
Topiramato (TOP)	Sistema nervoso - Antiepiléptico (convulsões tónico-clónicas parciais ou primárias generalizadas, convulsões associadas à síndrome de Lennox-Gastaut) - Profilaxia de enxaquecas	- Subunidade α-1 do recetor GABA (humano) - Subunidade α do canal de sódio (humano) - Recetor cainato (humano) - Anidrases carbónicas 1-4 (humano) - Canal de cálcio do tipo L (humano) - Canal de cálcio dependente de voltagem do tipo R (humano)
Amlodipina (AML)	Sistema cardiovascular Bloqueador de canais de cálcio (hipertensão, doença arterial coronária, angina crónica estável, angina vasoespástica)	- Subunidades α-1C e β-1 do canal de cálcio dependente de voltagem do tipo L (humano) - Subunidade α-1I do canal de cálcio dependente de voltagem do tipo T (humano) - Subunidade α-1B do canal de cálcio dependente de voltagem do tipo N (humano) - Subunidade α-1/δ-3 do canal de cálcio dependente de voltagem (humano) - Anidrase carbónica 1 (humano) - Esfingomielina fosfodiesterase (humano)
Benzenoides		
Atovaquone (ATO)	Antiparasitários, inseticidas e repelentes - Antimalárico (malária por <i>P. falciparum</i>) - Antifúngico (pneumonia por <i>Pneumocystis carinii</i> e <i>P. jirovecii</i> em doentes intolerantes ao trimetoprim-sulfametoxazol)	- Citocromo B (<i>P. falciparum</i>) - Diidroorotato desidrogenase mitocondrial (<i>P. falciparum</i> e humano)
Sulpirida (SUL)	Sistema nervoso Antipsicótico (esquizofrenia aguda e crónica)	- Recetores de dopamina D2-4 (humano) - Anidrases carbónicas 2 e 3 (humano)
Tariquidar (TAR)	Experimental/investigacional Cancro ovárico, do pulmão e da mama	P-glicoproteína 1 (humano)

TDAH: transtorno de déficit de atenção com hiperatividade.

3.4 Validação *in vitro* das atividades inibitória de efluxo e/ou antibiofilme dos fármacos candidatos

3.4.1 Determinação de concentrações mínimas inibitórias

O primeiro passo laboratorial consistiu na determinação de CMIs de todos os compostos testados, nomeadamente os oito compostos antimicrobianos, quatro IEs controlo e sete fármacos candidatos (Tabela 10).

Tabela 10. CMIs dos compostos antimicrobianos, IEs controlo e fármacos candidatos para as quatro estirpes de *S. epidermidis* em estudo.

	Estirpe	ATCC 12228	ATCC 12228_EtBr	ATCC 35984	ATCC 35984_EtBr
	Composto	CMI (mg/L)			
Compostos antimicrobianos e EtBr	CIP	0,25	8	0,25	2
	TET	64	64	2	2
	ERI	0,5	0,25	>2048	>2048
	GEN	0,125	1	128	128
	EtBr	0,25	16	0,5	32
	BAC	1	2	1	4
	CHX	1	2	1	2
	TPP	8	128	4	128
IEs controlo	TZ	32	32	32	32
	CPZ	64	128	64	128
	VER	1600	1600	1600	1600
	RES	>32	>32	>32	>32
Fármacos candidatos	CLO	>1024	>1024	>1024	>1024
	DES	128	128	128	128
	TOP	>1600	>1600	>1600	>1600
	ATO	>256	>256*	>256	>256
	AML	128	128	64	64
	SUL	>256	>256	>256	>256
	TAR	>64	2	>64	>64

(*): Foi realizado apenas um ensaio. IEs: inibidores de efluxo; CIP: ciprofloxacina; TET: tetraciclina; ERI: eritromicina; GEN: gentamicina; EtBr: brometo de etídio; BAC: cloreto de benzalcónio; CHX: clorexidina; TPP: tetrafenilfosfónio; TZ: tioridazina; CPZ: clorpromazina; VER: verapamil; RES: reserpina; CLO: cloroquina; DES: desipramina; TOP: topiramato; ATO: atovaquone; AML: amlodipina; SUL: sulpirida; TAR: tariquidar.

A análise dos valores de CMI obtidos para os dois pares de estirpes isogénicas indicou que ambos apresentam o perfil de suscetibilidade esperado (Tabela 1), em concordância com estudos anteriores (54,135). Como exceção, a estirpe ATCC 35984, inicialmente considerada suscetível à TET, e a estirpe ATCC 35984_EtBr, considerada suscetível à CIP e à TET, são agora classificadas como resistentes a esses antibióticos, tendo em conta as novas recomendações da EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), atualizadas a 1 de janeiro de 2023 (148).

Relativamente às estirpes parentais, as estirpes adaptadas apresentam, como esperado, valores de CMIs elevados para os substratos de NorA, nomeadamente a CIP, EtBr, BAC, CHX e TPP. Verificou-se ainda um aumento na CMI do antibiótico não efluxável GEN para a ATCC 12228_EtBr, tal como reportado anteriormente (54).

Relativamente aos IEs controlo, as suas CMIs mostraram manter-se para as quatro estirpes em estudo, à semelhança do já reportado num estudo anterior (135). Observou-se somente uma variação da CMI da CPZ na ordem de uma diluição entre estirpes parentais e adaptadas. Os valores de CMI obtidos para os fármacos candidatos foram igualmente semelhantes entre as estirpes, à exceção da CMI da AML que variou uma diluição entre os pares de estirpes isogénicas estudadas. A única diferença significativa foi observada para o TAR que apresenta um valor de CMI na estirpe ATCC 12228_EtBr 32x inferior ao da estirpe parental.

3.4.2 Determinação de CMIs dos compostos antimicrobianos na presença dos IEs controlo ou fármacos candidatos

Uma vez determinadas as CMIs de todos os compostos em estudo, foi testada a ação dos IEs controlo ou fármacos candidatos sobre a CMI original dos compostos antimicrobianos e EtBr. Foram considerados potenciais IEs os fármacos na presença dos quais se verificou uma redução da CMI original do composto antimicrobiano $\geq 4x$. Fármacos que promoveram uma redução da CMI em 2x foram classificados como IEs fracos, sendo os restantes considerados como não apresentando atividade inibitória de efluxo. Os IEs controlo e fármacos candidatos foram testados a uma concentração

subinibitória equivalente a $\frac{1}{4}$ CMI, para garantir que não afetam a viabilidade celular (Tabela 11).

Tabela 11. Concentrações usadas na re-determinação das CMIs dos compostos antimicrobianos na presença dos IEs controlo ou fármacos candidatos para as quatro estirpes de *S. epidermidis* em estudo.

	Estirpe	ATCC 12228	ATCC 12228_EtBr	ATCC 35984	ATCC 35984_EtBr
	Composto	Concentração testada (¼ CMI) (mg/L)			
IEs controle	TZ	8			
	CPZ	16	32	16	32
	VER	400			
	RES	20*			
Fármacos candidatos	CLO	512			
	DES	32			
	TOP	800			
	ATO	128			
	AML	32		16	
	SUL	128			
	TAR	32	0,5	32	

(*): Valor inferior a $\frac{1}{4}$ CMI. Valor descrito na literatura (149) e usado devido a limitações de solubilidade da reserpina; IEs: inibidores de efluxo; TZ: tioridazina; CPZ: clorpromazina; VER: verapamil; RES: reserpina; CLO: cloroquina; DES: desipramina; TOP: topiramato; ATO: atovaquone; AML: amlodipina; SUL: sulpirida; TAR; tariquidar.

Em primeiro lugar, foi avaliado o efeito dos IEs controlo sobre a CMI original dos vários compostos antimicrobianos (Tabela 12), procedendo-se à sua classificação em termos de potencial ação inibitória de efluxo.

Tabela 12. CMIs dos compostos antimicrobianos e EtBr na presença dos IEs controlo para as quatro estirpes de *S. epidermidis* em estudo.

Estirpe	ATCC 12228	ATCC 12228_EtBr	ATCC 35984	ATCC 35984_EtBr
CMI (mg/L)				
CIP	0,25	8	0,25	2
+ TZ	0,25	1 ($\downarrow$ 8x)	0,125	1
+ CPZ	0,25	1 ($\downarrow$ 8x)	0,25	1
+ VER	0,25	0,5 ($\downarrow$ 16x)	0,25	0,25 ($\downarrow$ 8x)
+ RES	0,25	8	0,25	2

Tabela 12. Continuação.

Estirpe	ATCC 12228	ATCC 12228_EtBr	ATCC 35984	ATCC 35984_EtBr
CMI (mg/L)				
TET	64	64	2	2
+ TZ	32	64	2	2
+ CPZ	64	64	2	1
+ VER	32	32	2	1
+ RES	64	16 (↓ 4x)	2	2
ERI	0,5	0,25	>2048	>2048
+ TZ	0,5	0,25	2048	>2048
+ CPZ	0,5	0,25	2048	2048
+ VER	0,5	0,25	2048	>2048
+ RES	0,25	0,25	2048	>2048
GEN	0,125	1	128	128
+ TZ	0,25	0,5	64	64
+ CPZ	0,25	0,5	128	64
+ VER	0,125	0,25 (↓ 4x)	32 (↓ 4x)	64
+ RES	0,125	1	128	64
EtBr	0,25	16	0,5	32
+ TZ	0,125	2 (↓ 8x)	0,25	4 (↓ 8x)
+ CPZ	0,125	2 (↓ 8x)	0,5	4 (↓ 8x)
+ VER	0,06 (↓ 4x)	1 (↓ 16x)	0,125 (↓ 4x)	2 (↓ 16x)
+ RES	0,25	16	0,5	32
BAC	1	2	1	4
+ TZ	0,25 (↓ 4x)	1	0,25 (↓ 4x)	2
+ CPZ	0,25 (↓ 4x)	1	0,5	2
+ VER	0,125 (↓ 8x)	0,5 (↓ 4x)	0,125 (↓ 8x)	1 (↓ 4x)
+ RES	1	1	1	4
CHX	1	2	1	2
+ TZ	0,25 (↓ 4x)	1	0,5	2
+ CPZ	0,5	1	1	1
+ VER	0,125 (↓ 8x)	0,5 (↓ 4x)	0,25 (↓ 4x)	1
+ RES	0,5	2	1	2
TPP	8	128	4	128
+ TZ	4	64	2	64
+ CPZ	4	32 (↓ 4x)	2	32 (↓ 4x)
+ VER	4	8 (↓ 16x)	2	16 (↓ 8x)
+ RES	8	128	4	64

Os IEs controlo foram testados a ¼ CMI, correspondendo a: TZ, 8 mg/L; CPZ, 16 mg/L (*S. epidermidis* ATCC 12228 e ATCC 35984) e 32 mg/L (*S. epidermidis* ATCC 12228_EtBr e ATCC 35984_EtBr); VER, 400 mg/L; RES, 20 mg/L. (↓) Fator de redução ≥ 4x CMI do composto antimicrobiano na presença do IE controlo relativamente à CMI original do composto antimicrobiano. CIP: ciprofloxacina; TET: tetraciclina; ERI: eritromicina; GEN: gentamicina; EtBr: brometo de etídio; BAC: cloreto de benzalcónio; CHX: clorexidina; TPP: tetrafenilfosfónio; TZ: tioridazina; CPZ: clorpromazina; VER: verapamil; RES: reserpina.

Confirmou-se a ação inibitória de efluxo dos IEs controlo TZ, CPZ e VER, uma vez que diminuiriam significativamente as CMI's de compostos efluxáveis por NorA, nomeadamente CIP, EtBr e TPP nas estirpes com atividade de efluxo aumentada. Em particular para a CIP, a ação destes três IEs controlo originou uma reversão do fenótipo da resistência à CIP na estirpe *S. epidermidis* ATCC 12228_EtBr. Este efeito apenas foi observado na estirpe *S. epidermidis* ATCC 35984_EtBr na presença de VER. Comparando os IEs controlo, o VER foi aquele que promoveu uma maior diminuição (até 16x) das CMI's dos compostos antimicrobianos efluxáveis, incluindo BAC e CHX. Por sua vez, a RES apenas reduziu 4x a CMI da TET na estirpe ATCC 12228_EtBr.

Quanto aos fármacos candidatos, a sua ação foi testada apenas com compostos antimicrobianos que são substratos de NorA: CIP, EtBr, BAC, CHX e TPP (Tabela 13).

Tabela 13. CMI's dos compostos antimicrobianos e EtBr na presença dos fármacos candidatos para as quatro estirpes de *S. epidermidis* em estudo.

Estirpe	ATCC 12228	ATCC 12228_EtBr	ATCC 35984	ATCC 35984_EtBr
CMI (mg/L)				
CIP	0,25	8	0,25	2
+ CLO	0,25	2 (↓ 4x)	0,125	1
+ DES	0,25	2 (↓ 4x)	0,25	2
+ TOP	0,5	4	0,25	4
+ AML	0,25	1 (↓ 8x)	0,125	1
+ SUL	0,25	4	0,25	2
+ TAR	0,06 (↓ 4x)	4	0,125	0,25 (↓ 8x)
EtBr	0,25	16	0,5	32
+ CLO	0,25	4 (↓ 4x)	0,125 (↓ 4x)	8 (↓ 4x)
+ DES	0,25	8	0,5	16
+ TOP	0,5	16	0,5	32
+ AML	0,125	2 (↓ 8x)	0,25	4 (↓ 8x)
+ SUL	0,25	16	0,5	32
+ TAR	<0,008 (↓ >32x)	8	0,125 (↓ 4x)	1 (↓ 32x)
BAC	1	2	1	4
+ CLO	0,5	1	0,5	2
+ DES	0,5	2	0,5	4
+ TOP	1	1	1	4
+ AML	0,125 (↓ 8x)	1	0,5	2
+ SUL	1	1	1	4
+ TAR	<0,03 (↓ >32x)	2	0,125 (↓ 8x)	1 (↓ 4x)

Tabela 13. Continuação.

Estirpe	ATCC 12228	ATCC 12228_EtBr	ATCC 35984	ATCC 35984_EtBr
CMI (mg/L)				
CHX	1	2	1	2
+ CLO	0,5	2	0,5	2
+ DES	0,5	2	1	2
+ TOP	1	2	1	2
+ AML	0,25 (↓ 4x)	1	0,5	1
+ SUL	0,5	2	0,5	2
+ TAR	0,02 (↓ 64x)	2	0,25 (↓ 4x)	1
TPP	8	128	4	128
+ CLO	8	64	2	64
+ DES	8	128	4	64
+ TOP	8	128	4	128
+ AML	4	16 (↓ 8x)	2	32 (↓ 4x)
+ SUL	8	128	4	128
+ TAR	4	64	2	16 (↓ 8x)

Os fármacos candidatos foram testados a $\frac{1}{4}$ CMI, correspondendo a: DES, 32 mg/L; SUL, 128 mg/L; CLO, 512 mg/L; TOP, 800 mg/L; AML, 32 mg/L (*S. epidermidis* ATCC 12228 e ATCC 12228_EtBr) e 16 mg/L (*S. epidermidis* ATCC 35984 e ATCC35984_EtBr); TAR, 0,5 mg/L (*S. epidermidis* ATCC 12228_EtBr) e 32 mg/L (*S. epidermidis* ATCC 12228, ATCC 35984 e ATCC 35984_EtBr). (↓) Fator de redução $\geq 4x$ CMI do composto antimicrobiano na presença do fármaco candidato relativamente à CMI original do composto antimicrobiano. CIP: ciprofloxacina; EtBr: brometo de etídio; BAC: cloreto de benzalcônio; CHX: clorexidina; TPP: tetrafenilfosfônio; CLO: cloroquina; DES: desipramina; TOP: topiramato; AML: amlodipina; SUL: sulpirida; TAR: tariquidar.

O fármaco TAR reduziu significativamente as CMIs de todos os compostos antimicrobianos à exceção da CHX, mas apenas na estirpe adaptada ATCC 35984_EtBr, sugerindo efeitos distintos nas duas estirpes adaptadas. Em particular, o TAR reverteu o fenótipo de resistência da CIP na estirpe ATCC 35984_EtBr. Apresentou ainda um efeito significativo sobre as CMIs dos vários compostos antimicrobianos nas estirpes parentais, sem efluxo aumentado.

Quanto à AML, este fármaco reduziu significativamente as CMIs do EtBr e TPP em ambas as estirpes adaptadas. Apresentou também efeito sobre a CMI da CIP, mas apenas para *S. epidermidis* ATCC 12228_EtBr, na qual originou reversão do fenótipo de resistência.

Na presença dos fármacos CLO e DES, observou-se uma redução significativa das CMIs de CIP para a estirpe *S. epidermidis* ATCC 12228_EtBr, enquanto apenas o

primeiro fármaco apresentou adicionalmente efeito significativo sobre a CMI de EtBr em ambas as estirpes adaptadas.

Os fármacos SUL e TOP apenas reduziram ligeiramente (2x) as CMIs de alguns compostos antimicrobianos nas estirpes adaptadas. Relativamente ao ATO, a sua difícil solubilização impediu a determinação de todos os valores de CMI, razão pela qual não foi incluído na Tabela 12. No entanto, nos ensaios validados, não demonstrou qualquer efeito sobre as CMIs dos vários compostos antimicrobianos testados.

Em suma, e aplicando os critérios de classificação referidos no início deste ponto, considerou-se os fármacos TAR, AML, CLO e DES como potenciais IEs. Por sua vez, os fármacos TOP e SUL foram considerados potenciais IEs fracos e o ATO como não apresentando atividade inibitória de efluxo.

Os IEs controlo e fármacos candidatos classificados como potenciais IEs foram depois avaliados quanto ao seu sinergismo com os substratos de NorA, CIP, EtBr e TPP.

3.4.3 Avaliação de sinergismo entre compostos através de ensaios de *checkerboard*

O potencial de sinergismo entre compostos foi avaliado apenas para as estirpes adaptadas ao EtBr, utilizando o ensaio de *checkerboard*, realizado por um método simplificado conforme descrito por Bellio *et al.* (144) (ponto 2.2.2.4). Nestes ensaios, é testado o tipo de interação (sinergismo, indiferença, antagonismo), a diferentes combinações de concentrações, entre os compostos antimicrobianos (de 1/256x CMI a 2x CMI) e os IEs controlo/fármacos candidatos (de 1/64x CMI a 1x CMI).

Os dados obtidos para cada combinação de composto antimicrobiano-IE controlo/fármaco candidato foram interpretados por dois métodos descritos em Bonapace *et al.* (146), estando os valores de FICI calculados e respetiva interpretação descritos na Tabela 14.

Tabela 14. Valores de FICI obtidos para cada combinação de composto antimicrobiano-IE controlo/fármaco candidato para as duas estirpes de *S. epidermidis* adaptadas.

Estirpe	ATCC 12228_EtBr		ATCC 35984_EtBr	
Combinação	FICI #1	FICI #2	FICI #1	FICI #2
CIP				
+ TZ	0,744 ●	0,563 ●	0,862 ●	0,531 ●
+ CPZ	0,750 ¹ ●	0,500 ¹ ●	0,916 ●	0,646 ●
+ VER	0,684 ●	0,375 ●	0,645 ●	0,271 ●
+ CLO	0,988 ●	0,875 ●	0,725 ●	0,583 ●
+ DES	0,832 ●	0,500 ●	0,927 ●	0,625 ●
+ AML	0,883 ●	0,500 ●	0,846 ●	0,500 ●
+ TAR	0,949 ¹ ●	0,750 ¹ ●	0,199 ¹ ●	0,156 ¹ ●
EtBr				
+ TZ	0,779 ●	0,500 ●	0,858 ●	0,583 ●
+ CPZ	0,825 ●	0,563 ●	0,865 ●	0,563 ●
+ VER	0,684 ●	0,375 ●	0,590 ●	0,281 ●
+ CLO	1,016 ●	1,016 ●	0,770 ●	0,594 ●
+ DES	0,845 ●	0,625 ●	0,883 ●	0,563 ●
+ AML	0,832 ●	0,500 ●	0,801 ●	0,438 ●
+ TAR	1,074 ¹ ●	1,015 ¹ ●	0,295 ¹ ●	0,094 ¹ ●
TPP				
+ CPZ	0,963 ●	0,750 ●	—	—
+ VER	0,685 ●	0,375 ●	0,638 ●	0,396 ●
+ AML	0,832 ●	0,500 ●	0,792 ●	0,500 ●
+ TAR	1,142 ¹ ●	1,015 ¹ ●	0,413 ¹ ●	0,281 ¹ ●

FICI #1 e #2: FICI obtidos segundo os métodos de análise #1 e #2), respetivamente; (—): ensaio não realizado; (¹): foi realizado apenas um ensaio; (●): sinergismo, $FICI \leq 0,5$; (●): aditividade/indiferença, $0,5 < FICI \leq 4$; Sombreado verde: resultados concordantes entre os dois métodos de análise; CIP: ciprofloxacina; EtBr: brometo de etídio; TPP: tetrafenilfosfónio; TZ: tioridazina; CPZ: clorpromazina; VER: verapamil; CLO: cloroquina; DES: desipramina; AML: amlodipina; TAR: tariquidar. Em alguns ensaios de *checkerboard* validados, os valores de CMI de alguns compostos apresentaram uma variação de uma diluição.

Analisando a Tabela 14, constata-se que, para as mesmas combinações agente antimicrobiano-IE controlo/fármaco candidato, os resultados variaram consoante o método de interpretação usado, atribuindo-se apenas sinergismo em ambos os métodos com TAR.

Comparando os métodos, observa-se a atribuição de mais interações do tipo sinergismo recorrendo ao método 2, embora várias correspondam a um FICI de 0,5. De facto, para ambas as estirpes, os valores de FICI calculados por este método para várias das combinações encontram-se no limiar entre sinergismo e aditividade/indiferença. Por outro lado, o método 1 resultou maioritariamente na atribuição de interações do tipo aditividade/indiferença. Nenhuma das combinações testadas resultou em antagonismo.

Considerando os resultados, observou-se um efeito de sinergismo mais significativo para o IE controlo VER e para o fármaco candidato TAR. Por sua vez, a AML apresentou sinergismo limiar com todos os compostos antimicrobianos. Foram ainda observadas outras combinações de sinergismo limiar, nomeadamente CIP + DES, CIP + CPZ e EtBr + TZ. Por outro lado, não se observou qualquer efeito de sinergismo com o fármaco CLO.

De seguida, analisou-se em maior detalhe o efeito do VER e do TAR, embora para o último apenas tenha sido possível realizar um ensaio. Na estirpe ATCC 35984_EtBr, observou-se sinergismo entre os três compostos antimicrobianos e VER ou TAR até concentrações equivalentes a 1/16x CMI (100 mg/L) ou 1/64x CMI (2 mg/L), respetivamente. Na Figura 10 encontram-se representados ensaios de *checkerboard* obtidos para as combinações EtBr + VER e EtBr + TAR para ATCC 35984_EtBr. Para a outra estirpe adaptada, a concentração mais baixa de VER à qual se observou sinergismo correspondeu a 1/8x CMI (200 mg/L). Para a AML, que apresentou sinergismo com os três compostos antimicrobianos, a concentração mais baixa a que este foi detetado corresponde a 1/8 CMI (16 mg/L) quando em combinação com o EtBr para a estirpe ATCC 35984_EtBr.

		EtBr (mg/L)									
		0	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
TAR (mg/L)	128	1,031	1,031	1,031	0,094	0,063	0,047	0,047	0,047	0,047	0,047
	64	1,031	1,031	1,031	0,094	0,063	0,047	0,047	0,047	0,047	0,047
	32	1,031	1,031	1,031	0,094	0,063	0,047	0,047	0,047	0,047	0,047
	16	1,031	1,031	1,031	0,094	0,063	0,047	0,047	0,047	0,047	0,047
	8	1,031	1,031	1,031	0,094	0,063	0,047	0,047	0,047	0,047	0,047
	4	1,063	1,063	1,063	0,125	0,094	0,078	0,078	0,078	0,078	0,078
	2	1,125	1,125	1,125	0,188	0,156	0,141	0,141	0,141	0,141	0,141
	0	2,000	2,000	2,000	1,063	1,031	1,016	1,016	1,016	1,016	1,016
FICI											
		EtBr (mg/L)									
		0	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
VER (mg/L)	1600	1,008	1,008	1,008	0,508	0,258	0,133	0,070	0,023	0,023	0,023
	800	1,031	1,031	1,031	0,531	0,281	0,156	0,094	0,047	0,047	0,047
	400	1,063	1,063	1,063	0,563	0,313	0,188	0,125	0,078	0,078	0,078
	200	1,125	1,125	1,125	0,625	0,375	0,250	0,188	0,141	0,141	0,141
	100	1,250	1,250	1,250	0,750	0,500	0,375	0,313	0,266	0,266	0,266
	50	1,500	1,500	1,500	1,000	0,750	0,625	0,563	0,516	0,516	0,516
	25	1,500	1,500	1,500	1,000	0,750	0,625	0,563	0,516	0,516	0,516
	0	2,000	2,000	2,000	1,500	1,250	1,125	1,063	1,016	1,016	1,016
FICI											

Figura 10. Exemplos de ensaios de *checkerboard* para as combinações EtBr + TAR e EtBr + VER na estirpe *S. epidermidis* ATCC 35984_EtBr. EtBr: brometo de etídio; TAR: tariquidar; VER: verapamil; Retângulo vermelho: valores de FICI na interface crescimento/ausência de crescimento.

3.4.4 Determinação da atividade antibiofilme

TAR, AML, DES e CLO, potenciais IEs, foram posteriormente avaliados quanto à sua possível ação antibiofilme, pelo método de adesão em microplaca com coloração por violeta de cristal. Foram igualmente testados os IEs controlo TZ, CPZ e VER.

Nestes ensaios foram incluídos os dois pares de estirpes isogénicas. Como já indicado, as estirpes parentais ATCC 12228 e ATCC 35984 diferem na sua capacidade de produção de biofilme, sendo a última considerada um produtor forte de biofilme. Quanto a ATCC 12228, apesar de ser classificada como não produtora de biofilme, trabalhos anteriores do nosso grupo indicam que tem um comportamento variável, sendo, por vezes, classificada como produtora fraca ou moderada de biofilmes (135,137,138). Num destes trabalhos, a capacidade de produção de biofilme destas estirpes isogénicas foi estudada, sendo mostrada uma redução da formação de biofilmes nas estirpes com atividade de efluxo aumentada (135). Os resultados obtidos ao longo deste trabalho suportam esses dados (Figura 11 a Figura 13), sendo detetada uma diminuição significativa da produção de biofilme em ATCC 12228_EtBr (77%) e ATCC 35984_EtBr (15%) relativamente às estirpes parentais, apesar de nesta última esse efeito ser menos evidente.

Nas Figura 11 a Figura 13, encontram-se representados os gráficos correspondentes à avaliação da atividade antibiofilme dos IEs controlo e fármacos candidatos nas estirpes em estudo. Devido à fraca produção de biofilme da estirpe ATCC 12228_EtBr, os dados destes ensaios não são apresentados. Na Tabela 15 são apresentadas as reduções na formação de biofilme em percentagem para as três estirpes.

Tabela 15. Efeito dos fármacos candidatos e IEs controlo na redução de formação de biofilme nas estirpes *S. epidermidis* ATCC 12228, ATCC 35984 e ATCC 35984_EtBr.

		Redução da formação de biofilme (%)								
	Fármacos candidatos	CMI	1/2 CMI	1/4 CMI	1/8 CMI	1/16 CMI	1/32 CMI	1/64 CMI	1/128 CMI	1/256 CMI
ATCC 12228	CLO	-	-	-	-	-	-	-	1	4
	DES	76	44	8	10	13	5	14	19	11
	AML	†	91	66	49	28	12	15	9	8
	TAR	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TZ	†	†	70	45	15	9	6	19	11
	CPZ	†	51	30	25	23	21	21	17	22
	VER	†	75	40	23	10	4	6	16	16

Tabela 15. Continuação.

	Fármacos candidatos	Redução da formação de biofilme (%)								
		CMI	1/2 CMI	1/4 CMI	1/8 CMI	1/16 CMI	1/32 CMI	1/64 CMI	1/128 CMI	1/256 CMI
ATCC 35984	CLO	83	77	19	0	1	0	0	0	3
	DES	91	88	68	28	12	0	0	0	0
	AML	†	35	0	1	0	0	1	1	2
	TAR	5	0	5	5	15	34	2	7	6
	TZ	†	†	76	1	0	0	0	0	0
	CPZ	†	77	57	13	7	6	1	5	1
	VER	†	95	84	55	0	0	0	0	0
ATCC 35984_EtBr	CLO	90	88	58	50	35	32	35	32	37
	DES	94	85	62	60	50	45	45	30	36
	AML	†	76	0	0	0	0	0	0	0
	TAR	-	-	8	33	30	45	16	14	15
	TZ	†	†	11	29	38	35	32	35	33
	CPZ	†	†	85	78	48	26	26	12	10
	VER	†	94	90	69	29	28	9	29	32

CMI: concentração mínima inibitória; CLO: cloroquina; DES: desipramina; AML: amlodipina; TAR: tariquidar; TZ: tioridazina; CPZ: clorpromazina; VER: verapamil; (-): valor não indicado por ter ocorrido formação de biofilme superior ao controlo (sem fármaco/IE controlo); (†): valor não indicado por não ter ocorrido crescimento bacteriano a essa concentração.

Comparando as estirpes parentais, constatou-se que a sua exposição aos três IEs controlo (TZ, CPZ e VER) promoveu uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da produção de biofilme, tendo o VER mostrado efeito mais significativo (até 50% de redução de biofilme), observável até uma concentração equivalente a 1/8x CMI (para ATCC 35984) (Figura 12, Tabela 15). Por sua vez, TZ e CPZ mostraram efeito antibiofilme até 1/4x da sua CMI. Relativamente aos fármacos candidatos, o seu comportamento variou de acordo com a estirpe. Para ATCC 12228, a AML foi o único fármaco que reduziu a formação de biofilme, até uma concentração equivalente a 1/16x CMI (Figura 11, Tabela 15). Já para ATCC 35984, todos os fármacos mostraram efeito antibiofilme à exceção do TAR. Neste caso, a DES mostrou o maior efeito, tendo diminuído significativamente a formação de biofilme até uma concentração de 1/8x da sua CMI (Figura 12, Tabela 15).

A estirpe ATCC 35984_EtBr foi aquela para a qual se verificou uma redução mais significativa da formação de biofilme na presença dos vários compostos. Foi observado um efeito mais pronunciado com os fármacos candidatos CLO e DES, para os quais se

verificou uma redução significativa na produção de biofilme a todas as concentrações testadas (Figura 13, Tabela 15), tendo os IEs controle TZ e VER apresentado um efeito semelhante. Tal como para as restantes estirpes, o TAR não apresentou potencial antibiofilme.

Resumindo, os três IEs controlo apresentam um efeito antibiofilme significativo em todas as estirpes. Relativamente aos fármacos candidatos, a AML mostrou ter o maior potencial antibiofilme apenas na estirpe *S. epidermidis* ATCC 12228, enquanto nas estirpes ATCC 35984 e ATCC 35984_EtBr, a CLO e DES apresentaram o melhor efeito antibiofilme.

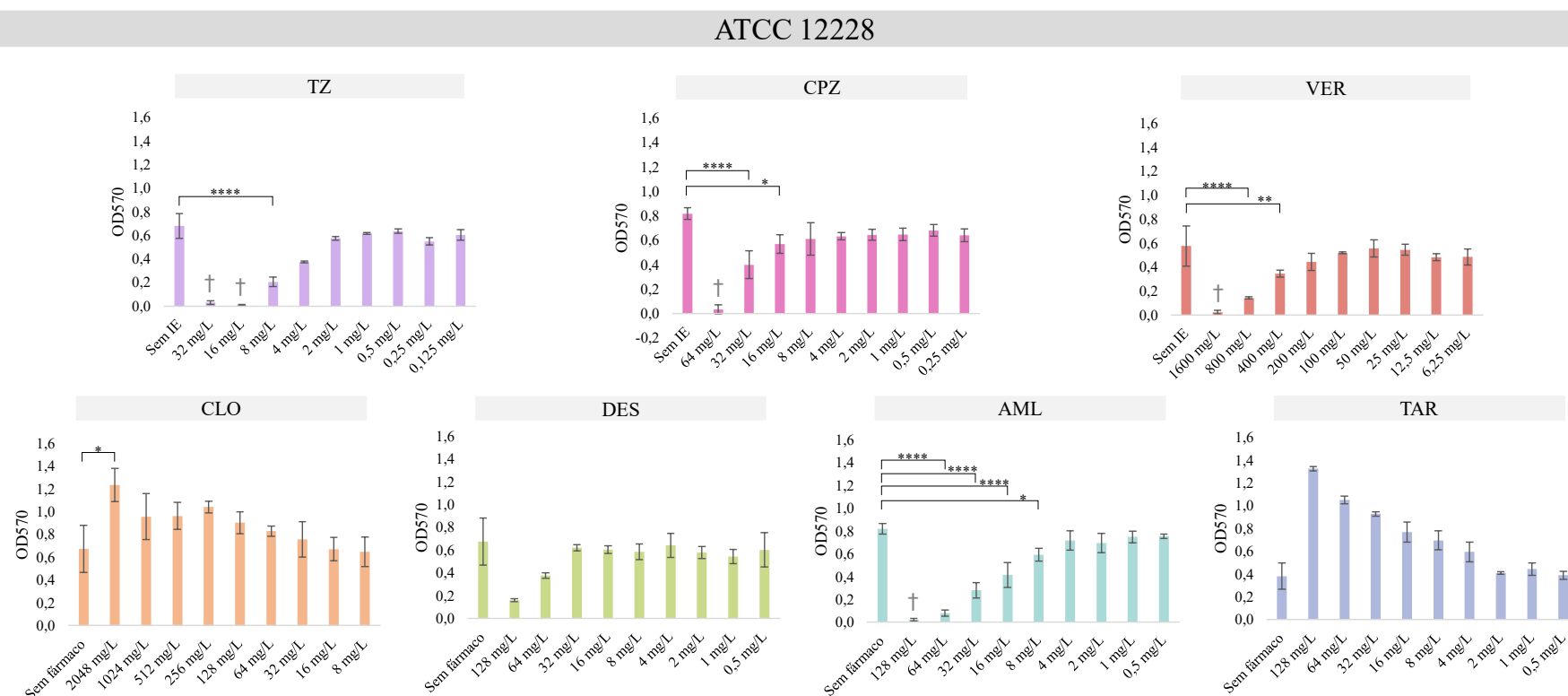


Figura 11. Efeito dos IEs controle e fármacos candidatos na produção de biofilme na estirpe *S. epidermidis* ATCC 12228. OD₅₇₀: densidade óptica a 570 nm; IE: inibidor de efluxo; TZ: tioridazina; CPZ: clorpromazina; VER: verapamil; CLO: cloroquina; DES: desipramina; AML: amlodipina; TAR: tariquidar; (*): p -value < 0,05; (**): p -value < 0,01; (****): p -value < 0,0001; (†): concentrações de IE controle ou fármaco candidato às quais não se observou crescimento bacteriano, não sendo consideradas na análise estatística.

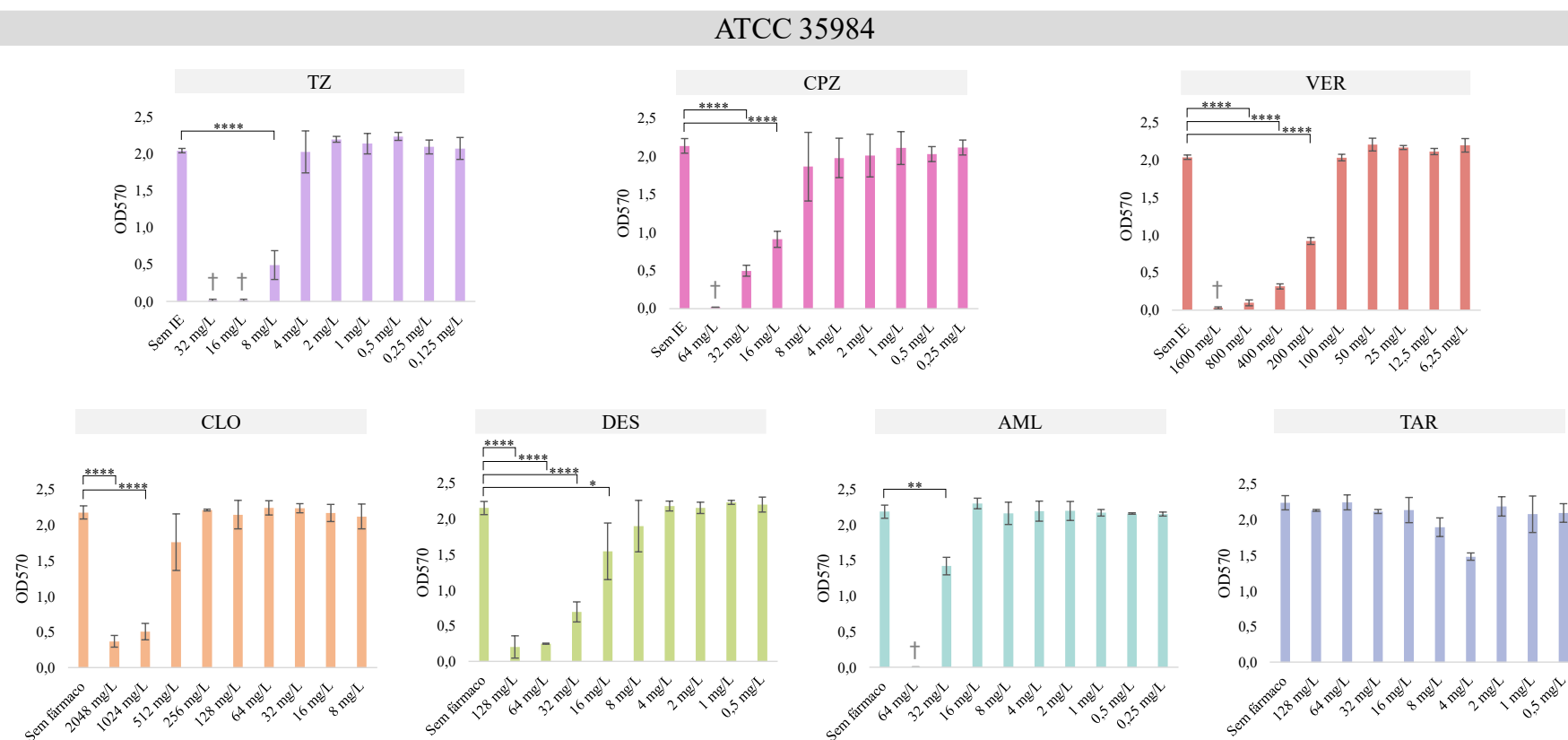


Figura 12. Efeito dos IEs controle e fármacos candidatos na produção de biofilme na estirpe *S. epidermidis* ATCC 35984. OD₅₇₀: densidade óptica a 570 nm; IE: inibidor de efluxo; TZ: tioridazina; CPZ: clorpromazina; VER: verapamil; CLO: cloroquina; DES: desipramina; AML: amlodipina; TAR: tariquidar; (*): p -value < 0,05; (**): p -value < 0,01; (***): p -value < 0,001; (****): p -value < 0,0001; (†): concentrações de IE controle ou fármaco candidato às quais não se observou crescimento bacteriano, não sendo consideradas na análise estatística.

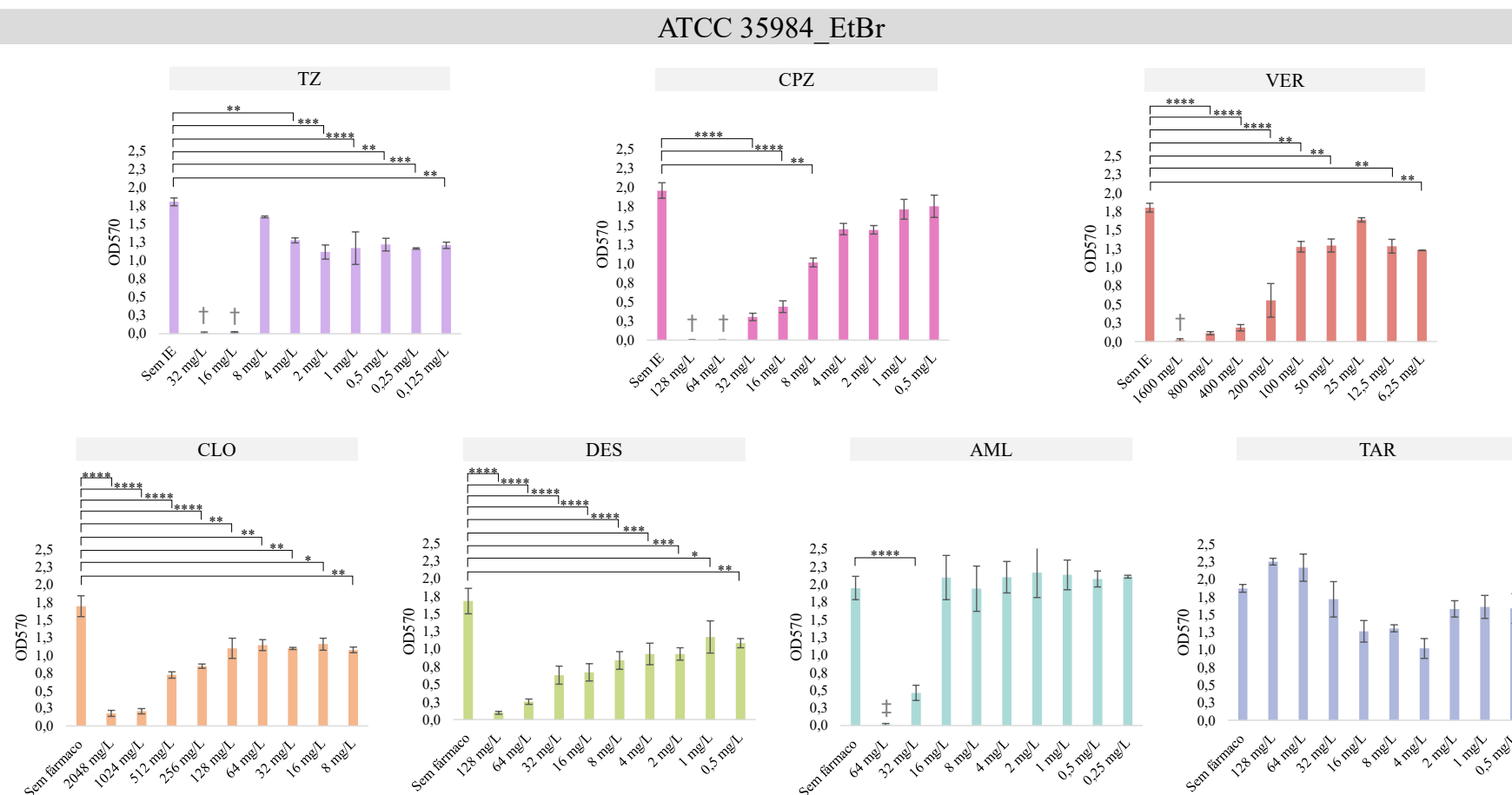


Figura 13. Efeito dos IEs controle e fármacos candidatos na produção de biofilme na estirpe *S. epidermidis* ATCC 35984_EtBr. OD₅₇₀: densidade óptica a 570 nm; IE: inibidor de efluxo; TZ: tioridazina; CPZ: clorpromazina; VER: verapamil; CLO: cloroquina; DES: desipramina; AML: amlodipina; TAR: tariquidar; (*): p -value < 0,05; (**): p -value < 0,01; (***): p -value < 0,001; (****): p -value < 0,0001; (†): concentrações de IE controle ou fármaco candidato às quais não se observou crescimento bacteriano, não sendo consideradas na análise estatística. (‡): concentração de AML à qual o crescimento bacteriano foi significativamente afetado (~50%), não sendo considerada na análise estatística

.

4 Discussão e Conclusões

S. epidermidis é uma bactéria comensal que coloniza a pele de humanos e outros animais, sendo a espécie de estafilococos mais frequentemente isolada em humanos (8). O aumento da utilização de implantes médicos e de populações de indivíduos vulneráveis levou ao aumento das infecções causadas por *S. epidermidis* e à sua emergência como agente patogênico oportunista relevante (6). Ao aumento destas infecções estão também associadas uma maior taxa de morbidade e mortalidade nestes indivíduos (150), bem como um maior custo para os serviços de saúde (151). Para além disso, a frequente resistência aos compostos antimicrobianos nesta espécie (22), aliada à sua capacidade de formar biofilmes, torna as infecções causadas por *S. epidermidis* de difícil tratamento (6).

O principal objetivo desta Dissertação foi a identificação e validação experimental de novos fármacos que atuem sobre o efluxo e a formação de biofilmes em *S. epidermidis*, com potencial efeito modelador sobre a resistência aos compostos antimicrobianos e a virulência nesta espécie.

4.1 Identificação de fármacos candidatos com potencial ação contra o efluxo e biofilmes por quimiogenómica

Neste trabalho, explorou-se uma abordagem *in silico* para o reposicionamento de fármacos contra *S. epidermidis*. O reposicionamento consiste na descoberta de novas aplicações para fármacos já usados na prática clínica (115) e tem sido apresentado como uma estratégia interessante que permite expeditar o processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos, uma vez que os perfis de segurança e farmacocinética dos fármacos candidatos já são conhecidos (152). No entanto, esta abordagem coloca também alguns desafios, tais como: a dificuldade em patentear novos usos para os compostos identificados; o acesso limitado a determinados tipos de dados (por exemplo, de ensaios clínicos) e bibliotecas de compostos químicos; o esgotamento dos fármacos candidatos a reposicionamento, uma vez que o número de novos fármacos cresce devagar ao longo dos anos (153); a dependência da dose, tendo em conta que diferentes doses têm de ser ajustadas a cada doença; a validação dos resultados obtidos *in vitro*, que podem ser

difíceis de reproduzir *in vivo*, devido a diferenças fisiológicas (154); e regulamentações específicas (115).

Neste trabalho foi usada uma estratégia de quimiogenômica baseada no princípio da homologia, em que se assume que duas proteínas homólogas deverão ser alvo do mesmo fármaco. Esta estratégia já foi reportada em vários estudos na identificação de fármacos contra agentes infecciosos, como *S. mansonii*, *Paracoccidioides* spp. e *P. falciparum* e *P. vivax* (114,123,124). A abordagem *in silico* de quimiogenômica aplicada neste trabalho focou-se no efluxo e na formação de biofilmes como alvos.

Os estafilococos apresentam diversos sistemas de efluxo codificados no seu genoma, alguns dos quais bem caracterizados, como a bomba de efluxo NorA, responsável pelo efluxo de fluoroquinolonas, biocidas e corantes (54,155). Desde a identificação do papel desempenhado pelos sistemas de efluxo na resistência aos compostos antimicrobianos, o interesse no estudo de IEs como estratégia para a combater tem vindo a crescer. Em estafilococos, os estudos sobre o efluxo e a identificação de IEs focam-se maioritariamente em *S. aureus*. Nesta espécie, foram identificados vários candidatos para reposicionamento como inibidores de NorA, como aqueles usados como IEs controlo ao longo deste trabalho – TZ e CPZ (129), VER (130) e RES (128); e outros como o omeprazole e o lansoprazole (149). No entanto, os efeitos adversos associados às concentrações necessárias para inibir o efluxo impedem a utilização destes compostos como IEs na prática clínica (5,6).

A abordagem *in silico* seguida neste trabalho permitiu a listagem de 321 transportadores de membrana como potenciais alvos em *S. epidermidis*, incluindo sistemas de efluxo. Esta lista foi compilada com base na informação disponível em TransportDB, a qual apresenta os dados para ATCC 12228 e ATCC 35984. A Tabela 16 mostra uma análise comparativa dos transportadores de membrana codificados nos genomas destas duas estirpes que apresentam uma proporção semelhante de transportadores das diferentes classes. Para este trabalho, optou-se por usar a informação relativa a ATCC 12228, por apresentar um maior número de transportadores de membrana. Nos genomas de ambas as estirpes são encontradas bombas de efluxo das famílias ABC, SMR, MFS e RND, responsáveis pelo transporte de diversos compostos antimicrobianos. Entre estas, destacam-se as bombas de efluxo da família MFS,

nomeadamente a NorA, assim como NorB/C, que partilham parte dos seus substratos com NorA, nomeadamente o EtBr e os biocidas BAC, CHX e TPP (8).

Tabela 16. Número de transportadores codificados nos genomas de *S. epidermidis* ATCC 12228 e ATCC 35984 de acordo com a classe a que pertencem.

Classe de transportador	<i>S. epidermidis</i>	
	ATCC 12228	ATCC 35984
Dependentes de ATP	149	140
Superfamília ABC	26	19
Transportadores secundários	143	141
Superfamília MFS	30	30
Família SMR	2	2
Família MATE	1	0
Família RND	1	2
Canais iónicos	8	8
Sistemas de fosfotransferase	14	14
Não classificados	7	7
Total	321	310

ATP: adenosina trifosfato; ABC: *ATP-binding cassette*; MFS: *major facilitator superfamily*; SMR: *small multidrug resistance*; MATE: *multidrug and toxic-compound extrusion*; RND: *resistance-nodulation-cell division*.

O reposicionamento de fármacos já permitiu também identificar alguns agentes antibiofilme em várias espécies bacterianas incluindo estafilococos, como o piroxicam, o diclofenaco sódico, o ácido acetilsalicílico, o naproxeno (156) e o ibuprofeno (126).

Neste trabalho, foram identificados 39 genes e respetivas proteínas envolvidas na formação de biofilmes em *S. epidermidis*. Entre estes genes, encontram-se *aap* e *aae*, que codificam para proteínas envolvidas na adesão intercelular; os genes do operão *ica*, responsáveis pela produção de PIA; e vários genes envolvidos na regulação do biofilme.

A partir do universo de alvos terapêuticos compilados, a interrogação da base de dados DrugBank permitiu a obtenção de uma lista final de 233 fármacos, distribuídos por 11 superclasses químicas e com indicações terapêuticas variadas, com potencial ação sobre os alvos de *S. epidermidis* identificados. Mais de dois terços dos fármacos candidatos pertence à classe dos compostos orgânicos heterocíclicos ou benzenoides, às quais pertencem também a TZ, CPZ (compostos orgânicos heterocíclicos que atuam sobre o sistema nervoso) e o VER (benzenoide que atua no sistema cardiovascular), usados neste

trabalho como IEs controle. Também de forma semelhante aos IEs controle, as indicações terapêuticas dos fármacos candidatos incidem, maioritariamente sobre o sistema nervoso ou cardiovascular.

4.2 Validação do modelo experimental para avaliação *in vitro* de atividades de inibição de efluxo e antibiofilme

A ação inibitória de efluxo foi testada nas estirpes ATCC 12228 e ATCC 35984, com atividade de efluxo basal, e respetivas estirpes isogénicas adaptadas ao EtBr, nas quais o gene que codifica para a bomba de efluxo NorA se encontra sobreexpresso, apresentando assim atividade de efluxo aumentada mediada por NorA. A avaliação da suscetibilidade das quatro estirpes em estudo, por determinação da CMI, confirmou os fenótipos esperados para as estirpes parentais e adaptadas (ver Tabela 1). Em particular, tal como observado anteriormente (54,135), as estirpes com efluxo aumentado apresentaram valores de CMI mais elevados para os vários substratos da bomba de efluxo NorA, nomeadamente CIP, EtBr, BAC, CHX e TPP. Estes dados corroboram o uso destas estirpes como modelo para o rastreio de compostos inibidores de efluxo.

As estirpes ATCC 12228 e ATCC 35984 foram escolhidas por diferirem na sua capacidade de formar biofilmes, em consequência de apresentarem diferentes mecanismos de produção de biofilme. Enquanto ATCC 35984 apresenta o operão *ica* (77) e uma forte produção de biofilme, dependente de PIA, este operão está ausente em ATCC 12228. Desta forma, a estirpe ATCC 12228 é muitas vezes referida na literatura como não produtora de biofilme. No entanto, sabe-se que forma biofilme por um mecanismo independente de PIA (136), possivelmente mediado por diferentes proteínas como Aap, AtlE, SdrG e/ou Bhp codificadas no genoma desta estirpe. Os dados obtidos neste trabalho corroboram os fenótipos de produção de biofilme nas duas estirpes, confirmando-se que ATCC 12228 apresenta uma formação fraca a moderada de biofilme, em linha com resultados prévios do nosso grupo (135) e de estudos realizados por Garcia-Gutierrez *et al.* e Okajima *et al.* (157,158).

São vários os estudos que defendem uma relação entre a produção de biofilme e a atividade de efluxo (92,96–98), uma hipótese apoiada pela maior expressão de genes que

codificam para bombas de efluxo em células presentes no biofilme e pela inibição da formação de biofilmes por IEs (159). Com base nesta premissa, esperava-se que a produção de biofilme fosse superior nas estirpes com efluxo aumentado. No entanto, verificou-se uma redução da formação de biofilme em relação às estirpes parentais, apesar desta ser mais evidente em ATCC 12228_EtBr, o que poderá ser resultado dos diferentes mecanismos de produção de biofilme nestas estirpes. Estes resultados são concordantes com um estudo realizado anteriormente no laboratório (135).

Por sua vez, os IEs controlo são exemplos de fármacos já propostos para reposicionamento como inibidores da bomba de efluxo NorA (129,130). De facto, estes mesmos IEs controlo, à exceção da TZ, foram identificados aquando da análise bioinformática. O método usado neste trabalho permitiu confirmar a sua ação como IEs, à exceção da RES. Na presença de TZ, CPZ e VER, verificou-se uma redução significativa nas CMI dos compostos efluxados por NorA nas estirpes adaptadas com atividade de efluxo aumentada. A RES apenas afetou a CMI da TET para ATCC 12228_EtBr, que possui a bomba de efluxo Tet(K). Este efeito da RES foi já descrito por diversos estudos (129,160,161).

Neste trabalho, o *screening* da atividade inibitória de efluxo foi feito por avaliação do efeito redutor dos fármacos candidatos sobre a CMI de compostos antimicrobianos efluxáveis. Esta é uma estratégia bem consolidada e amplamente usada na literatura para a identificação preliminar de novos IEs não só em estafilococos (54,129,130), mas também noutras espécies bacterianas (143).

A metodologia dos ensaios de *checkerboard* está bem padronizada na literatura. No entanto, a sua execução é complexa e morosa, uma vez que as soluções de cada combinação testada têm de ser preparadas e distribuídas na placa individualmente. Neste trabalho, foi seguido o protocolo proposto por Bellio *et al.* (144) que diminui o número de soluções a preparar, assim como o tempo necessário, permitindo reduzir o impacto dos problemas anteriormente referidos. A maior limitação destes ensaios reside na interpretação dos resultados experimentais. Estão descritos na literatura diversos métodos que usam critérios diferentes para a determinação do parâmetro FICI (145,162–164). Assim, o tipo de interação atribuído pode variar consoante o método de interpretação usado. Como consequência, pode ter um impacto significativo na seleção ou exclusão de

compostos com uma dada atividade biológica de interesse. Para além disso, torna-se difícil fazer a comparação com resultados obtidos em diferentes estudos descritos na literatura.

Os dois métodos escolhidos neste trabalho para calcular o FICI permitem fazê-lo sem que ocorra ausência total de crescimento em todos os poços de uma determinada concentração de fármaco/composto antimicrobiano. Este critério demonstrou ser uma vantagem neste trabalho, uma vez que ocorreram variações na determinação de CMI dos vários compostos antimicrobianos e fármacos testados nos ensaios de *checkerboard*. Comparativamente ao método #2, que considera como FICI final o menor valor de FICI calculado na interface crescimento/ausência de crescimento, o método #1 tem tendência a originar valores mais elevados de FICI, uma vez que tem em consideração todos os valores de FICI ao longo dessa interface. Consequentemente, usando este método, o número de interações do tipo sinergismo tem tendência a ser menor. Uma vez que se pretende determinar a menor concentração dos compostos a que ocorre sinergismo, o método #2 parece ser o mais adequado. No entanto, salienta-se que, por sua vez, pode também sobrestimar a ocorrência de sinergismo.

O ensaio de adesão em microplaca com coloração por violeta de cristal permite fazer, de forma rápida e pouco dispendiosa, um *screening high throughput* da capacidade de formação de biofilme de um elevado número de estirpes e/ou da atividade antibiofilme de compostos. Neste ensaio, a capacidade de formação de biofilme é medida de forma indireta por quantificação da biomassa total em cada poço da placa. Esta medição pode sobrestimar a produção de biofilme das estirpes testadas, uma vez que nessa biomassa são contabilizadas células aderentes ao fundo do poço, mas também outras células que sedimentam e ficam embebidas na matriz do biofilme. Este problema pode ser resolvido, por exemplo, através da utilização do dispositivo de Calgary, que permite identificar apenas células em biofilme (165). Adicionalmente, o método de cristal de violeta está também sujeito a variações intra- e inter-ensaios, que podem ter origem em vários passos do protocolo, como as lavagens da placa com PBS/água ou o método de fixação das células. Por fim, esta metodologia não permite inferir sobre a viabilidade das células no biofilme. Para tal, podem usar-se outros métodos, como, por exemplo, ensaios com resazurina (166), os quais poderão ser realizados no futuro para complementar os resultados obtidos.

4.3 Avaliação da atividade biológica dos fármacos candidatos

Os sete fármacos candidatos estudados neste trabalho foram escolhidos por pertencerem às duas principais superclasses químicas identificadas e apresentam diversas indicações terapêuticas.

Amlodipina

A AML é uma hidropiridina pertencente à superclasse dos compostos orgânicos heterocíclicos, que atua sobre o sistema cardiovascular como bloqueador dos canais de cálcio (141), inibindo o influxo de cálcio através da membrana das células dos músculos liso e cardíaco, reduzindo a resistência vascular periférica e a pressão sanguínea (167).

A atividade antimicrobiana e inibitória de efluxo deste composto já foi alvo de alguns estudos. Em *S. aureus*, a AML apresenta uma CMI (64 mg/L) semelhante à observada neste trabalho em *S. epidermidis* (64-128 mg/L) (168). O potencial de sinergismo deste fármaco com outros compostos antibióticos e não antibióticos foi também demonstrado em diversas espécies bacterianas como *S. aureus* e *Acinetobacter baumannii*, sendo mostrado o seu sinergismo com aminoglicosídeos e cefalosporinas (169–172). Outros estudos evidenciaram também este potencial sinérgico com compostos antimicrobianos em fungos e parasitas (173–175).

Neste trabalho, a AML apresentou efeito inibitório de efluxo nas estirpes adaptadas em combinação com a CIP, EtBr e TPP. Este efeito foi observado às concentrações de 32 mg/L (78,3 μ M) e 16 mg/L (39,1 μ M). Nos ensaios de *checkerboard*, este fármaco apresentou sinergismo com os mesmos compostos antimicrobianos a partir das mesmas concentrações testadas nos ensaios de microdiluição. Nos ensaios de biofilme, este fármaco inibiu a formação de biofilme em todas as estirpes estudadas, sendo o seu efeito superior em ATCC 35984_EtBr (a partir de 8 mg/L). Conclui-se, portanto, que a amlodipina tem potencial como IE e agente antibiofilme.

Em humanos, a dose recomendada para o uso da amlodipina como anti-hipertensivo é de 10 mg/dia. Uma dose de 50 mg/L no humano adulto equivale a uma concentração plasmática de 10 mg/L (169,176). Esta concentração está próxima dos valores de concentração a partir dos quais se observou efeito sobre o efluxo e a formação de

biofilmes em *S. epidermidis*, pelo que se espera que este fármaco possa ser usado em segurança às concentrações necessárias para se observarem estes efeitos.

Desipramina

A DES é uma benzazepina pertencente à superclasse dos compostos orgânicos heterocíclicos usada no tratamento de depressão, bem como no tratamento e controlo de outras doenças do foro psicológico (141). Exerce a sua ação sobre o sistema nervoso como inibidor dos transportadores de noradrenalina e serotonina, inibindo o *re-uptake* destes neurotransmissores e promovendo o aumento da sua concentração nas sinapses, restaurando os níveis destes neurotransmissores (177).

Num estudo de Ait Chait *et al.*, foi observado um efeito bactericida por parte da DES em estirpes de bactérias comensais do intestino, apresentando CMIs entre 75 e 800 mg/L (178).

Neste trabalho, a DES demonstrou efeito fraco como IE, apenas na estirpe ATCC 12228_EtBr em combinação com a CIP. Nos ensaios de *checkerboard*, também só foi observado sinergismo com CIP na mesma estirpe. No entanto, mostrou ação antibiofilme nas estirpes ATCC 35984 e ATCC 35984_EtBr, tendo reduzido a formação de biofilme a partir de concentrações de 16 mg/L e 0,5 mg/L, respetivamente, valores muito inferiores à sua CMI nestas estirpes (128 mg/L).

Num estudo de Lee *et al.*, a administração de desipramina a 50 μ M induziu a morte de células SH-SY5Y *in vitro* (179). No presente estudo, o efeito antibiofilme deste fármaco foi observado a partir de uma concentração correspondente a 1,9 μ M, um valor muito inferior àquele a que se observou citotoxicidade. Assim, espera-se que o seu uso a esta concentração não produza os mesmos efeitos de toxicidade.

Tariquidar

O TAR é uma benzanilida pertencente à superclasse dos compostos orgânicos heterocíclicos em investigação para o tratamento de cancro ovárico, cancro do pulmão e cancro da mama. É um inibidor específico, não competitivo da P-glicoproteína 1 (também

denominada MDR1, do inglês *multidrug resistance protein 1*), um transportador com diversas funções na célula humana, responsável pela resistência a agentes anticancerígenos. O TAR inibe a atividade de ATPase associada à P-glicoproteína 1, o que sugere que o seu efeito se deva à inibição da ligação do substrato à proteína e/ou inibição da hidrólise de ATP (180).

O efeito do TAR na reversão de multirresistência causada por sobreexpressão do gene que codifica para a P-glicoproteína 1 em células cancerígenas tem sido alvo de vários estudos (181,182). Este fármaco demonstrou ter potencial como IE também em células bacterianas. A exposição ao TAR de uma estirpe de *S. aureus* com sobreexpressão do gene *norA* resultou numa diminuição da CMI da CIP de forma dependente da concentração, revertendo o fenótipo de resistência à CIP dessa estirpe (131).

Os valores de CMI de TAR obtidos (>64 mg/L) neste estudo para *S. epidermidis* foram semelhantes aos valores registados para várias estirpes de diferentes bactérias no estudo de Leitner *et al.* anteriormente referido (131). Todavia, para a estirpe ATCC 12228_EtBr, este valor foi muito inferior (2 mg/L), indicando que o processo de adaptação ao EtBr provocou alterações celulares que potenciam a atividade antimicrobiana deste fármaco. Os dados obtidos neste trabalho confirmam o potencial de TAR como IE, uma vez que apresentou um efeito potente na redução das CMIs dos substratos de NorA testados: CIP, EtBr, BAC, CHX e TPP.

Por outro lado, o tariquidar não apresentou potencial antibiofilme em nenhuma das estirpes testadas. Este fármaco é um potente inibidor da P-glicoproteína 1 a concentrações não tóxicas (180). Um estudo demonstrou a sua segurança em células do músculo liso vascular a concentrações < 1 µM. No entanto, o mesmo estudo revelou que, na concentração de 10 µM, este fármaco afeta a viabilidade destas células (183). Assim, a concentração necessária para inibir o efluxo obtida nesta Dissertação (49,5 µM) parece constituir uma barreira ao seu eventual uso como IE na prática clínica.

Cloroquina

A CLO é uma aminoquinolona pertencente à superclasse dos compostos orgânicos heterocíclicos usada como antiparasitário no tratamento de infeções por *P. vivax*, *P. ovale*,

P. malariae e estirpes suscetíveis de *P. falciparum*. Exerce a sua ação sobre diferentes alvos, sendo um deles a família das glutathionas-S-transferases. Estas proteínas são enzimas de destoxificação de fase II, que catalisam a conjugação da glutathiona a substratos eletrofilicos, originando produtos mais hidrofílicos e menos tóxicos capazes de serem metabolizados e excretados. A CLO inibe a ação destas enzimas, tornando as células vulneráveis à ação de compostos citotóxicos e genotóxicos (184).

Com o surgimento da pandemia de SARS-CoV-2, avaliou-se o uso da CLO para o tratamento de COVID-19 (185,186). O reposicionamento deste fármaco como antiviral foi também descrito por Shiryaev *et al.* para o tratamento e prevenção de infeção pelo vírus Zika (187). Jha *et al.* demonstraram o potencial efeito da CLO no tratamento de infeções por *Acanthamoeba castellanii* (188).

Neste trabalho, a CLO apresentou efeito inibitório de efluxo apenas nas estirpes adaptadas para CIP e EtBr, não tendo demonstrado qualquer efeito de sinergismo com os compostos testados nos ensaios de *checkerboard*. No entanto, evidenciou uma potencial ação antibiofilme, reduzindo a formação de biofilme na estirpe ATCC 35984_EtBr a concentrações muito inferiores à sua CMI.

A CLO apresenta efeito citotóxico, dependente da concentração. Devido à toxicidade e reações adversas decorrentes do uso deste fármaco, foram desenvolvidos derivados, como a hidroxicloroquina, com toxicidade reduzida (186). Como tal, poderá ser interessante avaliar se tais compostos serão capazes de exercer o mesmo efeito que a cloroquina em *S. epidermidis*.

Sulpirida

A SUL é uma benzenossulfonamida pertencente à superclasse dos benzenoides usada no tratamento de esquizofrenia aguda e crónica (141,189). Considerada um antipsicótico atípico, apresenta afinidade específica para os recetores de dopamina (D), preferencialmente os autorrecetores D₂ (189–191). O seu efeito é dependente da dose administrada. Em doses baixas, o bloqueio dos autorrecetores D₂ pré-sinápticos facilita a neurotransmissão dopaminérgica, resultando numa estimulação moderada e apresentando efeito antidepressivo. Quando usada em doses mais elevadas, são

bloqueados os recetores D pós-sinápticos, resultando na diminuição da neurotransmissão e obtendo-se um efeito antipsicótico (189,191).

Num estudo de Mohamed e Soliman, foram sintetizados complexos metálicos com SUL que demonstraram ter atividade biológica contra *S. aureus*, *E. coli*, *Candida albicans* e *Aspergillus flavus* (192). No entanto, neste trabalho, a sulpirida não apresentou efeito como IE, pelo que, o seu efeito na formação de biofilme não foi determinado.

Topiramato

O TOP é um fármaco anticonvulsivo, pertencente à classe dos dioxolopiranos e superclasse dos compostos orgânicos heterocíclicos, usado no controlo de epilepsia e no tratamento e profilaxia de enxaquecas. Este fármaco aumenta a ação do ácido γ -aminobutírico (GABA) nos recetores GABA_A, potenciando a indução do fluxo de cloro para os neurónios (193) e diminuindo o fluxo de sódio e cálcio na membrana pós-sináptica, inibindo os neurónios pós-sinápticos. Esta ação leva à diminuição da neurotransmissão e da hiperexcitabilidade, reduzindo o efeito da enxaqueca (194,195).

Num estudo de Ilhan *et al.* o TOP promoveu uma diminuição no crescimento de mais de dez estirpes bacterianas do microbioma intestinal humano (196).

Neste estudo, o topiramato não exerceu qualquer efeito inibitório de efluxo sobre as estirpes estudadas, pelo que a sua atividade contra a formação de biofilme não foi determinada.

Atovaquone

O ATO é uma naftoquinona pertencente à superclasse dos benzenoides e um análogo estrutural da ubiquinona de protozoários (141,197). Apresenta uma ação de largo espectro contra parasitas como *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium* spp., *Babesia* spp. e *Toxoplasma gondii*. É usado em monoterapia, no tratamento e prevenção de pneumonia por *P. carinii*, e em combinação com outros agentes, no tratamento de malária e babesiose. A ubiquinona é uma proteína mitocondrial envolvida no transporte de eletrões

durante a respiração aeróbia, responsável pela passagem de elétrons para o citocromo *b* (197). Ao inibir a ligação da ubiquinona ao citocromo e consequente formação do complexo *bc₁*, o ATO provoca a disrupção do potencial da membrana mitocondrial, do qual estão dependentes processos fundamentais à sobrevivência do parasita. A perda de função mitocondrial resulta na morte do parasita (197,198).

O efeito do ATO sobre outros microrganismos também já foi estudado. Estudos sugerem que este composto é capaz de reduzir a infecção de células do pulmão pelo vírus SARS-CoV-2 (199) e de inibir a sua replicação (200).

Devido a problemas na solubilização do atovaquone, não foi possível testar o seu efeito como IE ou como agente antibiofilme neste trabalho.

Comparação da atividade biológica dos fármacos candidatos e IEs controle

Uma vez determinadas as atividades biológicas dos vários fármacos candidatos, procedeu-se à comparação destas com as apresentadas pelos IEs controle. A Tabela 17 discrimina as concentrações mais baixas a que os vários compostos apresentaram sinergismo e/ou atividade antibiofilme.

Todos os IEs controle ou fármacos candidatos apresentam as atividades de interesse a concentrações < 250 µM e, para todos eles, a concentração necessária para se observar sinergismo foi bastante superior à requerida para atividade antibiofilme.

De entre todos os compostos testados, o IE controle TZ é aquele que apresenta sinergismo e atividade antibiofilme às concentrações mais baixas (21,6 µM e 0,3 µM, respetivamente). O IE controle CPZ e, em particular, VER, apresentam as atividades desejadas, mas a concentrações mais elevadas.

A AML é o único fármaco a apresentar as duas atividades desejadas e a concentrações semelhantes, nomeadamente, a 39,1 µM (sinergismo) e 19,6 µM (antibiofilme). Este efeito é inferior ao da TZ, mas semelhante ao da CPZ. Relativamente à atividade de sinergismo, o fármaco candidato TAR foi aquele que se mostrou mais eficaz a uma menor concentração (3,1 – 6,2 µM), incluindo em comparação com TZ. Por outro lado, conclui-se que a DES é o fármaco que apresenta maior potencial antibiofilme, sendo este efeito

conseguido a uma baixa concentração (1,9 μM). A CLO apresenta também atividade antibiofilme a uma concentração semelhante à da CPZ.

Tabela 17. Valores mínimos de concentração associados a sinergismo e efeito antibiofilme em *S. epidermidis*.

		Sinergismo			Atividade antibiofilme	
		Compostos antimicrobianos e EtBr	mg/L	μM	mg/L	μM
IEs controle	TZ	CIP	8	21,6	0,125	0,3
		EtBr				
	CPZ	CIP	16	50,2	8	25,1
		EtBr				
		TPP				
	VER	CIP	100	220,0	6,25	13,7
		EtBr	100	220,0		
		TPP	100	220,0		
	Fármacos candidatos	CLO	CIP	-	-	8
EtBr			-	-		
DES		CIP	64	240,3	0,5	1,9
		EtBr	32	120,1		
AML		CIP	32	78,3	8	19,6
		EtBr	16	39,1		
		TPP	16	39,1		
TAR		CIP	2	3,1	-	-
		EtBr	2	3,1		
		TPP	4	6,2		

IEs: inibidores de efluxo; CLO: cloroquina; DES: desipramina; AML: amlodipina; TAR: tariquidar; TZ: tioridazina; CPZ; clorpromazina; VER: verapamil; CIP: ciprofloxacina; EtBr: brometo de etídio; TPP: tetrafenilfosfônio; (-): não se observou efeito de sinergismo ou atividade antibiofilme.

4.4 Perspetivas de trabalho futuro

As técnicas usadas neste trabalho permitiram fazer um *screening* inicial dos compostos com atividade inibitória de efluxo e/ou antibiofilme. No futuro, o primeiro passo será a confirmação dos resultados obtidos nos ensaios realizados para os fármacos que exibiram atividade inibitória de efluxo e/ou antibiofilme. A atividade de inibição de efluxo dos fármacos candidatos poderá ser confirmada através da técnica de fluorometria em tempo real, que permite avaliar a acumulação/efluxo de EtBr através da medição da fluorescência do EtBr no interior das células bacterianas (201). Seria também interessante averiguar o mecanismo de ação dos fármacos identificados e se exercem a sua ação de

forma direta ou indireta sobre NorA. Adicionalmente, as diferenças entre as CMIs dos diferentes substratos da bomba de efluxo NorA entre as estirpes parentais e adaptadas não apresentaram a mesma ordem de grandeza, pelo que, seria interessante estudar a afinidade dos vários compostos para a bomba de efluxo NorA, bem como para outras bombas de efluxo com os mesmos substratos presentes nestas estirpes.

Para os fármacos que demonstraram exercer atividade antibiofilme, seria pertinente confirmar os resultados obtidos, bem como determinar a viabilidade das células do biofilme após a exposição aos fármacos. Tal poderia ser conseguido através, por exemplo, da realização de ensaios com resazurina, como os realizados por Pettit *et al.* (166). Adicionalmente, a técnica usada avalia a capacidade dos vários compostos de inibir a formação de biofilme, mas não fornece informação quanto à capacidade de erradicarem biofilmes maduros. Para tal, seria necessário determinar a concentração mínima de erradicação do biofilme (CMEB) (202). Esta poderá ser uma informação útil, tendo em conta que, em infeções associadas a dispositivos, os biofilmes se encontram já estabelecidos nestes objetos. De igual modo, seria interessante averiguar a razão pela qual o efeito antibiofilme produzido pelos fármacos candidatos em *S. epidermidis* ATCC 35984 se encontra aumentado na estirpe adaptada, quer na gama de concentrações às quais se observa efeito antibiofilme, quer na proporção de biofilme reduzido.

Também será importante avaliar a segurança dos compostos identificados quando usados às concentrações necessárias para inibir o efluxo e/ou a formação de biofilmes. De facto, este é um dos entraves ao uso de IEs na clínica e a razão pela qual, atualmente, nenhum dos IEs já identificados se encontra em uso na clínica.

Este trabalho serviu como estudo piloto para a identificação de fármacos com atividade contra efluxo e formação de biofilmes em *S. epidermidis*. Devido a algumas limitações, como o tempo para realizar esta Dissertação e indisponibilidade de alguns fármacos, apenas uma fração dos 233 fármacos candidatos identificados na análise bioinformática foi analisada *in vitro*. Eventualmente, seria interessante estudar também a atividade dos restantes fármacos identificados. Da mesma forma, os fármacos sem ação inibitória de efluxo, como SUL, ATO e TOP, podem também ser avaliados quanto à sua ação antibiofilme.

4.5 Conclusões

A importância deste trabalho advém da necessidade e urgência de encontrar alternativas eficazes às terapêuticas antimicrobianas atuais. Com o declínio do número de agentes antimicrobianos eficazes no tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes e multirresistentes e o desinvestimento na identificação de novas classes de antibióticos, torna-se fundamental encontrar novas estratégias que permitam identificar novos antibióticos de forma expedita e pouco dispendiosa. A estratégia usada neste trabalho mostrou-se eficaz na identificação de fármacos com potencial ação contra dois determinantes de resistência fundamentais em *S. epidermidis*, o efluxo de compostos antimicrobianos e a formação de biofilmes.

Conclui-se que, dos sete fármacos candidatos estudados, a amlodipina é o único que apresenta efeito inibitório de efluxo e antibiofilme. Estudos futuros poderão confirmar estas atividades biológicas da amlodipina em *S. epidermidis*, assim como elucidar o mecanismo de ação deste fármaco.

Em adição, outros fármacos apresentaram atividades interessantes, nomeadamente o tariquidar, como eficaz inibidor de efluxo, e a cloroquina e desipramina, como potenciais agentes antibiofilme. Estes fármacos, por si só, poderão ser alvo de estudos com vista à identificação dos mecanismos responsáveis por estes efeitos.

No futuro, estes fármacos poderão ser uma mais-valia no tratamento de infecções por *S. epidermidis*, incluindo por estirpes resistentes. A sua utilização pode ser feita numa perspetiva de adjuvante terapêutico, permitindo restaurar a atividade de antibióticos quando administrados em combinação.

Estes compostos poderão também servir de *leads* para o desenvolvimento de novos compostos com ação mais eficaz contra o efluxo e a formação de biofilmes nesta e em outras bactérias de interesse clínico.

5 Referências bibliográficas

1. Parte AC, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff JP, Reimer LC, Göker M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int J Syst Evol Microbiol* [Internet]. 2020 [cited 2022 Jun 17];70:5607–12. Available from: <https://lpsn.dsmz.de/genus/staphylococcus>
2. Becker K, von Eiff C. *Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci*. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 11th ed. ASM Press. 2015.
3. Miragaia M, de Lencastre H. *Staphylocccus aureus* e espécies relacionadas. In: Barroso H, Meliço-Silvestre A, Taveira N, editors. *Microbiologia Médica*, Volume 1. Lisboa: Lidel – Edições Técnicas, Lda.; 2020. p. 228–254.
4. Schleifer K, Bell JA. *Staphylococcus*. In: Whitman WB, editor. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 1st ed. John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust; 2015.
5. Todd EC. Bacteria: *Staphylococcus aureus*. In: Yasmine Motarjemi, editor. *Encyclopedia of Food Safety*, Volume 1. Elsevier Inc.; 2014. p. 530–534.
6. Becker K, Both A, Weißelberg S, Heilmann C, Rohde H. Emergence of coagulase-negative staphylococci. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2020;18:349-366.
7. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28:603–661.
8. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27:870-926.
9. Kleinschmidt S, Huygens F, Faoagali J, Rathnayake IU, Hafner LM. *Staphylococcus epidermidis* as a cause of bacteremia. *Future Microbiol*. 2015;10:1859–1879.
10. Widerström M, Wiström J, Sjöstedt A, Monsen T. Coagulase-negative staphylococci: update on the molecular epidemiology and clinical presentation,

- with a focus on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31:7–20.
11. Rogers KL, Fey PD, Rupp ME. Coagulase-negative staphylococcal infections. Infect Dis Clin North Am. 2009;23:73–98.
 12. Berisha B, Ragnarsson S, Olaison L, Rasmussen M. Microbiological etiology in prosthetic valve endocarditis: a nationwide registry study. J Intern Med. 2022;292:428–437.
 13. Tande AJ, Patel R. Prosthetic joint infection. Clin Microbiol Rev. 2014;27:302–345.
 14. Zeller V, Kerroumi Y, Meyssonier V, Heym B, Metten MA, Desplaces N, et al. Analysis of postoperative and hematogenous prosthetic joint-infection microbiological patterns in a large cohort. J Infect. 2018;76:328–334.
 15. Duszynska W, Rosenthal VD, Szczesny A, Zajackowska K, Fulek M, Tomaszewski J. Device associated –health care associated infections monitoring, prevention and cost assessment at intensive care unit of University Hospital in Poland (2015–2017). BMC Infect Dis. 2020;20:761.
 16. Kato Y, Hagihara M, Kurumiya A, Takahashi T, Sakata M, Shibata Y, et al. Impact of mucosal barrier injury laboratory-confirmed bloodstream infection (MBI-LCBI) on central line-associated bloodstream infections (CLABSIs) in department of hematology at single university hospital in Japan. J Infect Chemother. 2018;24:31–35.
 17. Conen A, Walti LN, Merlo A, Fluckiger U, Battegay M, Trampuz A. Characteristics and treatment outcome of cerebrospinal fluid shunt-associated infections in adults: a retrospective analysis over an 11-year period. Clin Infect Dis. 2008;47:73–82.
 18. Cheung GY, Otto M. Understanding the significance of *Staphylococcus epidermidis* bacteremia in babies and children. Curr Opin Infect Dis. 2010;23:208–216.

19. Claessens LC, Zonnenberg IA, van den Dungen FA, Vermeulen RJ, van Weissenbruch MM. Cerebral ultrasound abnormalities in preterm infants caused by late-onset sepsis. *PLoS One*. 2017;12:e0173227.
20. Baskaran ND, Gan GG, Adeeba K, Sam IC. Bacteremia in patients with febrile neutropenia after chemotherapy at a university medical center in Malaysia. *Int J Infect Dis*. 2007;11:513–507.
21. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Incidence and attributable mortality of healthcare-associated infections in intensive care units in Europe, 2008–2012. Stockholm: ECDC; 2018. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/surveillance-report-HAI-Net-ICU-mortality-2008-2012.pdf>
22. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis*. Stockholm: ECDC; 2018 Nov 8. Disponível em: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/15-10-2018-RR- Staphylococcus%20epidermidis%2C%20Antimicrobial%20resistance-World_ZCS9CS.pdf
23. Rupp ME, Fey PD. *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editores. *Douglas and Bennett's Infectious Disease Essentials*. Philadelphia, PA: Elsevier; 2017.
24. Frank U, Tacconelli E. The Most Frequent Pathogens – Choice of Antibiotics. In: Küster H, editor. *The Daschner Guide to In-Hospital Antibiotic Therapy*. 2nd ed. Springer Medizin; 2012–2013.
25. Hwang AY, Gums JG. The emergence and evolution of antimicrobial resistance: mpact on a global scale. *Bioorg Med Chem*. 2016;24:6440–6445
26. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect Medicin Chem*. 2014;6:25–64.
27. Morehead MS, Scarbrough C. Emergence of global antibiotic resistance. *Prim Care*. 2018;45:467–484.

28. Manyi-Loh C, Mamphweli S, Meyer E, Okoh A. Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: potential public health implications. *Molecules*. 2018;23:795.
29. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:147–179.
30. Maillard JY. Antimicrobial biocides in the healthcare environment: efficacy, usage, policies, and perceived problems. *Ther Clin Risk Manag*. 2005;1:307–320.
31. Wales AD, Davies RH. Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens. *Antibiotics (Basel)*. 2015;4:567–604.
32. Etebu E, Arikekpar I. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int J Appl Microbiol Biotechnol Res*. 2016;4:90–101.
33. McDonnell GE. Chemical disinfection. In: *Antisepsis, disinfection, and sterilization*. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press; 2017.
34. Maillard JY. Bacterial target sites for biocide action. *J Appl Microbiol*. 2002;92 Suppl:16S–27S.
35. Chapman JS. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *Int Biodeterior Biodegradation*. 2003;51:271–276.
36. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology*. 9th ed. Elsevier Inc.; 2021. Capítulo 17, Antibacterial Agents; p. 169–177.
37. Dörr T, Moynihan PJ, Mayer C. Editorial: bacterial cell wall structure and dynamics. *Front Microbiol*. 2019;10:2051.
38. Amyes SG. *Antibacterial Chemotherapy: Theory, Problems and Practice*. New York: Oxford University Press Inc.; 2010. Capítulo 2, Antibiotics – mechanisms of action; p. 7–21.

39. Török E, Moran E, Cooke F. Oxford Handbook of Infectious Diseases and Microbiology. 2nd ed. New York, NY: Oxford University Press; 2017. Capítulo 2, Antibiotics; p. 31–77.
40. Hooper DC, Jacoby GA. Topoisomerase inhibitors: fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. Cold Spring Harb Perspect Med. 2016;6:a025320.
41. Jones IA, Joshi LT. Biocide use in the antimicrobial era: a review. Molecules. 2021;26:2276.
42. Gnanadhas DP, Marathe SA, Chakravortty D. Biocides-resistance, cross-resistance mechanisms and assessment. Expert Opin Investig Drugs. 2013;22:191–206.
43. Al-Adham I, Haddadin R, Collier P. Types of Microbicidal and Microbistatic Agents. In: Fraise AP, Maillard JY, Sattar SA, editores. Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization. 5th ed. John Wiley & Sons, Ltd.; 2013. p. 5–70
44. Wessels S, Ingmer H. Modes of action of three disinfectant active substances: a review. Regul Toxicol Pharmacol. 2013;67:456–467.
45. Gilbert P, Moore LE. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. J Appl Microbiol. 2005;99:703–715.
46. Lambert PA. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. J Appl Microbiol. 2002;92 Suppl:46S–54S.
47. Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. AIMS Microbiol. 2018;4:482–501.
48. Poole K. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. J Appl Microbiol. 2002;92 Suppl:55S–64S.
49. Wright GD. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. Adv Drug Deliv Rev. 2005; 57:1451–1470.
50. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nat Rev Microbiol. 2015;13:42–51.

51. Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R, Pavilonis A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas)*. 2011;47:137–146.
52. Alav I, Sutton JM, Rahman KM. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73:2003–2020.
53. Du D, Wang-Kan X, Neuberger A, van Veen HW, Pos KM, Piddock LJV, et al. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16:523–539.
54. Costa SS, Viveiros M, Pomba C, Couto I. Active antimicrobial efflux in *Staphylococcus epidermidis*: building up of resistance to fluoroquinolones and biocides in a major opportunistic pathogen. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73:320–324.
55. Costa SS, Viveiros M, Amaral L, Couto I. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: an update. *Open Microbiol J*. 2013;7:59–71.
56. Yazdankhah SP, Scheie AA, Høiby EA, Lunestad BT, Heir E, Fotland TØ, et al. Triclosan and antimicrobial resistance in bacteria: an overview. *Microb Drug Resist*. 2006;12:83–90.
57. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56:20–51.
58. Poole K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann Med*. 2007;39:162–176.
59. Piddock LJ. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4:629–636.
60. Paulsen IT. Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Curr Opin Microbiol*. 2003;6:446–451.
61. Dashtbani-Roozbehani A, Brown MH. Efflux pump mediated antimicrobial resistance by staphylococci in health-related environments: challenges and the quest for inhibition. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10:1502.

62. Juárez-Verdayes MA, Parra-Ortega B, Hernández-Rodríguez C, Betanzos-Cabrera G, Rodríguez-Martínez S, Cancino-Díaz ME, et al. Identification and expression of *nor* efflux family genes in *Staphylococcus epidermidis* that act against gatifloxacin. *Microb Pathog*. 2012;52:318–325.
63. Otto M. Staphylococcal biofilms. *Microbiol Spectr*. 2018;6:10.
64. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284:1318–1322.
65. Otto M. Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;322:207–228.
66. Crouzet M, Le Senechal C, Brözel VS, Costaglioli P, Barthe C, Bonneau M, et al. Exploring early steps in biofilm formation: set-up of an experimental system for molecular studies. *BMC Microbiol*. 2014;14:253.
67. Gomes F, Teixeira P, Oliveira R. Mini-review: *Staphylococcus epidermidis* as the most frequent cause of nosocomial infections: old and new fighting strategies. *Biofouling*. 2013;30:131–141.
68. Schilcher K, Horswill AR. Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2020;84:e00026-19.
69. Heilmann C, Hussain M, Peters G, Götz F. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol*. 1997;24:1013–1024.
70. Büttner H, Mack D, Rohde H, Lee C, Renata Arciola C. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Front Cell Infect Microbiol*. 2015;5:14.
71. Beck S, Sehl C, Voortmann S, Verhasselt HL, Edwards MJ, Buer J, et al. Sphingosine is able to prevent and eliminate *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation on different orthopedic implant materials *in vitro*. *J Mol Med (Berl)*. 2020;98:209–219.

72. Otto M. *Staphylococcus epidermidis* pathogenesis. *Methods Mol Biol.* 2014;1106:17–31.
73. Fey PD, Olson ME. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiol.* 2010;5:917–933.
74. Paharik AE, Kotasinska M, Both A, Hoang TM, Büttner H, Roy P, et al. The metalloprotease SepA governs processing of accumulation-associated protein and shapes intercellular adhesive surface properties in *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol.* 2017;103:860–874.
75. Rohde H, Burdelski C, Bartscht K, Hussain M, Buck F, Horstkotte MA, et al. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol Microbiol.* 2005;55:1883–1895.
76. Piette A, Verschraegen G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Vet Microbiol.* 2009;134:45–54.
77. Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongodin EF, DeBoy RT, Ravel J, et al. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol.* 2005;187:2426–2438.
78. Post V, Harris LG, Morgenstern M, Mageiros L, Hitchings MD, Méric G, et al. Comparative genomics study of *Staphylococcus epidermidis* isolates from orthopedic-device-related infections correlated with patient outcome. *J Clin Microbiol.* 2017;55:3089–3103.
79. Rohde H, Burandt EC, Siemssen N, Frommelt L, Burdelski C, Wurster S, et al. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials.* 2007;28:1711–1720.

80. Salgueiro VC, Iorio NL, Ferreira MC, Chamon RC, dos Santos KR. Methicillin resistance and virulence genes in invasive and nasal *Staphylococcus epidermidis* isolates from neonates. BMC Microbiol. 2017;17:15.
81. Ahmad S, Rahman H, Qasim M, Nawab J, Alzahrani KJ, Alsharif KF, et al. *Staphylococcus epidermidis* pathogenesis: interplay of *icaADBC* operon and MSCRAMMs in biofilm formation of isolates from pediatric bacteremia in Peshawar, Pakistan. Medicina (Kaunas). 2022;58:1510.
82. Nguyen HTT, Nguyen TH, Otto M. The staphylococcal exopolysaccharide PIA – biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. Comput Struct Biotechnol J. 2020;18:3324–3334.
83. Dice B, Stoodley P, Buchinsky F, Metha N, Ehrlich GD, Hu FZ. Biofilm formation by *ica*-positive and *ica*-negative strains of *Staphylococcus epidermidis* *in vitro*. Biofouling. 2009;25:367–375.
84. Le KY, Villaruz AE, Zheng Y, He L, Fisher EL, Nguyen TH, et al. Role of phenol-soluble modulins in *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and infection of indwelling medical devices. J Mol Biol. 2019;431:3015–3027.
85. Otto M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. Annu Ver Med. 2013;64:175–188.
86. Martínez-García S, Rodríguez-Martínez S, Cancino-Díaz ME, Cancino-Díaz JC. Extracellular proteases of *Staphylococcus epidermidis*: roles as virulence factors and their participation in biofilm. APMIS. 2018;126:177–185.
87. Tang JN, Kang MS, Chen HC, Shi XM, Zhou R, Chen J, et al. The staphylococcal nuclease prevents biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and other biofilm-forming bacteria. Sci China Life Sci. 2011;54:863–869.
88. Kaplan JB, Velliyagounder K, Ragunath C, Rohde H, Mack D, Knobloch JK, et al. Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. J Bacteriol. 2004;186:8213–8220.

89. Berne C, Kysela DT, Brun YV. A bacterial extracellular DNA inhibits settling of motile progeny cells within a biofilm. *Mol Microbiol.* 2010;77:815–829.
90. Raad I, Alrahwani A, Rolston K. *Staphylococcus epidermidis*: emerging resistance and need for alternative agents. *Clin Infect Dis.* 1998;26:1182–1187.
91. Rani SA, Pitts B, Beyenal H, Veluchamy RA, Lewandowski Z, Davison WM, et al. Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. *J Bacteriol.* 2007;189:4223–4233.
92. Yao Y, Sturdevant DE, Otto M. Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms. *J Infect Dis.* 2005;191:289–298.
93. Narayana SV, Srihari SV. A review on surface modifications and coatings on implants to prevent biofilm. *Regen Eng Transl Med.* 2020;6:330–346.
94. Abe K, Nomura N, Suzuki S. Biofilms: hot spots of horizontal gene transfer (HGT) in aquatic environments, with a focus on a new HGT mechanism. *FEMS Microbiol Ecol.* 2021;96:fiaa031.
95. Soto SM. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence.* 2013;4:223–229.
96. Kvist M, Hancock V, Klemm P. Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:7376–7382.
97. Resch A, Rosenstein R, Nerz C, Götz F. Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:2663–2676.
98. Hancock V, Klemm P. Global gene expression profiling of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* during biofilm growth in human urine. *Infect Immun.* 2007;75:966–976.

99. Türkel İ, Yıldırım T, Yazgan B, Bilgin M, Başbulut E. Relationship between antibiotic resistance, efflux pumps, and biofilm formation in extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. J Chemother. 2018;30:354–363.
100. de Kievit TR, Parkins MD, Gillis RJ, Srikumar R, Ceri H, Poole K, et al. Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45:1761–1770.
101. Baugh S, Ekanayaka AS, Piddock LJ, Webber MA. Loss of or inhibition of all multidrug resistance efflux pumps of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium results in impaired ability to form a biofilm. J Antimicrob Chemother. 2012;67:2409–2417
102. Tang M, Wei X, Wan X, Ding Z, Ding Y, Liu J. The role and relationship with efflux pump of biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. Microb Pathog. 2020;147:104244.
103. Vikram A, Bomberger JM, Bibby KJ. Efflux as a glutaraldehyde resistance mechanism in *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59:3433–3440.
104. Dawan J, Li Y, Lu F, He X, Ahn J. Role of efflux pump-mediated antibiotic resistance in quorum sensing-regulated biofilm formation by *Salmonella* Typhimurium. Pathogens. 2022;11:147.
105. AlMatar M, Albarri O, Makky EA, Köksal F. Efflux pump inhibitors: new updates. Pharmacol Rep. 2021;73:1–16.
106. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) – Annual Epidemiological Report 2020. Stockholm; ECDC; 2022 Jul. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER-EARS-Net-2020.pdf>
107. Pickens CI, Wunderink RG. Principles and practice of antibiotic stewardship in the ICU. Chest. 2019;156:163–171.

108. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) – Annual Epidemiological Report 2019. Stockholm: ECDC; 2020 Nov. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/surveillance-antimicrobial-resistance-Europe-2019.pdf>
109. Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog Glob Health*. 2015;109:309–318.
110. WHO Regional Office for Europe/European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2020 – 2022 data [Internet]. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2022. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Joint-WHO-ECDC-AMR-report-2022.pdf>
111. Condell O, Iversen C, Cooney S, Power KA, Walsh C, Burgess C, et al. Efficacy of biocides used in the modern food industry to control *Salmonella enterica*, and links between biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobial compounds. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78:3087–3097.
112. Iskandar K, Murugaiyan J, Hammoudi Halat D, Hage SE, Chibabhai V, Adukkadukkam S, et al. Antibiotic discovery and resistance: the chase and the race. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11:182.
113. Theuretzbacher U, Outtersen K, Engel A, Karlén A. The global preclinical antibacterial pipeline. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18:275–285.
114. Neves BJ, Braga RC, Bezerra JCB, Cravo PVL, Andrade CH. *In silico* repositioning-chemogenomics strategy identifies new drugs with potential activity against multiple life stages of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9:e3435.
115. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18:41–58.

116. Jourdan JP, Bureau R, Rochais C, Dallemagne P. Drug repositioning: a brief overview. *J Pharm Pharmacol*. 2020;72:1145–1151.
117. Jones LH, Bunnage ME. Applications of chemogenomic library screening in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16:285–296.
118. Gagna CE, Winokur D, Lambert WC. Cell biology, chemogenomics and chemoproteomics. *Cell Biol Int*. 2004;28:755–764.
119. Rognan D. Chemogenomic approaches to rational drug design. *Br J Pharmacol*. 2007;152:38–52.
120. Bredel M, Jacoby E. Chemogenomics: an emerging strategy for rapid target and drug discovery. *Nat Rev Genet*. 2004;5:262–275.
121. Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3:673–683.
122. Rodrigues L, Wagner D, Viveiros M, Sampaio D, Couto I, Vavra M, et al. Thioridazine and chlorpromazine inhibition of ethidium bromide efflux in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium smegmatis*. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61:1076–1082.
123. Ferreira LT, Rodrigues J, Cassiano GC, Tavella TA, Tomaz KCP, Baia-Da-Silva DC, et al. Computational chemogenomics drug repositioning strategy enables the discovery of epirubicin as a new repurposed hit for *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64:e02041–19.
124. de Oliveira AA, Neves BJ, Silva LD, Soares CM, Andrade CH, Pereira M. Drug repurposing for paracoccidioidomycosis through a computational chemogenomics framework. *Front Microbiol*. 2019;10:1301.
125. Miró-Canturri A, Vila-Domínguez A, Caretero-Ledesma M, Ayerbe-Algaba R, Pachón J, Jiménez-Mejías ME, et al. Repurposing of the tamoxifen metabolites to treat methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* infections. *Microbiol Spectr*. 2021;9:e0040321.

126. Oliveira IM, Borges A, Borges F, Simões M. Repurposing ibuprofen to control *Staphylococcus aureus* biofilms. *Eur J Med Chem*. 2019;166:197–205.
127. Rodrigues L, Cravo P, Viveiros M. Efflux pump inhibitors as a promising adjunct therapy against drug resistant tuberculosis: a new strategy to revisit mycobacterial targets and repurpose old drugs. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2020;18:741–757.
128. Neyfakh AA, Borsch CM, Kaatz GW. Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37:128–129.
129. Kaatz GW, Moudgal VV, Seo SM, Kristiansen JE. Phenothiazines and thioxanthenes inhibit multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:719–726.
130. Couto I, Costa SS, Viveiros M, Martins M, Amaral L. Efflux-mediated response of *Staphylococcus aureus* exposed to ethidium bromide. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62:504–513.
131. Leitner I, Nemeth J, Feurstein T, Abraham A, Matzneller P, Lagler H, et al. The third-generation P-glycoprotein inhibitor tariquidar may overcome bacterial multidrug resistance by increasing intracellular drug concentration. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66:834–839.
132. Sabatini S, Gosetto F, Serritella S, Manfroni G, Tabarrini O, Iraci N, et al. Pyrazolo[4,3-c][1,2]benzothiazines 5,5-dioxide: a promising new class of *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors. *J Med Chem*. 2012;55:3568–3572.
133. Zimmermann S, Klinger-Strobel M, Bohnert JA, Wendler S, Rödel J, Pletz MW, et al. Clinically approved drugs inhibit the *Staphylococcus aureus* multidrug NorA efflux pump and reduce biofilm formation. *Front Microbiol*. 2019;10:2762.
134. Mahey N, Tambat R, Chandal N, Verma DK, Thakur KG, Nandanwar H. Repurposing approved drugs as fluoroquinolone potentiators to overcome efflux pump resistance in *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Spectr*. 2021;9:e0095121.

135. Santos CM. Influência da atividade de efluxo na produção de biofilme por *Staphylococcus epidermidis* [Dissertação]. Lisboa: Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade NOVA de Lisboa; 2017.
136. Zhang YQ, Ren SX, Li HL, Wang YX, Fu G, Yang J, et al. Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol Microbiol.* 2003;49:1577–1593.
137. Oliveira KF de. Avaliação do potencial de virulência de *Staphylococcus aureus* associados a infecções de pele e tecidos moles [Dissertação]. Caparica: Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa; 2021.
138. Andrade M. Estudo do potencial de virulência de *Staphylococcus pseudintermedius* associado a infecções de pele em animais de companhia [Dissertação]. Lisboa: Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade NOVA de Lisboa; 2021.
139. Raue S, Fan SH, Rosenstein R, Zabel S, Luqman A, Nieselt K, et al. The genome of *Staphylococcus epidermidis* O47. *Front Microbiol.* 2020;11:2061.
140. Elbourne LDH, Tetu SG, Hassan KA, Paulsen IT. TransportDB 2.0: a database for exploring membrane transporters in sequenced genomes from all domains of life. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:D320-D324.
141. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 2018;46:D1074-D1082.
142. Schmitz FJ, Fluit AC, Lückefahr M, Engler B, Hofmann B, Verhoef J, et al. The effect of reserpine, an inhibitor of multidrug efflux pumps, on the *in vitro* activities of ciprofloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 1998;42:807–810.
143. Costa SS, Lopes E, Azzali E, Machado D, Coelho T, da Silva PE, et al. An experimental model for the rapid screening of compounds with potential use against mycobacteria. *Assay Drug Dev Technol.* 2016;14:524–534.

144. Bellio P, Fagnani L, Nazzicone L, Celenza G. New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay. *MethodsX*. 2021;8:101543.
145. den Hollander JG, Mouton JW, Verbrugh HA. Use of pharmacodynamic parameters to predict efficacy of combination therapy by using fractional inhibitory concentration kinetics. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42:744–748.
146. Bonapace CR, Bosso JA, Friedrich LV, White RL. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002;44:363–366.
147. Pillai SK, Moellering RC, Eliopoulos GM. Antimicrobial combinations. In: Lorian V, editor. *Antibiotics in laboratory medicine*. 5th ed. Baltimore: The Williams & Wilkins Co.; 2005. p. 365–440.
148. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 13.0. EUCAST; 2023. Disponível em: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_13.0_Breakpoint_Tables.pdf
149. Aeschlimann JR, Dresser LD, Kaatz GW, Rybak MJ. Effects of NorA Inhibitors on *in vitro* antibacterial activities and postantibiotic effects of levofloxacin, ciprofloxacin, and norfloxacin in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43:335–340.
150. França A, Gaio V, Lopes N, Melo LDR. Virulence factors in coagulase-negative staphylococci. *Pathogens*. 2021;10:170.
151. Otto M. *Staphylococcus epidermidis*--the “accidental” pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7:555–567.
152. Hua Y, Dai X, Xu Y, Xing G, Liu H, Lu T, et al. Drug repositioning: progress and challenges in drug discovery for various diseases. *Eur J Med Chem*. 2022;234:114239.

153. Talevi A, Bellera CL. Challenges and opportunities with drug repurposing: finding strategies to find alternative uses of therapeutics. *Expert Opin Drug Discov.* 2020;15:397–401.
154. Ko Y. Computational drug repositioning: current progress and challenges. *Appl Sci.* 2020;10:5076.
155. Lamut A, Peterlin Mašič L, Kikelj D, Tomašič T. Efflux pump inhibitors of clinically relevant multidrug resistant bacteria. *Med Res Rev.* 2019;39:2460–2504.
156. Leão C, Borges A, Simões M. NSAIDs as a drug repurposing strategy for biofilm control. *Antibiotics (Basel).* 2020;9:591.
157. Garcia-Gutierrez E, Walsh CJ, Sayavedra L, Diaz-Calvo T, Thapa D, Ruas-Madiedo P, et al. Genotypic and phenotypic characterization of fecal *Staphylococcus epidermidis* isolates suggests plasticity to adapt to different human body sites. *Front Microbiol.* 2020;11:688.
158. Okajima Y, Kobayakawa S, Tsuji A, Tochikubo T. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* on intraocular lens material. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:2971–2975.
159. Pasqua M, Grossi M, Zennaro A, Fanelli G, Micheli G, Barras F, et al. The varied role of efflux pumps of the MFS family in the interplay of bacteria with animal and plant cells. *Microorganisms.* 2019;7:285.
160. Smith EC, Kaatz GW, Seo SM, Wareham N, Williamson EM, Gibbons S. The phenolic diterpene totarol inhibits multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:4480–4483.
161. Gibbons S, Udo EE. The effect of reserpine, a modulator of multidrug efflux pumps, on the *in vitro* activity of tetracycline against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) possessing the *tet(K)* determinant. *Phytother Res.* 2000;14:139–140.
162. Eliopoulos GM, Moellering RC. Antimicrobial combinations. In: Lorian V, editor. *Antibiotics in laboratory medicine*. 4th ed. Baltimore: The Williams & Wilkins Co.; 1996. p. 330–96.

163. Marymont JH, Marymont J. Laboratory evaluation of antibiotic combinations: a review of methods and problems. *Lab Med*. 1981;12:47–55
164. Hallander HO, Dornbusch K, Gezelius L, Jacobson K, Karlsson I. Synergism between aminoglycosides and cephalosporins with antipseudomonal activity: interaction index and killing curve method. *Antimicrob Agents Chemother*. 1982;22:743–752.
165. Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR, et al. Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol*. 2017;43:313–351.
166. Pettit RK, Weber CA, Kean MJ, Hoffmann H, Pettit GR, Tan R, et al. Microplate Alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:2612–2617.
167. Norvasc (amlodipine besylate) Tablets. New York (NY): Pfizer Inc; 2005.
168. Boyd NK, Lee GC, Teng C, Frei CR. *In vitro* activity of non-antibiotic drugs against *Staphylococcus aureus* clinical strains. *J Glob Antimicrob Resist*. 2021;27:167–171.
169. Li Yj, Pan Cz, Zhao Zw, Zhao Zx, Chen Hl, Lu Wb. Effects of a combination of amlodipine and imipenem on 42 clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* obtained from a teaching hospital in Guangzhou, China. *MBC Infect Dis*. 2013;13:548.
170. Asok Kumar K, Mazumdar K, Dutta NK, Karak P, Dastidar SG, Ray R. Evaluation of synergism between the aminoglycoside antibiotic streptomycin and the cardiovascular agent amlodipine. *Biol Pharm Bull*. 2004;27:1116–1120.
171. Hu C, Li Y, Zhao Z, Wei S, Zhao Z, Chen H, et al. *In vitro* synergistic effect of amlodipine and imipenem on the expression of the *AdeABC* efflux pump in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One*. 2018;13:e0198061.
172. Yi Z, Pei Z, Xiaoyan M. Evaluation of amlodipine inhibition and antimicrobial effects. *Int J Pharm Chem*. 2019;5:12–14.

173. Spader TB, Ramírez-Castrillón M, Valente P, Alves SH, Severo LC. *In vitro* interactions of amphotericin B combined with non-antifungal agents against *Rhodotorula mucilaginosa* strains. *Mycopathologia*. 2019;184:35–43.
174. Pereira MR, Henrich PP, Sidhu AB, Johnson D, Hardink J, van Deusen J, et al. *In vivo* and *in vitro* antimalarial properties of azithromycin-chloroquine combinations that include the resistance reversal agent amlodipine. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55:3115–3124.
175. Liu S, Yue L, Gu W, Li X, Zhang L, Sun S. Synergistic effect of fluconazole and calcium channel blockers against resistant *Candida albicans*. *PLoS One*. 2016;11:e0150859.
176. Mazumdar K, Asok Kumar K, Dutta NK. Potential role of the cardiovascular non-antibiotic (helper compound) amlodipine in the treatment of microbial infections: scope and hope for the future. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;36:295–302.
177. Frolkis A, Knox C, Lim E, Jewison T, Law V, Hau DD, et al. SMPDB: The Small Molecule Pathway Database. *Nucleic Acids Res*. 2010;38:D480–D487.
178. Ait Chait Y, Mottawea W, Tompkins TA, Hammami R. Unravelling the antimicrobial action of antidepressants on gut commensal microbes. *Sci Rep*. 2020;10:17878.
179. Lee MY, Hong S, Kim N, Shin KS, Kang SJ. Tricyclic antidepressants amitriptyline and desipramine induced neurotoxicity associated with Parkinson's disease. *Mol Cells*. 2015;38:734–740.
180. Fox E, Bates SE. Tariquidar (XR9576): a P-glycoprotein drug efflux pump inhibitor. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2007;7:447–459.
181. Pan Y, Zhou S, Li Y, Parshad B, Li W, Haag R. Novel dendritic polyglycerol-conjugated, mesoporous silica-based targeting nanocarriers for co-delivery of doxorubicin and tariquidar to overcome multidrug resistance in breast cancer stem cells. *J Control Release*. 2021;330:1106–1117.
182. Patil Y, Sadhukha T, Ma L, Panyam J. Nanoparticle-mediated simultaneous and targeted delivery of paclitaxel and tariquidar overcomes tumor drug resistance. *J Control Release*. 2009;136:21–29.

183. Durante M, Frosini M, Fusi F, Neri A, Sticozzi C, Saponara S. *In vitro* vascular toxicity of tariquidar, a potential tool for *in vivo* PET studies. *Toxicol In Vitro*. 2017;44:241–247.
184. Hiller N, Fritz-Wolf K, Deponte M, Wende W, Zimmermann H, Becker K. *Plasmodium falciparum* glutathione S-transferase – structural and mechanistic studies on ligand binding and enzyme inhibition. *Protein Sci*. 2006;15:281–289.
185. Adeoye AO, Oso BJ, Olaoye IF, Tijjani H, Adebayo AI. Repurposing of chloroquine and some clinically approved antiviral drugs as effective therapeutics to prevent cellular entry and replication of coronavirus. *J Biomol Struct Dyn*. 2021;39:3469–3479.
186. Kamat S, Kumari M. Repurposing chloroquine against multiple diseases with special attention to SARS-CoV-2 and associated toxicity. *Front Pharmacol*. 2021;12:576093.
187. Shiryaev SA, Mesci P, Pinto A, Fernandes I, Sheets N, Shresta S, et al. Repurposing of the anti-malaria drug chloroquine for Zika virus treatment and prophylaxis. *Sci Rep*. 2017;7:15771.
188. Jha BK, Jung HJ, Seo I, Kim HA, Suh S il, Suh MH, et al. Chloroquine has a cytotoxic effect on *Acanthamoeba* encystation through modulation of autophagy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:6235–6241.
189. Mauri MC, Bravin S, Bitetto A, Rudelli R, Invernizzi G. A risk-benefit assessment of sulpiride in the treatment of schizophrenia. *Drug Saf*. 1996;14:288–298.
190. Caley CF, Weber SS. Sulpiride: an antipsychotic with selective dopaminergic antagonist properties. *Ann Pharmacother*. 1995;29:152–160.
191. Serra G, Forgione A, D'Aquila PS, Collu M, Fratta W, Gessa GL. Possible mechanism of antidepressant effect of L-sulpiride. *Clin Neuropharmacol*. 1990;13:S76–S83.
192. Mohamed GG, Soliman MH. Synthesis, spectroscopic and thermal characterization of sulpiride complexes of iron, manganese, copper, cobalt, nickel,

- and zinc salts. Antibacterial and antifungal activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2010;76:341–347.
193. Topamax Sprinkle Capsules. Raritan, NJ: McNeil Pharmaceutical, Inc.
194. Wenzel RG, Schwarz K, Padiyara RS. Topiramate for migraine prevention. *Pharmacotherapy.* 2006;26:375–387.
195. Mula M, Cavanna AE, Monaco F. Psychopharmacology of topiramate: from epilepsy to bipolar disorder. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2006;2:475–488.
196. Ilhan ZE, Brochard V, Lapaque N, Auvin S, Lepage P. Exposure to anti-seizure medications impact growth of gut bacterial species and subsequent host response. *Neurobiol Dis.* 2022;167:105664.
197. Baggish AL, Hill DR. Antiparasitic agent atovaquone. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:1163–1173.
198. Nixon GL, Moss DM, Shone AE, Laloo DG, Fisher N, O’neill PM, et al. Antimalarial pharmacology and therapeutics of atovaquone. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68:977–985.
199. Rodriguez-Rodriguez BA, Noval MG, Kaczmarek ME, Jang KK, Thannickal SA, Cifuentes Kottkamp A, et al. Atovaquone and berberine chloride reduce SARS-CoV-2 replication *in vitro*. *Viruses.* 2021;13:2437.
200. Carter-Timofte ME, Arulanandam R, Kurmasheva N, Fu K, Laroche G, Taha Z, et al. Antiviral potential of the antimicrobial drug atovaquone against SARS-CoV-2 and emerging variants of concern. *ACS Infect Dis.* 2021;7:3034–3051.
201. Viveiros M, Rodrigues L, Martins M, Couto I, Spengler G, Martins A, et al. Evaluation of efflux activity of bacteria by a semi-automated fluorometric system. In: Gillespie SH, McHugh TD, editors. *Antibiotic Resistance Protocols, Methods in Molecular Biology.* 2nd ed. New York, NY: Humana Press; 2010. p. 159–172.
202. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol.* 1999;37:1771–1776.

6 Anexos

Tabela A1. Distribuição dos transportadores identificados na base de dados Transport DB 2.0 por classe e família.

Classe – família ATP-Dependent – The ATP-binding Cassette (ABC) Superfamily			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0094	Daunorubicin	SE1067	Phosphate
SE0095	Multidrug	SE1068	Phosphate
SE0117	Daunorubicin	SE1069	Phosphate
SE0167	2-aminoethylphosphonate	SE1072	Daunorubicin
SE0193	Zinc	SE1082	Daunorubicin
SE0198	Daunorubicin	SE1105	Sugar
SE0205	Nickel	SE1106	Sugar
SE0206	Dipeptide/oligopeptide	SE1107	Sugar
SE0208	Dipeptide/oligopeptide	SE1108	Polyamine
SE0209	Glycine betaine	SE1121	Lipoprotein
SE0210	Sulfate	SE1242	Manganese/zinc ion
SE0212	Daunorubicin	SE1243	Phosphonate
SE0213	Unclassified	SE1346	Heme export
SE0222	Glycine betaine	SE1450	Unclassified
SE0223	Glycine betaine/L-proline/carnitine/choline	SE1516	Multidrug/exoprotein ? (ecsba homolog)
SE0224	Glycine betaine	SE1517	Daunorubicin
SE0225	Glycine betaine/L-proline/carnitine/choline	SE1540	Phosphate
SE0383	Iron-hydroxamate	SE1541	Amino acid (glutamine/glutamate/aspartate?)
SE0384	Cobalamin/Fe ³⁺ -siderophores	SE1550	Lipid A
SE0405	Zinc	SE1555	Daunorubicin
SE0406	Manganese/zinc ion	SE1621	Unclassified
SE0407	Phosphonate	SE1622	Daunorubicin
SE0411	Daunorubicin	SE1624	Daunorubicin
SE0412	Polysaccharide export	SE1648	Heme

Tabela A1. Continuação.

Classe – família ATP-Dependent – The ATP-binding Cassette (ABC) Superfamily			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0418	Multidrug	SE1766	Cobalamin/Fe ³⁺ -siderophores
SE0421	Phosphonate	SE1767	Cobalamin/Fe ³⁺ -siderophores
SE0429	Lipoprotein	SE1768	Iron-hydroxamate
SE0430	Lipoprotein releasing	SE1793	Cobalt ion
SE0455	Lipid A	SE1794	Cobalt
SE0456	Lipid A	SE1795	Cobalt
SE0500	Lipoprotein	SE1850	Molybdate
SE0502	Glycine betaine	SE1851	Molybdate
SE0503	Glycine betaine	SE1852	Molybdenate
SE0515	Iron compound	SE1939	Lipoprotein
SE0516	Iron compound	SE1940	Lipoprotein releasing
SE0517	Phosphonate	SE1981	Dipeptide/oligopeptide
SE0518	Iron-hydroxamate	SE1991	Phosphate
SE0600	D-methionine	SE1992	Amino acid (glutamine/glutamate/aspartate?)
SE0601	D-methionine	SE1993	Amino acid (glutamine/glutamate/aspartate?)
SE0602	Methionine	SE2015	Glycine betaine/L-proline/carnitine/choline
SE0606	? (Fe-S assembly/sufbcd system)	SE2016	Glycine betaine
SE0607	? (Fe-S assembly/sufbcd system)	SE2017	Glycine betaine/L-proline/carnitine/choline
SE0610	? (Fe-S assembly/sufbcd system)	SE2018	Glycine betaine
SE0680	Dipeptide/oligopeptide	SE2024	Unclassified
SE0681	Dipeptide/oligopeptide	SE2025	Glycine betaine
SE0682	Glycine betaine	SE2068	Zinc
SE0683	Glycine betaine	SE2192	Unclassified

Tabela A1. Continuação.

Classe – família ATP-Dependent – The ATP-binding Cassette (ABC) Superfamily			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0684	Oligopeptide	SE2193	Lipoprotein
SE0773	Cobalt ion	SE2253	Phosphonate
SE0774	Cobalt	SE2254	Phosphonate
SE0775	Unclassified	SE2255	Phosphonate
SE0797	Polyamine	SE2256	Phosphonates
SE0798	Spermidine/putrescine	SE2320	Methionine
SE0799	Spermidine/putrescine	SE2321	D-methionine
SE0800	Spermidine/putrescine	SE2322	D-methionine
SE0973	Unclassified	SE2388	Daunorubicin
SE0994	Multidrug (ABCG/PDR-type)	SE2400	Lipoprotein
SE0998	Daunorubicin	SE2401	Unclassified
SE0999	Multidrug	SE2405	Efflux (antimicrobial peptide?)
SE1060	Oligopeptide	SE2406	Lipoprotein
SE1061	Phosphonate	SE_p503	Multidrug
SE1062	Dipeptide/oligopeptide	SE_p602	Polysaccharide export
SE1063	Dipeptide/oligopeptide	SE0140	Multidrug?
Classe – família ATP-Dependent – The Arsenite-Antimonite (ArsAB) Efflux Family			
Transportador	Substrato		
SE0137	Arsenite (arsa)		
Classe – família ATP-Dependent – The Bacterial Competence-related DNA Transformation Transporter (DNA-T) Family			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE1229	Unclassified	SE1276	Unclassified
SE1274	Unclassified		
Classe – família ATP-Dependent – The H ⁺ - or Na ⁺ -translocating F-type			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE1699	Protons	SE1704	Protons
SE1700	Protons	SE1705	Protons
SE1701	Protons	SE1706	Protons

Tabela A1. Continuação.

Classe – família ATP-Dependent – The H⁺- or Na⁺-translocating F-type			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE1702	Protons	SE1707	Protons
SE1703	Protons		
Classe – família ATP-Dependent – The Type IV (Conjugal DNA-Protein Transfer or VirB) Secretory Pathway (IVSP) Family			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0662	Unclassified	SE1495	Unclassified
SE0870	Unclassified	SE2397	Unclassified
SE1489	Unclassified		
Classe – família ATP-Dependent – The P-type ATPase (P-ATPase) Superfamily			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0062	Zinc/cadmium/cobalt ion	SE0322	Copper ion
SE0075	Zinc/cadmium/cobalt ion	SE2119	Zinc/cadmium/cobalt ion
SE0126	Copper ion		
Classe – família Secondary Transporter – The Auxin Efflux Carrier (AEC) Family			
Transportador	Substrato		
SE1831	Unclassified		
Classe – família Secondary Transporter – The Auxin Efflux Carrier (AEC) Family			
Transportador	Substrato		
SE1038	Sodium ion:alanine symporter		
Classe – família Secondary Transporter – The Autoinducer-2 Exporter (AI-2E) Family (Formerly the PerM Family)			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0713	Autoinducer-2 export	SE1040	Autoinducer-2 export
Classe – família Secondary Transporter – The Amino Acid-Polyamine-Organocation (APC) Family			
Transportador	Substrato		
SE0105	Arginine:ornithine antiporter		

Tabela A1. Continuação.

Classe – família Secondary Transporter – The Amino Acid-Polyamine-Organocation (APC) Family			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0354	Amino acid	SE2005	Amino acid
SE1015	Amino acid	SE2021	Amino acid
SE1356	Amino acid	SE2130	Gaba
SE1372	Amino acid	SE2147	Amino acid
SE1892	Gaba	SE2215	Arginine:ornithine antiporter
SE2004	Amino acid		
Classe – família Secondary Transporter – The Aromatic Acid Exporter (ArAE) Family			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE1194	Fusaric acid efflux?	SE1574	Fusaric acid efflux?
SE1549	Fusaric acid efflux?	SE2054	Fusaric acid efflux?
Classe – família Secondary Transporter – The Arsenite-Antimonite (ArsB) Efflux Family			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0135	Arsenite (arsb)	SE0335	Arsenite (arsb)
SE0334	Arsenite (arsb)		
Classe – família Secondary Transporter – The Arsenite-Antimonite (ArsB) Efflux Family			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0259	Glycine betaine/carnitine/choline	SE2168	Glycine betaine/carnitine/choline
SE1031	Glycine betaine/carnitine/choline		
Classe – família Secondary Transporter – The Biotin Uptake Transporter (BUT) Family			
Transportador	Substrato		
SE1856	Biotin uptake		
Classe – família Secondary Transporter – The Cadmium Resistance (CadD) Family			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0078	Cadmium ion	SE1515	Cadmium ion

Tabela A1. Continuação.

Classe – família Secondary Transporter – The Cation Diffusion Facilitator (CDF) Family			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0577	Cation efflux	SE1996	Cation efflux
SE1747	Cation efflux		
Classe – família Secondary Transporter – The Concentrative Nucleoside Transporter (CNT) Family			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0283	Sodium ion:nucleoside symporter	SE0419	Sodium ion:nucleoside symporter
Classe – família Secondary Transporter – The Monovalent Cation:Proton Antiporter-1 (CPA1) Family			
Transportador	Substrato		
SE0404	Sodium ion:proton antiporter		
Classe – família Secondary Transporter – The Monovalent Cation:Proton Antiporter-2 (CPA2) Family			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE2064	Potassium/sodium ion:proton antiporter	SE0699	Potassium/sodium ion:proton antiporter
Classe – família Secondary Transporter – The Monovalent Cation (K⁺ or Na⁺):Proton Antiporter-3 (CPA3) Family			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0398	Multicomponent sodium ion:proton antiporter	SE0644	Multicomponent sodium ion:proton antiporter
SE0399	Multicomponent sodium ion:proton antiporter	SE0645	Multicomponent sodium ion:proton antiporter
SE0401	Multicomponent sodium ion:proton antiporter	SE1448	Sodium ion:proton antiporter
SE0402	Multicomponent sodium ion:proton antiporter	SE0397	Multicomponent sodium ion:proton antiporter
SE0403	Multicomponent sodium ion:proton antiporter	SE0400	Multicomponent sodium ion:proton antiporter
SE0640	Multicomponent sodium ion:proton antiporter	SE0643	Multicomponent sodium ion:proton antiporter

Tabela A1. Continuação.

Classe – família Secondary Transporter – The Monovalent Cation (K⁺ or Na⁺):Proton Antiporter-3 (CPA3) Family			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0641	Multicomponent sodium ion:proton antiporter	SE0646	Multicomponent sodium ion:proton antiporter
SE0642	Multicomponent sodium ion:proton antiporter	SE2333	Multicomponent sodium ion:proton antiporter
Classe – família Secondary Transporter – The Dicarboxylate/Amino Acid:Cation (Na⁺ or H⁺) Symporter (DAACS) Family			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE1964	Proton/sodium ion:glutamate/aspartate symporter	SE2354	Proton/sodium ion:glutamate/aspartate symporter
Classe – família Secondary Transporter – The Divalent Anion:Na⁺ Symporter (DASS) Family			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0252	Sodium ion:dicarboxylate/sulfate	SE0462	Sodium ion:dicarboxylate/sulfate
Classe – família Secondary Transporter – The C4-Dicarboxylate Uptake (Dcu) Family			
Transportador	Substrato		
SE2170	C4-dicarboxylate		
Classe – família Secondary Transporter – The C4-dicarboxylate Uptake C (DcuC) Family			
Transportador	Substrato		
SE0227	C4-dicarboxylate		
Classe – família Secondary Transporter – The Drug/Metabolite Transporter (DMT) Superfamily			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0250	Drug/metabolite?	SE1829	Glucose uptake (GRP subfamily)
SE0392	Drug/metabolite?	SE1877	Multidrug efflux (SMR)
SE0511	Drug/metabolite?	SE1878	Multidrug efflux (SMR)
SE0816	UDP-galactose:UMP antiporter	SE2088	Glucose uptake (GRP subfamily)

Tabela A1. Continuação.

Classe – família Secondary Transporter – The Glutamate:Na⁺ Symporter (ESS) Family			
Transportador	Substrato		
SE1924	Sodium ion:glutamate symporter		
Classe – família Secondary Transporter – The Formate-Nitrite Transporter (FNT) Family			
Transportador	Substrato		
SE1985	Formate/nitrite		
Classe – família Secondary Transporter – The Gluconate:H⁺ Symporter (GntP) Family			
Transportador	Substrato		
SE2044	Gluconate		
Classe – família Secondary Transporter – The Glycerol Uptake (GUP) Family			
Transportador	Substrato		
SE0625	Glycerol:proton symporter		
Classe – família Secondary Transporter – The Lactate Permease (LctP) Family			
Transportador	Substrato		
SE1945	L-lactate		
Classe – família Secondary Transporter – The Branched Chain Amino Acid Exporter (LIV-E) Family			
Transportador	Substrato		
SE0009	Branched-chain amino acid efflux (azlc)		
Classe – família Secondary Transporter – The Branched Chain Amino Acid:Cation Symporter (LIVCS) Family			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0217	Branched-chain amino acid	SE1090	Branched-chain amino acid
Classe – família Secondary Transporter – The L-Lysine Exporter (LysE) Family			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0735	Lysine efflux	SE0736	Lysine efflux
Classe – família Secondary Transporter – The Major Facilitator Superfamily (MFS)			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0164	Multidrug efflux?	SE1771	Multidrug efflux
SE0196	Multidrug efflux	SE1838	Multidrug efflux

Tabela A1. Continuação.

Classe – família Secondary Transporter – The Major Facilitator Superfamily (MFS)			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0211	Multidrug efflux	SE1932	Multidrug efflux (emrb/qaca subfamily)
SE0239	Multidrug efflux (emrb/qaca subfamily)	SE1935	Multidrug efflux
SE0241	Multidrug efflux (emrb/qaca subfamily)	SE1968	Nitrate
SE0242	Multidrug efflux	SE2001	Multidrug efflux
SE0247	Multidrug efflux	SE2010	Multidrug efflux
SE0444	Multidrug efflux	SE2023	Multidrug efflux
SE0466	Multidrug efflux	SE2047	Glycerol-3-phosphate
SE0700	Multidrug efflux	SE2056	D-galactonate
SE0716	Multidrug efflux	SE2238	Multidrug efflux
SE1041	Multidrug efflux	SE2259	Multidrug efflux
SE1432	Multidrug efflux	SE2396	Metabolite (benzoate?)
SE1757	Multidrug efflux (emrb/qaca subfamily)	SE_p101	Multidrug efflux
SE1759	Multidrug efflux	SE0123	Sugar
Classe – família Secondary Transporter – The Multidrug/Oligosaccharidyl-lipid/Polysaccharide (MOP) Flippase Superfamily			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE1103	Multidrug efflux	SE2279	Polysaccharide export
SE1427	Polysaccharide export		
Classe – família Secondary Transporter – The Nucleobase:Cation Symporter-2 (NCS2) Family			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE1827	Xanthine/uracil	SE2349	Xanthine/uracil
SE0875	Xanthine/uracil		

Tabela A1. Continuação.

Classe – família Secondary Transporter – The NhaC Na⁺:H⁺ Antiporter (NhaC) Family			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0637	Sodium ion:proton antiporter	SE1902	Sodium ion:proton antiporter
SE1873	Sodium ion:proton antiporter		
Classe – família Secondary Transporter – The Ni²⁺-Co²⁺ Transporter (NiCoT) Family			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0802	Nickel ion	SE2191	Nickel ion
Classe – família Secondary Transporter – The Metal Ion (Mn²⁺-iron) Transporter (Nramp) Family			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0423	Spore germination protein (amino acid permease)	SE1286	Manganese/iron ion
SE0803	Manganese/iron ion		
Classe – família Secondary Transporter – The Neurotransmitter:Sodium Symporter (NSS) Family			
Transportador	Substrato		
SE2326	Sodium ion:solute symporter		
Classe – família Secondary Transporter – The Cytochrome Oxidase Biogenesis (Oxa1) Family			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE1689	60 KD inner membrane protein oxa1 homolog	SE2008	60 KD inner membrane protein oxa1 homolog
Classe – família Secondary Transporter – The Inorganic Phosphate Transporter (PiT) Family			
Transportador	Substrato		
SE0432	Phosphate		
Classe – família Secondary Transporter – The Proton-dependent Oligopeptide Transporter (POT) Family			
Transportador	Substrato		
SE0509	Proton:dipeptide/tripeptide symporter		

Tabela A1. Continuação.

Classe – família Secondary Transporter – The Riboflavin Transporter (RFT) Family			
Transportador	Substrato		
SE1174	Riboflavin uptake		
Classe – família Secondary Transporter – The Resistance to Homoserine/Threonine (RhtB) Family			
Transportador	Substrato		
SE2365	Amino acid efflux		
Classe – família Secondary Transporter – The Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) Superfamily			
Transportador	Substrato		
SE1834	Multidrug/solvent efflux (HAE1 subfamily)		
Classe – família Secondary Transporter – The Solute:Sodium Symporter (SSS) Family			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0019	Sodium ion:proline symporter	SE1175	Sodium ion:proline symporter
SE0478	Sodium ion:proline symporter	SE1368	Sodium ion:proline symporter
SE1099	Sodium ion:proline symporter	SE1587	Sodium ion:proline symporter
Classe – família Secondary Transporter – The Sulfate Permease (SulP) Family			
Transportador	Substrato		
SE_p413	Sulfate		
Classe – família Secondary Transporter – The Threonine/Serine Exporter (ThrE) Family			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0356	Unclassified	SE0527	Unclassified
SE0357	Unclassified		
Classe – família Secondary Transporter – The K⁺ Transporter (Trk) Family			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0571	Potassium ion uptake	SE0724	Potassium ion uptake
Classe – família Secondary Transporter – The Zinc (Zn²⁺)-Iron (Fe²⁺) Permease (ZIP) Family			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0074	Zinc ion	SE0499	Zinc ion

Tabela A1. Continuação.

Classe – família Ion Channels – The Ammonia Transporter Channel (Amt) Family			
Transportador	Substrato		
SE1644	Ammonium		
Classe – família Ion Channels – The Major Intrinsic Protein (MIP) Family			
Transportador	Substrato		
SE0977	Glycerol uptake		
Classe – família Ion Channels – The CorA Metal Ion Transporter (MIT) Family			
Transportador	Substrato		
SE1926	Magnesium/cobalt ion	SE1958	Magnesium/cobalt ion
Classe – família Ion Channels – The Large Conductance Mechanosensitive Ion Channel (MscL) Family			
Transportador	Substrato		
SE1030	Large-conductance mechanosensitive ion channel		
Classe – família Ion Channels – The Small Conductance Mechanosensitive Ion Channel (MscS) Family			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0146	Small-conductance mechanosensitive ion channel	SE2377	Small-conductance mechanosensitive ion channel
Classe – família Ion Channels – The Urea Transporter (UT) Family			
Transportador	Substrato		
SE1860	Urea		
Classe – família Unclassified – The Ferrous Iron Uptake (FeoB) Family			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0189	Ferrous ion	SE2114	Ferrous ion
Classe – família Unclassified – The HlyC/CorC (HCC) Family			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0474	Hemolysin C (hlyc) homolog	SE0613	Heavy metal ion
Classe – família Unclassified – The Mg ²⁺ Transporter-E (MgtE) Family			
Transportador	Substrato		
SE0698	Magnesium ion		

Tabela A1. Continuação.

Classe – família Unclassified – The Tellurium Ion Resistance (TerC) Family			
Transportador	Substrato		
SE0721	Tellurium ion efflux		
Classe – família Unclassified – The YggT or Fanciful K ⁺ Uptake-B (FkuB; YggT)			
Transportador	Substrato		
SE0865	Unclassified		
Classe – família Phosphotransferase System (PTS) – General PTS			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE0782	Unclassified	SE0781	Unclassified
Classe – família Phosphotransferase System (PTS) – Sugar Specific PTS			
Transportador	Substrato	Transportador	Substrato
SE2082	Fructose	SE1959	Glucose/maltose/N-acetylglucosamine
SE2337	Fructose	SE2102	Glucose/maltose/N-acetylglucosamine
SE1115	Glucose	SE0472	Fructose
SE1403	Glucose/maltose/N-acetylglucosamine	SE2228	Fructose
SE1890	Glucose/maltose/N-acetylglucosamine	SE1782	Cellobiose
SE1897	Glucose/maltose/N-acetylglucosamine	SE1783	Cellobiose

Tabela A2. Distribuição dos fármacos identificados na base de dados DrugBank por superclasses químicas.

Fármacos			
Compostos orgânicos heterocíclicos			
Acemetacina	Duvelisib	Mercaptopurina	Riluzol
Afatinib	Epinastina	Micofenolato mofetil	Risperidona
Alfuzosina	Erlotinibe	Nefazodona	Rivaroxabana
Amlodipina	Etomidato	Neratinib	Rosuvastatina
Amodiquina	Felodipina	Nicardipina	Silodosina
Apaxiban	Fenitoína	Nicorandil	Simvastatina
Atorvastatina	Flufenazina	Nifedipina	Sulfassalazina
Avanafil	Flupentixol	Nisoldipina	Sumatriptano
Azelastina	Fluvastatina	Nizatidina	Sunitinib
Buspirona	Gemcitabina	Olanzapina	Tacrina
Carbamazepina	Gliquidona	Olaparib	Temozolomida
Carvedilol	Hidroclorotiazina	Olopatadina	Terazosina
Cetoconazol	Hidroxicloroquina	Oxcarbazepina	Tinidazole
Cimetidina	Imipramina	Paliperidona	Tioguanina
Citarabina	Indacaterol	Pantoprazol	Topiramato
Clofazimina	Indometacina	Paroxetina	Trazodona
Clomipramina	Istradefilina	Pomalidomida	Trifluoperazina
Cloroquina	Itraconazol	Posaconazole	Triflupromazina
Clorprotixeno	Lenalidomida	Pranlucaste	Trimipramina
Clozapina	Linagliptina	Prazosina	Vandetanib
Desipramina	Lomerizina	Primaquina	Ziprasidona
Desloratadina	Loratidina	Prometazina	Zolmitriptano
Diltiazem	Lovastatina	Quetiapina	Zonisamida
Doxazosina	Mefloquina	Quinacrina	Ranitidina
Doxepina	Meloxicam	Repaglinida	
Benzenoides			
Acetaminofeno	Clorpropamida	Isotiocianato de fenetil	Probenecida
Ácido acetilsalicílico	Clotrimazol	Labetalol	Probucof
Ambrisentana	Dabrafenibe	Lamotrigina	Propanolol
Amissulprida	Desatinibe	Letrozol	Protriptilina
Amitriptilina	Diclofenaco	Lidocaína	Ranolazina
Anastrozol	Duloxetina	Lofexidina	Rosiglitazona
Atenolol	Fenofibrato	Loperamida	Sertralina
Atovaquone	Fexofenadina	Losartan	Sildenafil
Benzocaína	Fluconazol	Metoclopramida	Sulfimpirazona
Bepiridil	Fluoxetina	Miconazol	Sulpirida
Bicalutamida	Flurbiprofeno	Mitotano	Tariquidar

Tabela A2. Continuação.

Benzenoides			
Bisacodil	Furosemida	Mitoxantrona	Telmisartan
Bisoprolol	Glasdegib	Nadolol	Terbinafina
Bumetanida	Gliburida	Naloxona	Terfenadina
Candesartan	Glimepirida	Naproxeno	Tolbutamida
Cetoprofeno	Glipizida	Nortriptilina	Tolvaptano
Cetrizina	Hidroxizina	Olmesartan	Venlafaxina
Citalopram	Imatinibe	Pimozida	
Ácidos orgânicos e derivados			
Ácido zoledrónico	Edoxaban	Metotrexato	Saxagliptina
Aliscireno	Enalapril	Nateglinida	Sitagliptina
Captopril	Gabapentina enacabril	Pilsicainida	Valsartan
Clopidogrel	Levetiracetam	Pregabalina	Vildagliptina
Fenilpropanoides e policetídeos			
Ácido p-cumárico	Ibuprofeno	Piceatanol	Toremifeno
Curcumina	Miricetina	Propafenona	
Diosmina	Mitiglinida	Quercetina	
Genisteína	Naringenina	Tamoxifeno	
Alcalóides e derivados			
Atropina	Colchicina	Galantamina	Quinidina
Bromocriptina	Diidroergocristina	Irinotecano	Quinina
Camptotecina	Diidroergotamina	Piperina	Reserpina
Compostos orgânicos de azoto			
Dipiridamol	Fingolimod	Miltefosina	Timolol
Dissulfiram	Fluvoxamina	Oxaliplatina	
Lípidos e moléculas lípido-like			
Ácido glicirrízico	Docetaxel	Paclitaxel	
Artesunato	Monensina	Ubidecarenona	
Compostos orgânicos de oxigénio			
Dapagliflozina	Metirapona	Sorafenibe	
Estreptozocina	Pravastatina		
Lignanos, neolignanos e compostos relacionados			
Etoposido	Tetrandrina		
Compostos de metais mistos/não-metals			
Cisplatina			
Compostos organossulfurados			
Aztioprina			