



INSTITUTO SUPERIOR TÉCNICO
Universidade Técnica de Lisboa

Caracterização e Modelação do Transporte de Brometo de Etídeo em *Escherichia coli*

Ana Laura Machado dos Santos Seara Paixão

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biológica

Júri

Presidente: Professor Doutor Luis Joaquim Pina da Fonseca

Orientador: Professor Doutor Gabriel António Amaro Monteiro

Orientador: Professor Doutor Miguel Viveiros Bettencourt

Vogal: Professor Doutor Pedro Fernandes

Setembro de 2007

Publicações no Âmbito deste Trabalho

Cardoso, A., Martins, M., Paixão, L., Viveiros, M., Couto, I. e Amaral., L.. (2007). A simple method for the screening of efflux pump activity in multi-drug resistant Gram-negative bacteria. Submetido ao MicroBiotec2007. Lisboa.

Viveiros, M., Paixão, L., Rodrigues, L., Martins, M., Couto, I. e Amaral, L. Inhibition by non-antibiotics of antibiotic-induced genetic expression of efflux pumps genes. Oral presentation by M. Viveiros in the Non-Antibiotics and Efflux pumps Symposium. Abstr. 255/55p, p. 110. In Abstract Book of the 8th Congress of Chemotherapy and Infection (ECC8). Budapeste (Hungria), 26-28 Outubro 2006.

Viveiros, M., Martins, A., Paixão, L., Rodrigues, L., Martins, M., Couto, I., Kern, W., e Amaral., L.. (2007). Demonstration of intrinsic efflux activity of *E. coli* by an automated ethidium bromide method. Em preparação.

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Doutor Miguel Viveiros pela oportunidade que me concedeu e pela simpatia com que me acolheu desde o primeiro momento. Agradeço sinceramente a disponibilidade, o interesse e apoio prestados. Obrigada pelos ensinamentos, pela compreensão e pelo entusiasmo estimulantes.

Ao Professor Doutor Leonard Amaral, Director da Unidade de Micobactérias do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, pelo entusiasmo e sugestões estimulantes.

À Professora Doutora Isabel Couto, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, pelo interesse no trabalho e pelas sugestões.

Ao Professor Doutor Pedro Fernandes, do Instituto Superior Técnico, por ter aceite ser meu orientador, pelo interesse e disponibilidade prestadas. E pela simpatia com que me recebeu.

Ao Professor Doutor Gabriel Monteiro do Instituto Superior Técnico por ter aceite ser meu orientador e pela disponibilidade e compreensão.

À Doutora Carla Carvalho, do Instituto Superior Técnico, pela disponibilidade e amizade.

Agradeço às minhas colegas de laboratório Liliana Rodrigues, Marta Martins e Ana Martins, pela ajuda e interesse no meu trabalho, pelas dicas e pelos almoços e cafés animados. Ana muito obrigada.

À Diana pelo apoio e amizade. E pelas conversas e momentos de descontração.

Ao Jorge pelas conversas descontraídas e divertidas, pela disponibilidade e amizade.

Agradeço à minha família que sempre me apoiou e que eu adoro. Obrigada pais por estarem sempre presentes quando preciso e por acreditarem em mim. Obrigada mãe.

Aos meus irmãos Tiago, Afonso e Mariana, pela ajuda, pela amizade e pelos jantares prontos quando chego tarde a casa. Tiago muito obrigada por tudo.

Ao Gonçalo a compreensão, carinho e apoio incondicionais.

Obrigada.

Resumo

Neste trabalho definiu-se um método automático para a demonstração e quantificação da actividade intrínseca das bombas de efluxo (BE) em estirpes susceptíveis a antibióticos e com fenótipo de multirresistência.

O protocolo foi definido tendo como estirpe padrão *E. coli* AG100, que corresponde à estirpe k-12 selvagem, a qual possui o principal sistema de efluxo intacto e funcional – AcrAB-TolC. Utilizou-se o brometo de etídeo (EtBr) como substrato e o sinal de fluorescência foi monitorizado por fluorimetria em termociclador de tempo real utilizando o Rotor-Gene 3000™. O método permitiu analisar a acumulação de EtBr em condições de limitação energética (ausência de glucose; redução da temperatura) e na presença de inibidores, demonstrando que o efluxo é um transporte activo mediado por BE. Demonstrou-se a implicação de AcrAB-TolC no efluxo de EtBr por comparação com estirpes mutantes que diferem no seu grau de actividade: AG100A onde o sistema AcrAB está inactivo e AG100_{TET} onde este sistema está super expresso. O EtBr pode ligar-se a diversos alvos intracelulares, não ocorrendo *leaking out* deste fluorocromo.

Foi desenvolvido um modelo matemático que permitiu descrever a cinética de transporte nas três estirpes. O modelo evidenciou que a entrada de fluorocromo ocorre por difusão passiva e permitiu destrinçar o efluxo entre estirpes que diferem no grau de actividade de AcrAB-TolC ($k_{AG100}^- = 0,0173 \pm 0,0057 \text{ min}^{-1}$; $k_{AG100A}^- = 0,0106 \pm 0,0033 \text{ min}^{-1}$ e $k_{AG100TET}^- = 0,0230 \pm 0,0090 \text{ min}^{-1}$). Adicionalmente revelou a diferença de permeabilidade entre AG100A e AG100 e sugeriu a existência de um mecanismo de indução do efluxo em AG100_{TET}.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, Bombas de Efluxo, AcrAB-TolC, Brometo de Etídeo, Resistência a Múltiplas Drogas

Abstract

In this work we defined an automated method to demonstrate and quantify the intrinsic efflux pump activity in antibiotic susceptible strains and with a resistant multidrug phenotype.

The protocol was defined having as standard strain the wild type *E. coli* k-12 AG100, which has its principal efflux system intact and functional - AcrAB-TolC. The method employs ethidium bromide (EtBr) as the efflux substrate and the fluorescence signal was monitored by fluorimetry using the real-time thermocycler Rotor-Gene 3000™.

The method allowed us to analyze EtBr accumulation under limiting energy supply (absence of glucose; low temperature) as well as in the presence of efflux inhibitors. Data gathered showed that efflux is an active transport system mediated by efflux pumps. The role of AcrAB-TolC in the efflux of EtBr was highlighted by comparing strains which differ in efflux activity: AG100A (inactivated AcrAB-TolC) and AG100_{TET} (over expression of AcrAB-TolC). The results suggested that EtBr might bind to several intracellular targets and once inside the cells there is no leaking out of EtBr.

A mathematical model was developed to describe the transport kinetics in the three strains. The model shows that EtBr flows into the cell by passive diffusion. It allowed to discriminate the efflux between strains with different degrees of AcrAB-TolC activity ($k_{AG100}^- = 0,0173 \pm 0,0057 \text{ min}^{-1}$; $k_{AG100A}^- = 0,0106 \pm 0,0033 \text{ min}^{-1}$ e $k_{AG100TET}^- = 0,0230 \pm 0,0090 \text{ min}^{-1}$). The model furthermore revealed the difference in permeability between AG100A and AG100 and suggested the existence of an inductive efflux mechanism in AG100_{TET}.

Keywords: *Escherichia coli*, Efflux Pumps, AcrAB-TolC, Ethidium Bromide, Multidrug Resistance

Índice

Publicações no Âmbito deste Trabalho.....	ii
Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	iv
Palavras-chave.....	iv
<i>Abstract</i>	v
<i>Keywords</i>	v
Índice.....	vi
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Abreviaturas.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. <i>Escherichia coli</i>	1
1.1.1. Características Gerais.....	1
1.1.2. Epidemiologia.....	2
1.1.3. Parede Celular e Porinas – Barreira de Permeabilidade.....	2
1.2. Resistência Antimicrobiana.....	4
1.2.1. Mecanismos Resistência Antimicrobiana.....	4
1.2.1.1. Inativação Enzimática.....	4
1.2.1.2. Alteração da Molécula Alvo.....	6
1.2.1.3. Redução da Acumulação do Agente Antimicrobiano: Barreiras de Permeabilidade e Actividade de Efluxo.....	7
1.2.1.3.1. Permeabilidade da membrana externa.....	7
1.2.1.3.1.1. Restrições pelo tamanho.....	8
1.2.1.3.1.2. Restrições devido à hidrofobicidade.....	8
1.2.1.3.1.3. Restrições devido à carga.....	9
1.2.1.3.1.4. Restrições devido ao número de canais activos.....	9
1.2.2. Mecanismos de Aquisição de Resistência.....	10
1.2.2.1. Resistência Intrínseca e Resistência Adquirida.....	10
1.2.2.1.1. Resistência Intrínseca – Adaptação Fisiológica.....	10
1.2.2.1.1.1. Fase Estacionária.....	11
1.2.2.1.1.2. Variação Fenotípica.....	11
1.2.2.1.1.3. Biofilmes.....	11
1.2.2.1.2. Resistência Adquirida.....	12
1.2.2.1.2.1. Mutações.....	12
1.2.2.1.2.2. Aquisição de Material Exógeno.....	13
1.3. Bombas de Efluxo.....	13
1.3.1. Evolução e Funções Naturais dos Sistemas de Efluxo.....	14
1.3.1.1. Bombas de Efluxo Específicas.....	14

1.3.1.2. Bombas de Efluxo MDR.....	14
1.3.2. Estrutura da Bombas de Efluxo.....	15
1.3.3. Diversidade Biológica das Bombas de Efluxo.....	17
1.3.3.1. Transportadores ABC.....	17
1.3.3.2. Transportadores Secundários.....	18
1.3.3.2.1. Major Facilitor Superfamily (MFS).....	18
1.3.3.2.2. Resistance-Nodulation cell Division (RND).....	19
1.3.3.2.3. Small Multidrug Resistance (SMR).....	19
1.3.3.2.4. Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE).....	20
1.3.4. Bombas de Efluxo em <i>E. coli</i>	20
1.3.4.1. Sistema AcrAB-TolC e sua Importância.....	21
1.4. Importância Clínica da Resistência Mediada por Bombas de Efluxo.....	23
1.5. Ultrapassando a Resistência Mediada por Bombas de Efluxo.....	25
1.5.1. Agentes com Menor Susceptibilidade ao Efluxo.....	25
1.5.2. Inibidores de Bombas de Efluxo.....	26
1.6. Transporte de Brometo de Etídeo em <i>Escherichia coli</i>	29
1.6.1. Fluorimetria em termociclador de Tempo real: Rotor-Gene 3000™.....	30
1.6.2. Princípios Fundamentais.....	31
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
2.1. Estirpes Bacterianas.....	33
2.2. Condições de Cultura.....	33
2.3. Compostos.....	33
2.4. Viabilidade Celular.....	34
2.5. Medições Fluorimétricas – Fluorimetria em Termociclador de Tempo Real: Rotor-Gene 3000™.....	34
2.5.1. Protocolo standard de acumulação de EtBr por fluorimetria em temociclador de tempo real: Rotor-Gene 3000™.....	34
2.5.2. Protocolo de efluxo por fluorimetria em temociclador de tempo real: Rotor-Gene 3000™.....	35
2.5.3. Protocolo para a modelação do transporte de EtBr em <i>E. coli</i> por fluorimetria em temociclador de tempo real: Rotor-Gene 3000™.....	36
2.6. Estratégia e rotina de cálculo para a determinação da concentração de EtBr intracelular.....	37
3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....	39
3.1. Caracterização do Transporte de EtBr.....	39
3.2. Modelação do Transporte de EtBr.....	57
4. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	82
5. BIBLIOGRAFIA.....	86

Lista de Figuras

Figura 1.1.	<i>Escherichia coli</i>	1
Figura 1.2.	Representação esquemática de <i>E. coli</i> e seus componentes celulares.....	1
Figura 1.3.	Mecanismos de inativação enzimática. A. Hidrólise da penicilina pela β -lactamase antes de atingir o alvo (PBP) na membrana citoplasmática numa bactéria Gram-negativa. B. Processos de modificação enzimática da canamicina.....	6
Figura 1.4.	Alteração da ligação amida do terminal D-Ala-D-Ala do peptidoglicano na ligação ester do terminal D-Ala-D-Lac. Redução de 1000 vezes na afinidade para o substrato.....	6
Figura 1.5.	Permeabilidade da membrana externa e sistemas de efluxo em bactérias Gram-negativas.....	8
Figura 1.6.	Hipotéticos mecanismos de resistência em biofilmes.....	12
Figura 1.7.	Diversidade estrutural de BE em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	16
Figura 1.8.	Diversidade e componente energética das BE.....	17
Figura 1.9.	Modelo estrutural de um membro da família ABC.....	17
Figura 1.10.	Modelo estrutural de um membro da família MFS.....	18
Figura 1.11.	Modelo estrutural de um membro da família RND.....	19
Figura 1.12.	Modelo estrutural de um membro da família SMR.....	20
Figura 1.13.	Estrutura de AcrB. A. Vista lateral. B. Vista de topo.....	22
Figura 1.14.	Modelo proposto para o complexo AcrAB-TolC.....	22
Figura 1.15.	Mecanismo de efluxo por AcrAB-TolC. Após ligação do substrato, a conformação do AcrB altera-se para permitir a ligação a TolC que é seguida de uma alteração da estrutura de AcrA. Abertura do poro por ligação do protão e saída do substrato por transporte activo.....	23
Figura 1.16.	Exemplos de estruturas de inibidores de BE.....	27
Figura 1.17.	Rotor-Gene 3000 TM	30
Figura 1.18.	A. Vista lateral da câmara do Rotor-Gene. B. Vista de topo do rotor do Rotor-Gene.....	31
Figura 1.19.	Estrutura química do brometo de etídeo.....	31
Figura 3.1.1.	Monitorização da intensidade de fluorescência do EtBr em solução (PBS) e da acumulação de diferentes concentrações de EtBr em <i>E. coli</i> AG100, a 37 °C e na presença de [Glu] = 0,4%, ao comprimento de onda de excitação de 530 nm bp e de emissão de 585 nm hp.....	40
Figura 3.1.2.	Monitorização da fluorescência de diferentes concentrações de EtBr livre em solução ao comprimento de onda de excitação de 530 nm bp e de emissão de 585 nm hp.....	41
Figura 3.1.3.	Influência da ausência da fonte de carbono na acumulação de EtBr em <i>E. coli</i> AG100 a 37 °C. Comparação com as condições óptimas de efluxo (37°C e [Glu]=0,4%).....	44

Figura 3.1.4.	Influência da redução da temperatura (25 °C) na acumulação de EtBr em <i>E. coli</i> AG100 na presença de [Glucose] = 0,4 %. Comparação com as condições ótimas de efluxo (37°C e [Glu]=0,4%).....	44
Figura 3.1.5.	Síntese da influência da ausência de glucose e redução da temperatura face às condições ótimas de efluxo (37 °C na presença de [Glucose] = 0,4 %), após 30 min de ensaio. A ausência de glucose e redução de temperatura provocam um incremento na acumulação de EtBr face às condições ótimas de efluxo.....	45
Figura 3.1.6.	Influência da ausência de glucose e da redução da temperatura (25 °C) na acumulação intracelular de EtBr. Concentração de EtBr que produz uma acumulação idêntica a 1 µg/mL de EtBr nas condições ótimas de efluxo.....	46
Figura 3.1.7.	Influência de concentrações crescentes de CPZ na acumulação intracelular de 1 µg/mL de EtBr em <i>E. coli</i> AG100 a 37 °C na ausência e presença de glucose (0,4%).....	48
Figura 3.1.8.	Influência da glucose (0,4 %) no efluxo de EtBr a 37°C. Células previamente carregadas com 1 µg/mL de EtBr na ausência de glucose e na presença de 20 µg/mL de CPZ a 25 °C.....	49
Figura 3.1.9.	Efeito de concentrações crescentes de CPZ na inibição da actividade de efluxo a 37°C e na ausência de glucose. Células previamente carregadas com 1 µg/mL de EtBr na ausência de glucose e na presença de 20 µg/mL de CPZ a 25 °C.....	50
Figura 3.1.10.	Efeito de concentrações crescentes de CPZ na inibição da actividade de efluxo a 37°C e na ausência de glucose. Células previamente carregadas com 1 µg/mL de EtBr na ausência de glucose e na presença de 20 µg/mL de CPZ a 25 °C.....	51
Figura 3.1.11.	Efluxo (a 37°C e na presença de 0,4% de glucose) de células de <i>E. coli</i> AG100 carregadas com 1 µg/mL de EtBr na presença de 20 µg/mL de CPZ a 25 °C sem glucose. Efeito inibitório de concentrações crescentes de tioridazina (TZ).....	52
Figura 3.1.12.	Efluxo (a 37°C e na presença de 0,4% de glucose) de células de <i>E. coli</i> AG100 carregadas com 1 µg/mL de EtBr na presença de 20 µg/mL de CPZ a 25 °C sem glucose. Efeito inibitório de concentrações crescentes de <i>L-Phe-L-Arg-β-naphthylamide</i> (PAN).....	52
Figura 3.1.13.	Efluxo de EtBr na presença de glucose a 37 °C de células de <i>E. coli</i> AG100 previamente carregadas (mortas) com 1 µg/mL de EtBr na presença de 20 mM de KCN.....	54
Figura 3.1.14.	Efluxo de EtBr em AG100, AG100A e AG100 _{TET} em células previamente carregadas com 1 µg/mL de EtBr na presença de 5 µg/mL CCCP.....	55
Figura 3.1.15.	Inibição do efluxo de EtBr em AG100, AG100A e AG100 _{TET} na presença de 5 µg/mL de CCCP em células previamente carregadas com 1 µg/mL de EtBr na presença de 5 µg/mL CCCP.....	56

Figura 3.2.1.	Monitorização do transporte de diferentes concentrações de EtBr em <i>E. coli</i> AG100, a 37 °C e na presença de glucose (0,4 %), utilizando como comprimento de onda de excitação 530 nm e de emissão 585 nm. Fluorescência associada ao EtBr livre em solução (controlos PBS+EtBr).....	60
Figura 3.2.2.	Dependência da cinética transporte de EtBr com a concentração exterior de substrato nos primeiros 40 minutos.....	60
Figura 3.2.3.	A. Fluorescência de EtBr livre em solução (PBS). B. Quantificação de EtBr livre em solução.....	62
Figura 3.2.4.	Comparação de intensidade de fluorescência de EtBr (1 - 3 - 6 µg/mL) na presença de células, livre em solução antes e depois de as células terem acumulado EtBr.....	63
Figura 3.2.5.	Intensidade de fluorescência do EtBr no meio intracelular, em <i>E. coli</i> AG100.....	64
Figura 3.2.6.	A. Percentagem de retenção de EtBr e B. concentração de EtBr retido nos filtros de PVDF Durapore, Millex® –GV ₁₃ da Millipore Corporation (Bedford, USA), em vários ensaios para diferentes concentrações de EtBr e respectiva média (quadrados).....	65
Figura 3.2.7.	Relação entre a fluorescência de soluções de EtBr antes e depois da filtração com os filtros PVDF Durapore, Millex® –GV ₁₃ da Millipore Corporation (Bedford, USA).....	66
Figura 3.2.8.	Relação entre a [EtBr] _{int} e a FL intracelular para <i>E. coli</i> AG100.....	67
Figura 3.2.9.	Concentração de EtBr intracelular em função do tempo para <i>E. coli</i> AG100.....	68
Figura 3.2.10.	Exemplicação do ajuste do modelo aos dados experimentais convertidos em concentração de EtBr intracelular, para as concentrações extracelulares iniciais de EtBr (1-6 µg/mL) em <i>E. coli</i> AG100.....	69
Figura 3.2.11.	A. Valores de taxas de entrada (k^+) e B. de saída (K^-) em função da concentração exterior inicial de EtBr, para <i>E. coli</i> AG100, dados pelo modelo, para os três ensaios efectuados e respectiva média.....	70
Figura 3.2.12.	Representação dos valores de velocidade máxima (v_{max}) em função da concentração exterior inicial de EtBr, dados pelo modelo, para os três ensaios efectuados e respectiva média, para <i>E. coli</i> AG100.....	71
Figura 3.2.13.	Representação da concentração intracelular no estado estacionário em função da concentração exterior inicial de EtBr, dados pelo modelo, para os três ensaios efectuados e respectiva média para <i>E. coli</i> AG100.....	72
Figura 3.2.14	Cinética de transporte de EtBr em A. <i>E. coli</i> AG100A e B. <i>E. coli</i> AG100 _{TET} (média dos três ensaios).....	73
Figura 3.2.15.	Comparação da cinética de transporte de 1 µg/mL de EtBr para as três estirpes de <i>E. coli</i> : AG100, AG100A e AG100 _{TET}	74
Figura 3.2.16.	Comparação da cinética de transporte de EtBr (1-6 µg/mL) entre <i>E. coli</i> AG100 e <i>E. coli</i> AG100 _{TET}	75
Figura 3.2.17.	Concentração intracelular de EtBr para as três estirpes na presença de 1 µg/mL de EtBr exterior.....	76

Figura 3.2.18. Exemplificação do ajuste do modelo aos dados experimentais convertidos em concentração intracelular de EtBr para as estirpes A. AG100A e B. AG100 _{TET} , para a concentração de EtBr exterior no instante inicial de 1 µg/mL.....	77
Figura 3.2.19. Valores das taxas de A. entrada e de B. efluxo, para <i>E. coli</i> AG100A dados pelo modelo, para os três ensaios efectuados e respectiva média.....	77
Figura 3.2.20. Exemplificação do ajuste do modelo à cinética de transporte de EtBr em <i>E. coli</i> AG100 _{TET} , dividindo a cinética em duas fases, para três concentrações de EtBr (1-3-6 µg/mL).....	79
Figura 3.2.21. Valores das taxas de A. entrada e de B. efluxo para AG100 _{TET} no período inicial, primeiros 50 minutos, dados pelo modelo, para os três ensaios efectuados e respectiva média.....	80
Figura 3.2.22. Valores das taxas de A. entrada e de B. efluxo para AG100 _{TET} no período após 50 minutos, dados pelo modelo, para os três ensaios efectuados e respectiva média.....	81

Lista de Abreviaturas

ABC	<i>ATP Binding Cassete</i>
ATP	Adenosina Trifosfato (do inglês: <i>Adenosine 5'-Triphosphate</i>)
BE	Bombas de Efluxo
CCCP	<i>Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazone</i>
CFU	Unidades Formadoras de Colônias (do inglês: <i>Colony Forming Unit</i>)
CPZ	Clorpromazina
DAEC	<i>E. coli</i> difusamente aderentes (do inglês: <i>Diffusely Adherent E. coli</i>)
DMT	<i>Drug Metabolite Transporters</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DO₆₀₀	Densidade Óptica a 600 nm
ds-DNA	Ácido Desoxirribonucleico de Cadeia Dupla (do inglês: <i>Double Strand DNA</i>)
ds-RNA	Ácido Ribonucleico de Cadeia Dupla (do inglês: <i>Double Strand RNA</i>)
EAEC	<i>E. coli</i> Enteroagregativa (do inglês: <i>Enterocaggregative E. coli</i>)
EHEC	<i>E. coli</i> Enterohemorrágica (do inglês: <i>Enterohemorrhagic E. coli</i>)
EIEC	<i>E. coli</i> Enteroinvasiva (do inglês: <i>Enteroinvasive E. coli</i>)
EPEC	<i>E. coli</i> Enteropatogénica (do inglês: <i>Enteropathogenic E. coli</i>)
ESBL	β -lactamases de Espectro Alargado (do inglês: <i>Extended-Spectrum Beta-Lactamases</i>)
EtBr	Brometo de Etídeo
ETEC	<i>E. coli</i> Enterotoxigénica (do inglês: <i>Enterotoxigenic E. coli</i>)
FL	Fluorescência
KAN	Canamicina
KCN	Cianeto de Potássio
LB	<i>Luria-Bertani</i>
LED	Diodo Emissor de Luz (do inglês: <i>Light Emitting Diode</i>)
LPS	Lipopolissacáridos
MATE	<i>Multidrug and Toxic Compound Extrusion</i>
MDR	Resistência a Múltiplos Compostos (do inglês: <i>Multidrug Resistance</i>)
MFS	<i>Major Facilitor Superfamily</i>
MFP	Proteína Membranar de Fusão (do inglês: <i>Membrane Fusion Protein</i>)
MIC	Concentração Mínima Inibitória (do inglês: <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
MOP	<i>Multidrug Oligosaccharidyl-lipid/Polysaccharide</i>
MRP1 e MRP2	<i>Multidrug Resistance Protein</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina (do inglês: <i>Methicilin Resistant Staphylococcus aureus</i>)
OMP	Proteína da Membrana Externa (do inglês: <i>Outer Membrane Protein</i>)
PAN	<i>Phe-arg-naphthylamide</i>

PBPs	<i>Penicillin Binding Proteins</i>
PBS	Tampão Salino de Fosfato (do inglês: <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMF	Força Protomotriz (do inglês: <i>Proton Motive Force</i>)
PMT	Fotomultiplicador (do inglês: <i>Photomultiplier</i>)
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno (do inglês: <i>Polyvinylidene Difluoride</i>)
RNA	Ácido Ribonucleico (do inglês: <i>Ribonucleic Acid</i>)
RND	<i>Resistance-Nodulation cell Division</i>
SMR	<i>Small Multidrug Resistance</i>
ss-DNA	Ácido Desoxirribonucleico de Cadeia Simples (do inglês: <i>Single Chain DNA</i>)
ss-RNA	Ácido Ribonucleico de Cadeia Simples (do inglês: <i>Single Chain RNA</i>)
TET	Tetraciclina
TMS	Segmentos Transmembranares (do inglês: <i>Transmembranar Segments</i>)
TZ	Tioridazina
VP	Verapamil

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Escherichia coli*

1.1.1. Características Gerais

Escherichia coli, originalmente conhecida por *Bacterium coli*, foi identificada em 1885 pelo pediatra alemão Theodor Escherich.

Trata-se de uma bactéria Gram-negativa pertencente ao reino *Eubacteria*. É membro da família das *Enterobacteriaceae* ou bactérias entéricas, onde se incluem muitos géneros de microrganismos patogénicos como sejam *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia*. O seu habitat natural é o lúmen intestinal dos seres humanos e outros mamíferos, que coloniza nas primeiras horas após o nascimento, permanecendo no hospedeiro até à sua morte. É um microrganismo simbiote tendo um papel crucial no anabolismo e catabolismo dos hospedeiros. *E. coli* produz vitaminas que são absorvidas pelo hospedeiro e utiliza a glucose deste para produzir todos os componentes macromoleculares necessários para compor a célula. Não requer requisitos nutricionais especiais e cresce a 37 °C. Assume a forma de um bacilo com cerca de 1 µm de diâmetro e 2 µm de comprimento. Possui flagelos dispostos em torno da célula que lhe permitem a mobilidade. A existência de fímbrias ou adesinas facilitam a sua fixação o que impede o seu arrastamento pela urina ou fezes líquidas. É a bactéria anaeróbia facultativa predominante na flora intestinal pertencendo ao grupo dos coliformes fecais e a sua presença é indicadora de contaminação fecal recente em águas e alimentos. Os métodos para a sua identificação laboratorial baseiam-se nas suas características bioquímicas, em particular na característica de esta ser lactase positiva, isto é, capaz de fermentar a lactose e produzir ácido e gás a temperaturas de incubação elevadas (+/- 45 °C), num curto período de tempo (Lehninger *et al.*, 1993 e Cooper, 2000). O DNA desta bactéria corresponde a uma molécula circular simples que forma o nucleóide. A existência de uma quantidade elevada de ribossomas no citoplasma é responsável pela sua aparência granular e é uma evidência da elevada capacidade de resposta metabólica desta bactéria assente num “sistema operativo” simples e reduzido como é evidenciado pelo tamanho reduzido do seu genoma (já sequenciado). Este conjunto de factores permite-lhe uma capacidade de crescimento rápido (divisão binária entre 20 a 60 minutos) com requisitos nutricionais simples e uma enorme plasticidade

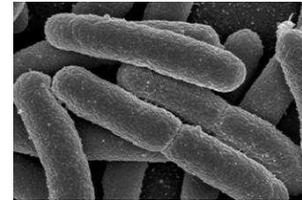


Figura 1.1. – *Escherichia coli* (adaptado de <http://www.universityofcalifornia.edu>. Acedido em Setembro, 2007).

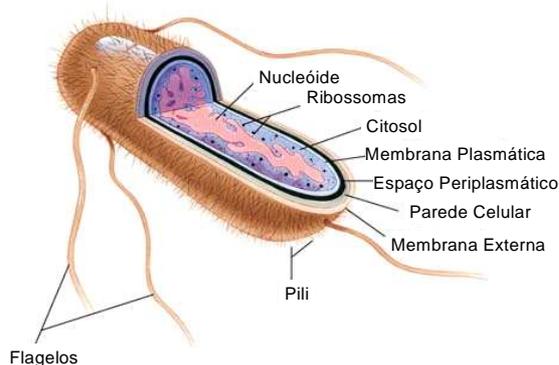


Figura 1.2. – Representação esquemática de *E. coli* e seus componentes celulares (adaptado de <http://www.canariculturacolor.com>. Acedido em Setembro, 2007).

positiva, isto é, capaz de fermentar a lactose e produzir ácido e gás a temperaturas de incubação elevadas (+/- 45 °C), num curto período de tempo (Lehninger *et al.*, 1993 e Cooper, 2000). O DNA desta bactéria corresponde a uma molécula circular simples que forma o nucleóide. A existência de uma quantidade elevada de ribossomas no citoplasma é responsável pela sua aparência granular e é uma evidência da elevada capacidade de resposta metabólica desta bactéria assente num “sistema operativo” simples e reduzido como é evidenciado pelo tamanho reduzido do seu genoma (já sequenciado). Este conjunto de factores permite-lhe uma capacidade de crescimento rápido (divisão binária entre 20 a 60 minutos) com requisitos nutricionais simples e uma enorme plasticidade

metabólica o que faz dela um aliciante modelo para estudos em microbiologia e em bioquímica microbiana (Prescott *et al.*, 1999; Cooper, 2000 e Molloy *et al.*, 2000).

1.1.2. Epidemiologia

Apesar de ser um microrganismo comensal, *E. coli* pode se tornar um patógeno oportunista causando infecções graves em especial em crianças ou no caso de debilidade imune do hospedeiro, estando associado a um aumento da morbidade e mortalidade (Piddock, 2006a).

As infecções causadas por este microrganismo podem ser consequência da colonização por estirpes de outros indivíduos não reconhecidas pelo sistema imunitário ou por disseminação das estirpes comensais da flora intestinal, normalmente associado a quebras na barreira imune do hospedeiro. Igualmente, estas estirpes podem adquirir factores de virulência através de bacteriófagos ou DNA plasmídico contendo enterotoxinas ou factores de invasão que as tornam extremamente virulentas. De acordo com os factores de virulência existem as seguintes categorias de *E. coli* patogénicas: *E. coli* enteropatogénicas (EPEC), *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC), *E. coli* enteroagregativas (EAEC), *E. coli* enteroinvasivas (EIEC); *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC) *E. coli* difusamente aderentes (DAEC) (<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4a.html>. Acedido em Agosto, 2007).

As principais doenças provocadas por esta bactéria correspondem a infecções do trato urinário, sepsis, meningites e diarreia infecciosa. Está ainda associada a intoxicações alimentares (gastroenterites), apendicite, colicistite, peritonite, infecções de feridas e pneumonia. As categorias ETEC e EPEC são a causa mais comum de diarreia nos países sub-desenvolvidos na população local e em viajantes que para lá se deslocam (Rice, 2006 e Piddock, 2006b).

Recentemente, tem-se assistido à emergência de resistência associada à expressão de β -lactamases de espectro alargado (ESBL - *Extended-Spectrum Beta-Lactamases*) num número crescente de isolados de *E. coli*. Este é um grave problema pois o seu tratamento envolve agentes de segunda e terceira linha que são em geral substratos de bombas de efluxo (BE), pelo que a pressão selectiva sobre estas espécies leva a uma maior selecção de estirpes multiresistentes e panresistentes (Paterson, 2006 e Piddock, 2006a).

1.1.3. Parede Celular e Porinas – Barreira de Permeabilidade

A parede celular das bactérias Gram-negativas, e em particular de *E. coli*, engloba três camadas definidas morfológicamente. A camada interna é a membrana citoplasmática que regula a passagem de metabolitos para o interior e exterior do citoplasma, bem como o pH e pressão osmótica. Externamente situa-se uma fina camada de peptidoglicanos que confere rigidez e forma à célula. É uma estrutura elástica, flexível e relativamente porosa. A existência de uma camada adicional - a membrana externa - composta por lípidos e polissacáridos (lipopolissacáridos (LPS)) e proteínas distingue estas bactérias das Gram-positivas e é responsável, em parte, pela sua maior resistência. Esta é composta por uma bicamada fosfolipídica semelhante à que constitui a membrana citoplasmática estando ligada ao peptidoglicano por lipopoliproteínas. Actua como uma barreira

impermeável e protectora, prevenindo ou atrasando a entrada de diversos compostos nomeadamente substâncias tóxicas. O espaço entre esta estrutura e a camada de peptidoglicanos é designado por espaço periplasmático onde se podem acumular grande número de moléculas que aguardam entrada ou saída da célula e onde ocorre uma elevada actividade enzimática (Molloy *et al.*, 2000 e Stratton, 2002).

Ancoradas na membrana externa encontram-se as porinas pertencentes à família das proteínas estruturais da membrana que formam canais hidrofílicos permitindo a difusão não específica de pequenas moléculas (Prescott *et al.*, 1999; Nikaido, 2003 e Kumar e Schweizer, 2005). Em *E. coli* as duas principais porinas também designadas *Outer Membrane Proteins* (OMP) são a OmpC e OmpF, consistindo em cilindros de 16 folhas β que definem um poro transmembranar na membrana externa (Nikaido, 2003 e Viveiros *et al.*, 2007). Os poros formados por OmpF são ligeiramente maiores que os formados por OmpC o que torna esta última menos permeável a moléculas de grandes dimensões. A expressão das porinas é máxima em condições ambientais óptimas, sendo ajustada quando necessário para minimizar a penetração de compostos nocivos ou maximizar a entrada de nutrientes (Viveiros *et al.*, 2007).

O mecanismo de regulação da expressão das porinas é complexo e depende de uma diversidade de factores ambientais, como sejam limitação nutricional, temperatura, osmolaridade, pH, taxa de crescimento e densidade celular (Liu e Ferenci, 2001). O mecanismo mais simples e melhor estudado corresponde ao sistema *envZ-ompR* (Liu e Ferenci, 2001). De um modo simples e genérico, os genes que codificam para OmpC e OmpF são regulados transcricionalmente por este sistema regulatório composto pelas proteínas OmpR e EnvZ. Esta última, tratando-se de uma fosforilase, detecta alterações na actividade osmótica e tem um papel na fosforilação e desfosforilação de OmpR. Na presença de elevada osmolaridade ocorre a fosforilação de OmpR (OmpR-P). Quando a concentração de OmpR-P aumenta, a transcrição de *ompC* é estimulada e ocorre a repressão de *ompF*. Para níveis reduzidos de OmpR-P, ou seja, em condições de baixa osmolaridade é activada a acção da EnvZ fosfatase que desfosforila OmpR-P e ocorre o inverso. No entanto, o gene *ompF*, que tem afinidade para locais de ligação de OmpR, é transcrito mesmo para níveis reduzidos de OmpR-P (isto é, baixa osmolaridade) dado que a sua expressão, mesmo a níveis basais é essencial à sobrevivência da bactéria. Por outro lado, o aumento da temperatura provoca o incremento da transcrição da RNA antisense, *micF*. Este liga-se ao mRNA de *ompF* inibindo a sua tradução em condições que obriguem à diminuição da síntese de porinas (Liu e Ferenci, 2001 e Nikaido, 2003). Outras moléculas e reguladores globais estão envolvidos na regulação destes sistemas, como seja o regulador universal *marA*, todos eles respondendo à maior ou menor necessidade de controlar a permeabilidade pelo aumento ou diminuição da síntese de porinas. Liu e Ferenci (2001) e Ferenci (2005) apresentam uma descrição mais aprofundada sobre a regulação das porinas.

No tracto intestinal *E. coli* está exposta a concentrações elevadas de sais biliare pelo que lhe é essencial minimizar o seu influxo. A pressão osmótica e temperatura elevadas, existentes nesse meio, favorecem a expressão de OmpC e reprimem a expressão de OmpF, diminuindo o influxo de sais biliare. OmpF será preferencialmente expressa nas condições inversas beneficiando o influxo de nutrientes, nomeadamente no caso de escassez de fontes de carbono como glucose (e.g. lagos).

Em condições de stress oxidativo, a presença de certos compostos químicos (e.g. salicilato) aumenta a transcrição de *micF* e previne-se a produção de OmpF. Também em condições de baixo pH (pH=5,2) a expressão de OmpF é reprimida e a de OmpC aumentada, permitindo à bactéria sobreviver em ambientes adversos (Nikaido, 2003). Associada a esta regulação transcripcional demonstrou-se recentemente, que a super expressão de uma pequena porina, OmpX, leva a um decréscimo na expressão de OmpC e OmpF e a uma diminuição na susceptibilidade a β -lactâmicos e outros antibióticos. O mecanismo de acção desta pequena porina ainda não foi compreendido mas crê-se que poderá funcionar como um inibidor directo do canal permeável das outras porinas funcionando como um mecanismo de resposta rápido.

Embora a OmpF e a OmpC sejam as principais porinas em *E. coli*, existem outras OMP's específicas para o transporte de certos nutrientes como sejam o fostato (PhoE), a maltose e as maltodextrinas (LamB), os nucleosídeos (Tsx), os iões ferro (FepA, FhuA), a vitamina B12 (BtuB) e os ácidos gordos (FadL). Algumas destas OMP's são receptores-alvo de bacteriófagos e uma vez que se situam na interface com o meio exterior são antigénios candidatos para o desenvolvimento de estratégias para a prevenção contra bactérias patogénicas (Molloy *et al.*, 2000).

A regulação da expressão das porinas, a par da regulação da bicamada fosfolipídica (LPS), permite controlar a permeabilidade da membrana externa, que actua como uma barreira selectiva contribuindo para o aumento da resistência aos antibióticos deste grupo de bactérias face às bactérias Gram-positivas. No entanto, mutantes das porinas apenas demonstram um pequeno incremento na concentração mínima inibitória (MIC – *Minimum Inhibitory Concentration*) aos antibióticos, pelo que outros mecanismos contribuem para a resistência intrínseca destas bactérias aos antibióticos (Viveiros *et al.*, 2007). Assim, os mesmos factores ambientais que contribuem para a diminuição da síntese das porinas contribuem para o aumento da expressão da principal bomba de efluxo de *E. coli*, o sistema AcrAB. A actuação simultânea destes factores contribui sinergicamente para a prevenção do influxo de substâncias tóxicas na célula e em última análise para a emergência de resistência a diversas substâncias (Liu e Ferenci, 2001; Nikaido, 2003 e Viveiros *et al.*, 2007).

1.2. Resistência Antimicrobiana

A resistência tem sido definida como a capacidade, temporária ou permanente, de um microrganismo e a sua descendência, em permanecer viável e/ou multiplicar-se sob condições que destruíram ou inibiriam membros da mesma estirpe (Cloete, 2003), ou seja, corresponde a um aumento da capacidade de sobreviver em presença de concentrações superiores de antibiótico, traduzido no aumento da MIC e conseqüente redução ou total afectação da eficiência clínica do antibiótico (Pallasch, 2003).

Em resposta à pressão crescente de antibióticos, erigida pela sua prescrição livre quer para humanos como animais, generalizando o seu uso, a utilização de doses e duração da terapêutica antimicrobiana inadequadas e o desconhecimento do perfil de sensibilidade dos microrganismos infectantes (falha/ausência de ferramentas adequadas de diagnóstico) levou a que estes desenvolvessem e estabilizassem vários mecanismos de resistência, para evitar os seus efeitos

bactericidas ou bacteriostáticos. Estas estratégias estão a comprometer a utilidade da terapia antimicrobiana e a tornarem-se num problema crescente de saúde pública quer na comunidade quer em ambientes hospitalares (Lomovskaya e Watkins, 2001a; Pena *et al.*, 2002; Pallasch, 2003 e Hooper, 2005).

1.2.1. Mecanismos de Resistência Antimicrobiana

Do ponto de vista molecular e bioquímico a resistência a antibióticos ocorre tipicamente como resultado de um ou mais dos seguintes mecanismos: **(1)** inactivação enzimática do agente antimicrobiano; **(2)** alteração da molécula alvo e **(3)** redução da acumulação do agente antimicrobiano por diminuição da permeabilidade da membrana e/ou aumento da actividade de efluxo (Hogan e Kolter, 2002; Kumar e Schweizer, 2005; Marquez, 2005; Gootz, 2006; Yamada *et al.*, 2006 e Poole, 2007). Estes correspondem aos mecanismos de resistência bacteriana clinicamente mais relevantes (Langton *et al.*, 2005).

1.2.1.1. Inactivação Enzimática

A inactivação enzimática do agente antimicrobiano é um mecanismo comum de resistência que permite modificar/degradar o composto estranho à célula tornando-o ineficaz (McDonnel e Russel, 1999). Uma vez que muitos antibióticos são produzidos por organismos existentes no solo, esta é uma estratégia comum adoptada pelos restantes microrganismos de modo a garantir a sua sobrevivência. Por outro lado, dado que os genes que codificam para estas enzimas predominam em plasmídeos e transposões são facilmente disseminados pelas bactérias patogénicas à medida que aumenta a pressão selectiva que advém do uso de antibióticos. Os agentes antimicrobianos podem ser inactivados por inactivação enzimática ou modificação química (Powell, 2000). O exemplo clássico da primeira estratégia de resistência consiste na hidrólise do anel dos antibióticos β -lactâmicos (e.g. penicilinas e cefalosporinas) por β -lactamases (Figura 1.3.). As bactérias produtoras deste enzima secretam-no para o espaço periplasmático onde hidrolizam o anel β -lactâmico destes antibióticos, resultando numa molécula linear incapaz de se ligar ao receptor PBPs (*Penicillin-Binding Proteins*) na membrana citoplasmática. Uma única β -lactamase é capaz de hidrolisar 1000 moléculas de antibióticos β -lactâmicos por segundo (Walsh, 2000; McKeegan *et al.*, 2002 e Pallasch, 2003). Esta pode ser uma característica intrínseca, resultar de uma mutação que desreprime a síntese dos genes cromossómicos ou pode ser adquirida horizontalmente por elementos genéticos móveis (plasmídeos ou transposões) (Poole, 2002).

De entre os problemas mais comuns colocados por estas enzimas hidrolíticas constam: a fácil disseminação genética dos elementos que os codificam, tendência para inibir rapidamente novos agentes antimicrobianos e aumento da resistência aos inibidores de β -lactamases (e.g. ácido clavulânico) (Pallasch, 2003).

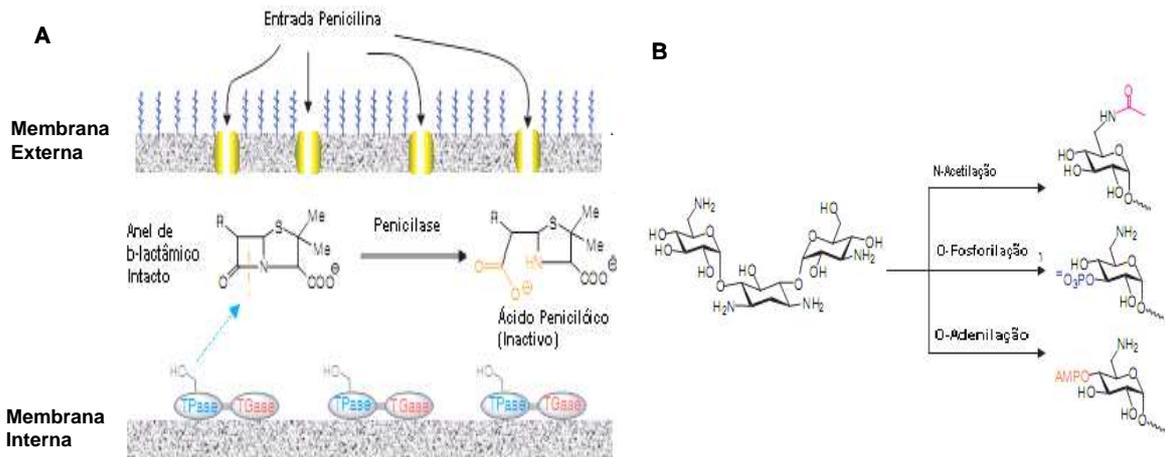


Figura 1.3. – Mecanismos de inativação enzimática. **A.** Hidrólise da penicilina pela β -lactamase antes de atingir o alvo (PBP) na membrana citoplasmática numa bactéria Gram-negativa. **B.** Processos de modificação enzimática da canamicina (adaptado de Walsh, 2000).

Outros enzimas bacterianos actuam modificando os antibióticos por adição de grupos químicos, o que resulta num decréscimo da afinidade do antibiótico ao alvo (Figura 1.3.). Um exemplo típico são as acetiltransferases que alteram o cloranfenicol convertendo-o numa forma mono ou di-acetato. De um modo semelhante, a acetilação, fosforilação e adenilação de aminoglicosidos pelo enzima correspondente (acetil-, fosforil – e adenil transferases, respectivamente) reduz a afinidade destes antibióticos ao respectivo alvo no RNA no ribossoma, pelo que não se ligam e interrompem a síntese proteica (Walsh, 2000; McKeegan *et al.*, 2002; Poole, 2002 e Pallasch, 2003).

1.2.1.2. Alteração da Molécula Alvo

Este processo consiste na “reprogramação” ou “camuflagem” da molécula alvo (receptor) (Walsh, 2000), resultando numa redução ou inibição total da afinidade do agente antimicrobiano ao alvo. A modificação do local da ligação pode originar a utilização de novas vias metabólicas que não usam o antibiótico como substrato, fazendo com que este seja ineficaz (Masterton, 2003). Um exemplo típico, e amplamente disseminado, é o desenvolvimento de resistência clínica à meticilina por *Staphylococcus aureus* (MRSA – *Methicilin Resistant Staphylococcus aureus*) originada pela aquisição do gene *mecA* que codifica uma PBP de baixa afinidade a este antibiótico e outros β -lactâmicos. A resistência à penicilina pode ainda advir de mutações

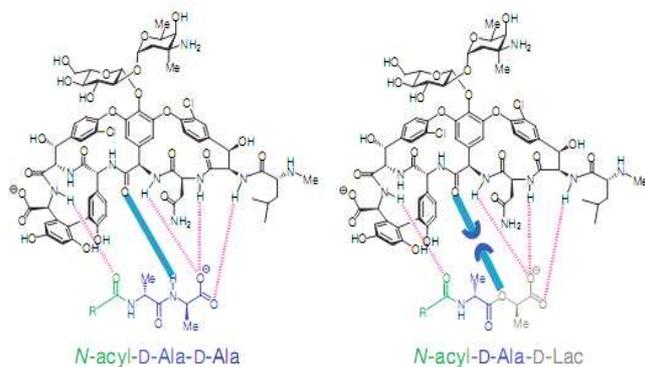


Figura 1.4. – Alteração da ligação amida do terminal D-Ala-D-Ala do peptidoglicano na ligação ester do terminal D-Ala-D-Lac. Redução de 1000 vezes na afinidade para o substrato (retirado de Walsh, 2000).

nas PBPs bem como da expressão de outras PBPs com menor afinidade ao antibiótico. Igualmente a utilidade do único antibiótico eficaz no combate a MRSA - vancomicina – está comprometida.

Este antibiótico provoca a disrupção da síntese da parede celular por ligação ao terminal D-Ala-D-Ala do UDP-N-acetilmuramyl-pentapeptido, precursor do peptidoglicano impedindo a ligação cruzada deste. A resistência a este composto resulta da síntese de um pentapéptido precursor possuindo um terminal alterado (D-Ala-D-lac ou D-Ala-D-ser), catalizado pelos produtos do gene *van*. Este tem menor afinidade à vancomicina, o que irá permitir a síntese completa da parede celular (Walsh, 2000; McKeegan *et al.*, 2002 e Poole, 2002).

Outros exemplos da resistência por modificação da molécula alvo são a resistência a fluoroquinolonas que é atribuída a mutações nos seus alvos (DNA girase (*gyrA*) e topoisomerase IV(*parC*)) e a resistência a tetraciclina, macrólidos e aminoglicosídeos que é atribuída a mutações no DNA que codifica partes integrantes da estrutura dos ribossomas (Walsh, 2000; McKeegan *et al.*, 2002 e Poole, 2002).

1.2.1.3. Redução da Acumulação do Agente Antimicrobiano: Barreiras de Permeabilidade e Actividade de Efluxo

1.2.1.3.1. Permeabilidade da Membrana Externa

Para que os antibióticos exerçam os seus efeitos bacteriostáticos ou bactericidas têm de aceder aos seus alvos intracelulares (Poole, 2002), tendo para tal que ultrapassar barreiras físicas e acumular em concentrações tais que possam actuar num período de tempo razoável (Walsh, 2000). Existem diversas estratégias através das quais ocorre a redução da acumulação intracelular dos antibióticos: alteração da estrutura da membrana celular, alteração ou redução de porinas e efluxo activo (Langton *et al.*, 2005) (Figura 1.5.). Uma estratégia intrínseca de auto protecção é a construção de uma barreira externa de permeabilidade, que protege os microrganismos dos agentes químicos produzidos pelo hospedeiro, existentes livres na natureza ou introduzidos pelo Homem (Nikaido, 2001). Todas as bactérias possuem uma membrana citoplasmática que retém metabolitos e macromoléculas intracelulares e as protege do ambiente externo. No entanto, em bactérias Gram-negativas esta barreira de permeabilidade corresponde, essencialmente, à membrana externa de lipopolissacáridos (LPS) e, explica, em parte, a maior resistência destas face às bactérias Gram-positivas (Nikaido, 2001; Poole, 2002 e Langton *et al.*, 2005). Exemplos de agentes aos quais as bactérias Gram-negativas demonstraram índices elevados de resistência intrínseca são as penicilinas lipofílicas (*e.g.* oxacilina), eritromicina, novobiocina, ácido fusídico, quinolonas, algumas rifamicinas e recentes agentes antimicrobianos sintéticos como as oxazolidinonas. Cerca de 90% dos agentes antimicrobianos de origem natural demonstraram ser eficazes contra bactérias Gram-positivas enquanto não tinham actividade suficiente contra *E. coli* (Nikaido, 1998). A constatação da importância desta estrutura na resistência adveio da observação de que perturbações na membrana externa por agentes químicos aumentam a susceptibilidade bacteriana (Nikaido, 2001) e pela constatação de que nela existem diversos mecanismos que permitem a redução da entrada de

agentes antimicrobianos em particular através de canais não específicos, as porinas (ponto 1.1.3. da introdução) que impõem diversas restrições ao influxo dos solutos. Adicionalmente verificou-se a existência de mecanismos mais ou menos específicos de efluxo de substâncias nocivas, as bombas de efluxo. Estas têm uma actividade mais especializada no controlo da permeabilidade enquanto o movimento generalizado de moléculas essenciais, de e para a célula bacteriana Gram-negativa, é feito através do controlo dos canais de transporte membranar (porinas). Apesar de serem estruturas sem a capacidade de selecção de moléculas a transportar as porinas podem restringir o transporte de diferentes moléculas por diferentes mecanismos (Nikaido, 2001 e McKeegan *et al.*, 2002).

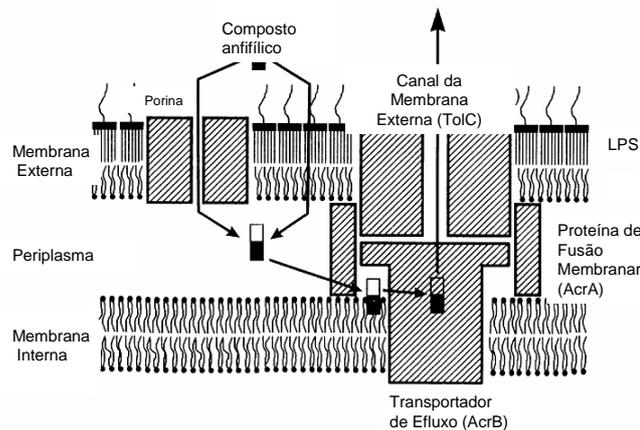


Figura 1.5. – Permeabilidade da membrana externa e sistemas de efluxo em bactérias Gram-negativas (adaptado de Nikaido, 2001).

1.2.1.3.1.1. Restrições pelo tamanho

O diâmetro do poro ($11 \times 7 \text{ \AA}$) formado pela maior porina de *E. coli* (OmpF, dimensão igual a 38 KDa) permite o influxo de nutrientes importantes à célula, mas impede a entrada da maioria dos antibióticos de maior dimensão no meio intracelular (Nikaido, 1998 e McKeegan *et al.*, 2002), tal como a maioria das porinas que têm menor dimensão que OmpF. Solutos flexíveis com peso molecular relativamente elevado mas com uma área de secção pequena podem passar através das porinas apesar de lentamente, como polietilenoglicol (Nikaido, 2001).

1.2.1.3.1.2. Restrições devido à hidrofobicidade

A localização de moléculas de água junto aos poros faz com que as porinas constituam uma via primordial para a entrada de moléculas hidrofílicas de pequenas dimensões. Em oposição, a passagem de moléculas lipofílicas e anfifílicas (hidrofílicas e/ou hidrofóbicas) através destas estruturas é extremamente lenta (Nikaido, 2001; Hogan e Kolter, 2002 e McKeegan *et al.*, 2002). No entanto, estes compostos podem penetrar no interior da célula por difusão através da membrana externa de LPS, dissolvendo-se no interior da cadeia de hidrocarbonetos da bicamada lipídica e redissolvendo-se na fase aquosa no interior da célula (Nikaido, 1998 e McKeegan *et al.*, 2002).

Compostos hidrofóbicos de maiores dimensões (e.g. vitaminas) entram no meio intracelular através de canais especializados (Nikaido, 1998; Hogan and Kolter, 2002 e McKeegan *et al.*, 2002).

1.2.1.3.1.3. Restrições devido à carga

De entre as cefalosporinas aquelas com maior carga negativa atravessam mais lentamente as porinas que as monoaniónicas e estas mais lentamente que os compostos zwitteriões (Nikaido, 2001 e McKeegan *et al.*, 2002). Este efeito será devido à presença de maior densidade de resíduos de aminoácidos básicos, que determina a presença de cargas negativas em torno de OmpF (Nikaido, 2001). Ao contrário de OmpF e OmpC de *E. coli*, PhoE, expressa sob condições de privação de fosfato, prefere aniões.

1.2.1.3.1.4. Restrições devido ao número de canais activos

O número de canais activos determina o acesso do antibiótico ao alvo (McKeegan *et al.*, 2002), pelo que muitos microrganismos desenvolveram mecanismos de redução da permeabilidade celular quer por diminuição da expressão destes canais, com a consequente diminuição do seu número na membrana externa, quer pelo seu fecho (Pallasch, 2003). Um exemplo ilustrativo diz respeito às porinas ditas “lentas”. A permeabilidade da membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa* a solutos hidrofílicos é cerca de duas vezes inferior à de *E. coli*. Adicionalmente, a porina OprF, abundante na membrana externa de *P. aeruginosa*, permite apenas o influxo de pequenas moléculas apesar do seu limite de exclusão ser superior ao de OmpF de *E. coli*. Este aparente paradoxo foi explicado através de estudos relativos a OmpA de *E. coli*, porina homóloga de OprF de *P. aeruginosa*. Estes demonstraram que esta proteína pode conter duas conformações, sendo que apenas 2% dos poros estão sempre conformacionalmente activos, tal como sucede para OprF, enquanto 98% dos poros adoptam uma conformação na qual não formam um canal (Nikaido, 2001 e McKeegan *et al.*, 2002). Concluiu-se que para porinas lentas (como OmpA e OprF) a velocidade de influxo dos solutos é reduzida pela adopção de conformações alternativas das proteínas que as constituem estando o balanço entre os dois estados conformacionais dependente das solicitações ambientais (Nikaido, 2001).

A perda de porinas por mutação aumenta a resistência a antibióticos hidrofílicos, uma vez que, como referido, estes canais constituem a via primordial de entrada destes compostos na célula (Nikaido, 2001). No entanto, esta mutação gera uma desvantagem ao organismo mutante, uma vez que os nutrientes entrarão mais lentamente na célula (McKeegan *et al.*, 2002 e Nikaido, 2003).

Exemplos do aumento de resistência por perda de porinas reportam a resistência a β -lactâmicos, em espécies de *Klebsiella* e *Enterobacter aerogenes* (Nikaido, 2003). Em isolados clínicos, um dos primeiros exemplos relativos a resistência por perda de porinas é referente a espécies de *Serratia marcescens* que se tornaram resistentes simultaneamente a aminoglicosídeos e β -lactâmicos (Nikaido, 2003). Outro exemplo clássico é a perda da porina OprD, específica para carbapenemo em *P.*

aeruginosa, que ocorre em 50% dos pacientes tratados com o carbapenemo β -lactâmico, imipenemo (Nikaido, 1994 e Hancock, 1997).

Em suma, em bactérias Gram-negativas a membrana externa funciona como uma barreira de permeabilidade ao influxo de diversas substâncias (e.g. antibióticos, detergentes e corantes) (Kohler et al., 1999 e Viveiros et al., 2007), com as porinas a retardar a penetração de pequenas moléculas hidrofílicas e a reduzida fluidez desta estrutura a limitar a difusão de moléculas lipofílicas/hidrofóbicas (Kohler et al., 1999). No entanto, a diminuição da sua permeabilidade apenas retarda a entrada destes compostos na célula, contribuindo somente para níveis reduzidos ou basais de resistência intrínseca. Contudo, quando conjugado com outros mecanismos, como a actividade de efluxo, ocorre um aumento significativo da resistência intrínseca a uma substância específica (Nikaido, 2001; Pallasch, 2003 e Viveiros et al., 2007).

1.2.2. Mecanismos de Aquisição de Resistência

1.2.2.1. Resistência Intrínseca e Resistência Adquirida

A resistência pode ser uma característica natural - resistência intrínseca - , ou ser adquirida (Poole, 2005 e Guglielame et al., 2006). A resistência intrínseca (ou inata) define-se como uma característica natural, controlada cromossomicamente pela bactéria e que permite bloquear/conter a acção do agente antimicrobiano sendo expressa apenas na sua presença e por isso é uma característica transitória (McDonnel e Russel, 1999). Esta capacidade é conseguida sem que a bactéria adquira elementos de resistência externos (Powell, 2000). Na resistência adquirida populações de bactérias inicialmente susceptíveis tornam-se resistentes a determinado agente antimicrobiano, por ocorrência de mutações (evolução vertical) ou aquisição de material genético exógeno que codifica para a resistência (evolução horizontal), com a consequente selecção do mais apto. Este prolifera e dissemina-se sob condições de pressão selectiva na presença desse agente (Guglielame et al., 2006 e Tenover, 2006). As bactérias resistentes poderão tornar-se persistentes na natureza devido à estabilidade dos genes de resistência e dos elementos de transferência embora o mais frequente é desaparecerem do ambiente na ausência do factor de selecção pois os determinantes genéticos de resistência diminuem a sua aptidão (*fitness*) em comparação com a população com o genótipo selvagem (sensível) (Hogan e Kolter, 2002 e Marquez, 2005).

1.2.2.1.1. Resistência Intrínseca - Adaptação Fisiológica

Actualmente, tem-se prestado grande atenção à importância dos estados fisiológicos na sobrevivência das bactérias na presença de antibióticos. Sendo reconhecido que as bactérias possuem complexos mecanismos intrínsecos de resistência que lhes permite adaptar fisiologicamente às pressões antibióticas selectivas controlando de um modo hábil o seu estado de aptidão (Hogan e Kolter, 2002).

1.2.2.1.1.1. Fase Estacionária

A limitação nutricional traduz-se em taxas reduzidas de crescimento que são responsáveis pela redução da actividade metabólica e diminuição da permeabilidade, o que origina o aumento da resistência a múltiplos agentes antimicrobianos. Adicionalmente, verificou-se que culturas de *E. coli* em fase estacionária produzem um factor difusível que induz resistência a antibióticos nas células em crescimento e que se crê estar associado ao controlo transcripcional da expressão das porinas. Este factor é diferente dos conhecidos como *quorum sensing* e a natureza e resposta do sinal ainda não são conhecidas (Hogan e Kolter, 2002).

1.2.2.1.1.2. Variação Fenotípica

A susceptibilidade aos antibióticos está sempre associada a um decréscimo de aptidão para sobreviver num ambiente na presença de antibióticos, o *fitness* na designação anglosaxónica, e consequentemente as bactérias reagem com mecanismos fenotípicos e populacionais para atenuar a desvantagem no crescimento conferida pela presença destes compostos (Hogan e Kolter, 2002). A forma mais rápida e imediata de resposta a esta pressão é a variação fenotípica onde intervêm os mecanismos que são objecto de estudo neste trabalho, a variação da permeabilidade e o transporte de moléculas para o exterior da célula (Kohler *et al.*, 1999 e Viveiros *et al.*, 2007). Embora esta resposta seja a nível de cada célula, no conjunto da população bacteriana desenvolvem-se igualmente respostas de grupo que ampliam grandemente a efectividade e consequentemente a resistência aos antibióticos.

1.2.2.1.1.3. Biofimes

A dificuldade no tratamento de infecções por biofilmes (associação de microrganismos agregados em extensas camadas de exopolissacáridos) deve-se ao aumento da resistência das bactérias que o constituem. Os mecanismos convencionais de resistência (controlo de permeabilidade e actividade de efluxo, inactivação enzimática e alteração da molécula alvo) não são suficientes para explicar, por si só, o elevado nível de resistência das bactérias no biofilme. Por outro lado, quando as bactérias são dispersas do biofilme, tornam-se rapidamente susceptíveis aos antibióticos o que sugere que a resistência não é adquirida (via mutações ou por elementos genéticos móveis) mas sim intrínseca e potenciada pela associação das células no biofilme onde cohabitam diferentes populações com diferentes fenótipos (Stewart e Costerton, 2001). Deste modo, a resistência nos biofilmes tem sido associada à limitação difusional do antibiótico que se traduz num abrandamento (se o antibiótico for degradado) ou incompleta penetração do agente no biofilme. Esta é função de interações iónicas, viscosidade, limite de exclusão e aumento da distância a percorrer pelo agente antimicrobiano (Stewart e Costerton, 2001 e Cloete, 2003). Recentemente, tem sido proposto como mecanismo de resistência, a existência de subpopulações de microrganismos que formam um estado fenotípico único e altamente protegido, num estado semelhante ao de formação de esporos (Stewart e

Costerton, 2001 e Hogan e Kolter, 2002). Taxas reduzidas de crescimento resultantes de limitação nutricional são acompanhadas pelo aumento da resistência a múltiplos agentes antimicrobianos, devido à redução da actividade metabólica e consequente diminuição da permeabilidade (Hogan e Kolter, 2002 e Cloete, 2003). A alteração química do microambiente por gradientes de concentração de nutrientes, oxigénio, diferenças de pH por acumulação de desperdícios ácidos, é um fenómeno descrito em biofilmes (Figura 1.6.). Os mecanismos de resistência dependem não só da matriz que compõe o biofilme como também do antibiótico que o penetra admitindo-se que todos os mecanismos de resistência intrínseca anteriormente descritos cooperem entre si para os diferentes níveis de resistência a actuar na matriz dos biofilme.

A resistência em biofilmes tem sérias implicações económicas e ambientais, afectando diversos sectores de actividade que vão desde a rede de distribuição de água, passando pelas indústrias alimentar, do papel, entre outras (Hogan e Kolter, 2002 e Cloete, 2003). Os biofilmes assumem particular relevância ao nível da contaminação hospitalar, onde as bactérias aderem a implantes médicos (e.g. dispositivos ortopédicos), catéteres e tecidos danificados resultando no aumento da taxa de infecção dos pacientes, sendo mesmo a causa de infecções persistentes, podendo durar meses, anos ou até mesmo toda a vida (McDonnel e Russel, 1999; Stewart e Costerton, 2001 e Hogan e Kolter, 2002).

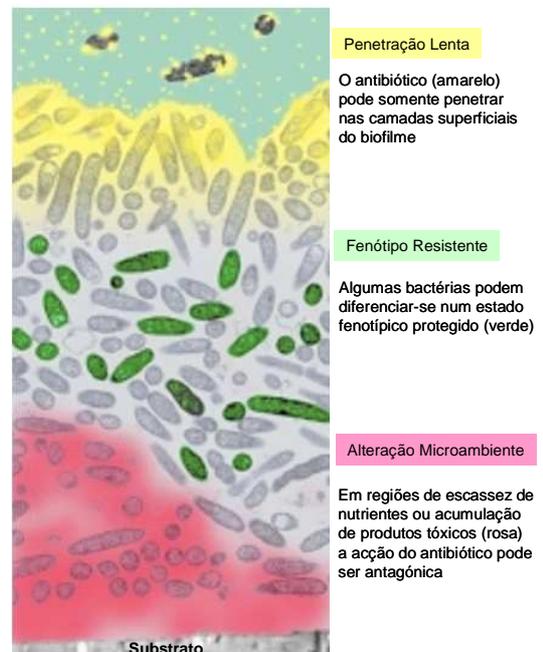


Figura 1.6. – Hipotéticos mecanismos de resistência em biofilmes (adaptado de Stewart e Costerton, 2001)

1.2.2.1.2. Resistência Adquirida

1.2.2.1.2.1. Mutações

A resistência adquirida por via de mutações cromossómicas é um fenómeno que ocorre com baixa probabilidade (um para um milhão de divisões celulares). No entanto, a sua ocorrência em bactérias alojadas no hospedeiro é superior à observada *in vitro*, sendo mais frequente em populações bacterianas regularmente sujeitas a antibioterapia como é o caso de pacientes internados em hospitais, idosos em lares ou imunosuprimidos crónicos (Prescott *et al.*, 1999 e Pallasch, 2003). As mutações espontâneas podem causar resistência por: **(1)** alteração da proteína alvo a que o agente antimicrobiano se liga, modificando ou eliminando o local de ligação (e.g. alteração de PBPs nos β -lactâmicos); **(2)** aumento da produção de enzimas que inactivam o agente antimicrobiano; **(3)** alteração da expressão ou da estrutura dos componentes proteicos de um canal da membrana

externa (e.g, alterações nas Omps) e 4) activação da expressão de bombas de efluxo que expulsam o agente antimicrobiano do meio intracelular (e.g. efluxo de fluoroquinolonas) (Tenover, 2006).

1.2.2.1.2.2. Aquisição de Material Genético Exógeno

A evolução horizontal pode ocorrer entre estirpes da mesma espécie ou entre bactérias de estirpes e géneros distintos. Os mecanismos de transferência genética incluem a conjugação, a transformação e a transdução e estão envolvidos diversos elementos transmissíveis: bacteriófagos, plasmídeos, transposões e integrões (Pallasch, 2003 e Tenover, 2006).

Na conjugação a informação genética é transferida por via de plasmídeos, transposões e integrões através de estruturas proteicas designadas por *pillus* sexual, no caso de bactérias Gram-negativas (Pallasch, 2003 e Tenover, 2006). Estes elementos genéticos transportam não só genes de resistência a antibióticos como também genes de virulência responsáveis por danos directos ou indirectos, via resposta inflamatória, no hospedeiro (Prescott *et al.*, 1999 e Pallasch, 2003).

A transformação é o processo através do qual as bactérias adquirem e incorporam segmentos de DNA livre do ambiente circundante, em geral proveniente da lise de outras bactérias. Este fenómeno não é muito comum e requer a interacção entre a ligação de genes, entrada e sua integração no cromossoma. Pelo menos 50 bactérias, incluindo *Streptococcus pneumoniae*, são capazes de efectuar este tipo de fenómeno (Prescott *et al.*, 1999; Pallasch, 2003 e Tenover, 2006).

Na transdução os genes de resistência são transferidos entre bactérias através de bacteriófagos (vírus bacterianos). O bacteriófago infecta a bactéria injectando uma molécula de ácido nucleico que será utilizada como molde para a síntese de mRNAs virais e de novos genomas virais. A tradução deste fragmento leva à produção de uma série de enzimas e proteínas estruturais envolvidas no ciclo de desenvolvimento do fago que muitas vezes incluem determinantes de resistência aos antibióticos. Julga-se que este é um fenómeno raro (Prescott *et al.*, 1999; Pallasch, 2003 e Tenover, 2006).

1.3. Bombas de Efluxo

Uma mecanismo cada vez mais prevalente de resistência, associado à diminuição da permeabilidade da membrana corresponde ao efluxo activo de antibióticos (Langton *et al.*, 2005). As bombas de efluxo são proteínas ubíquas transportadoras localizadas na membrana celular, existentes em procariontes e eucariontes (Webber e Piddock, 2003; Langton *et al.*, 2005; Marquez, 2005 e Pagès *et al.*, 2005).

Este fenómeno foi pela primeira vez reconhecido como mecanismo de resistência por S. Levy e seus colaboradores em 1978, em isolados de *E. coli* resistentes à tetraciclina tendo sido, até à data, o último mecanismo de resistência a ser identificado (Kohler *et al.*, 1999, Bambeke *et al.*, 2006 e Poole, 2007). Desde então, tem sido demonstrado que o efluxo de agentes antimicrobianos pode ser mediado por mais de uma bomba de efluxo num único microrganismo e que a maioria dos antibióticos estão sujeitas a este mecanismo de resistência o que afecta a eficácia dos antibióticos antigos e recentes (Lomovskaya e Bostian, 2006). Este mecanismo de resistência pode ser adquirido, ou ser uma característica intrínseca que resulta da expressão de bombas de efluxo constitutivas. Existem

evidências de que o tamanho do genoma se reflecte proporcionalmente no número de genes que codificam para as BE sendo uma medida da plasticidade das bactérias em se adaptarem ao ambiente e às suas variações extremas (Pidcock, 2006a).

1.3.1. Evolução e Funções Naturais dos Sistemas de Efluxo

Os sistemas de efluxo podem actuar selectivamente sobre um antibiótico ou classe de antibióticos (e.g. bomba de efluxo Tet, responsáveis pelo efluxo de tetraciclinas em *E. coli* ou BE Mef de *Streptococcus pneumoniae* específicas para macrólidos) ou, pelo contrário, uma única proteína pode conferir resistência a uma diversidade de compostos estruturalmente distintos com diferentes modos de acção (e.g. transportadores RND de bactérias Gram-negativas). Estas designam-se por bombas de efluxo de resistência a múltiplos compostos - MDR (*Multidrug Resistance*) (Hooper, 2005; Lomovskaya e Bostian, 2006; Pidcock, 2006b; Poole e Lomovskaya, 2006 e Poole, 2007).

1.3.1.1. Bombas de Efluxo Específicas

Os genes que codificam para o efluxo específico de certas classes de antibióticos encontram-se, tipicamente, em elementos genéticos móveis (e.g. transposões, integrões e plasmídeos), tendo estes sido, eventualmente, adquiridos a partir de outros microrganismos, porventura produtores de antibióticos onde funcionam como um mecanismo de auto protecção. Assim, os genes que codificam BE localizados em plasmídeos podem ser facilmente adquiridos por outras bactérias onde repliquem contribuindo para a disseminação da resistência (Hooper, 2005 e Poole, 2005).

1.3.1.2. Bombas de Efluxo MDR

Em oposição, os genes que codificam para as bombas de efluxo responsáveis pela multirresistência são quase invariavelmente constituintes naturais dos cromossomas bacterianos, sendo expressos constitutivamente (contribuindo para a resistência intrínseca) ou após mutação dos seus mecanismos de regulação (onde são responsáveis pela resistência adquirida) (Poole, 2007). Estes estão presentes quer em bactérias susceptíveis como em bactérias resistentes a antibióticos, sendo que a sua expressão pode ser induzida pelos seus substratos, condições ambientais e mutações nos genes regulatórios, de modo a que estirpes aparentemente susceptíveis possam super expressar a proteína de efluxo e tornar-se resistentes (Hooper, 2005 e Pidcock, 2006a). Assim, as bactérias têm o potencial de desenvolver resistência a múltiplas drogas sem aquisição de determinantes de resistência específicos, devendo-se tal facto apenas ao aumento do seu efluxo. Este pode ser devido à simples desrepressão ou indução da expressão genética de BE em resposta a um estímulo ou mediado por mutações: (1) no gene repressor local; (2) no gene regulatório global; (3) na região promotora do gene transportador ou (4) por inserção de elementos a montante do gene transportador (Lomovskaya e Watkins, 2001 e Pidcock 2006a). Esta estratégia permite que a bactéria sobreviva por um período mais alargado de tempo, o que aumenta o número de efectivos da população sob

antibioterapia, de modo que aumenta a frequência com que podem ocorrer mutações em outros genes, tais como os que codificam proteínas alvo. Consequentemente aumenta a probabilidade de se estabilizar e acumular nessa população mutações para a resistência (Webber e Piddock, 2003 e Piddock, 2006a). Deste modo, tem sido sugerido que o aumento da expressão de BE possa ser o primeiro passo para que a bactéria se torne totalmente resistente. Conjugam-se assim a variação fenotípica por aumento do efluxo que permite a sobrevivência inicial ao choque antibiótico, a biologia das populações bacterianas que garante o número de efectivos na população sobrevivente, de onde, por fim, emerge um mutante resistente que se propaga no ambiente selectivo (Piddock, 2006a).

Os sistemas de efluxo bacterianos não têm como função primária o efluxo de antibióticos pois estes sistemas são anteriores à era dos antibióticos (Piddock, 2006b e Poole, 2007). Estudos recentes evidenciaram que os antibióticos são substratos “oportunistas”, que criaram a pressão selectiva necessária para a super expressão das BE, como um mecanismo não específico de resposta, pois estes sistemas têm originalmente uma dupla função fisiológica natural. Por um lado, o transporte de moléculas endógenas pouco difusíveis (remoção de toxinas, metabolitos intracelulares, produtos finais da fermentação) e por outro o efluxo de substâncias difusíveis potencialmente nocivas (toxinas e agentes antimicrobianos presentes no ambiente), permitindo a sua sobrevivência em ambientes hostis, numa função de auto protecção (Kumar e Schweizer, 2005; Marquez, 2005; Poole, 2005; Bambeke *et al.*, 2006 e Lynch, 2006).

A observação da indução dos sistemas de efluxo bacteriano na presença de sais biliares em bactérias cujo habitat natural é o trato gastrointestinal (rico em ácidos gordos e sais biliares), e a hipersusceptibilidade de mutantes destes sistemas a estes compostos demonstrou a importância destes no efluxo e protecção contra substâncias nocivas (Kumar e Schweizer, 2005 e Piddock, 2006a). Em bactérias produtoras de antibióticos estes sistemas conferem imunidade aos compostos produzidos bem como permitem a protecção contra antibióticos produzidos por competidores ambientais (Walsh, 2000 e Lynch, 2006).

Os sistemas MDR estão expressos em bactérias Gram-positivas como em Gram-negativas. Contudo, é nas bactérias Gram-negativas que exercem o maior efeito ao nível da resistência intrínseca e adquirida, alterando várias ordens de magnitude a susceptibilidade bacteriana. Tal deve-se ao efeito combinado da barreira de permeabilidade formada pela membrana externa e o efluxo onde o substrato é capturado directamente do espaço periplasmático e enviado para o meio extracelular (Lomovskaya e Bostian, 2006).

1.3.2. Estrutura das Bombas de Efluxo

As BE podem ser formadas por um componente ou constituírem estruturas multicomponentes (Cristóbal *et al.*, 2006 e Piddock, 2006b). Em bactérias Gram-positivas as BE excretam o substrato directamente para o meio extracelular através da membrana citoplasmática, sendo estas BE constituídas por um só componente. Estas bombas de efluxo estão igualmente presentes em algumas bactérias Gram-negativas e, como resultado, o substrato é excretado para o espaço periplasmático (*e.g.* bombas de efluxo Tet(A)). No entanto, nestas bactérias existem BE que efectuem

o efluxo do substrato directamente para o meio extracelular, ultrapassando o espaço periplasmático e a membrana externa (Figura 1.7.). Estes sistemas de efluxo estão organizados em estruturas multicomponentes que atravessam as membranas interna e externa (Lomovskaya e Watkins, 2001a e Cristóbal *et al.*, 2006). Esta estrutura de BE é exclusiva das bactérias Gram-negativas e como exemplos melhor caracterizados constam os sistemas AcrAB-TolC de *E. coli* e MexAB-OprM de *P. aeruginosa* (Pagès *et al.*, 2005 e Cristóbal *et al.*, 2006). Os sistemas multicomponentes constituem, tipicamente, estruturas tripartidas e englobam uma proteína transportadora, localizada na membrana interna (*e.g.* AcrB e MexB de *E. coli* e *P. aeruginosa*, respectivamente); uma proteína membrana de fusão (MFP – *Membrane Fusion Protein*) localizada no espaço periplasmático (*e.g.* AcrA e MexA de *E. coli* e *P. aeruginosa*, respectivamente) e uma proteína da membrana externa (OMP) que forma um canal (*e.g.* TolC e OprM, de *E. coli* e *P. aeruginosa*, respectivamente) (Mckeegan *et al.*, 2003 e Piddock, 2006a). O efluxo directo para o meio extracelular cria a possibilidade de dois mecanismos de resistência (barreira de permeabilidade da membrana externa e efluxo activo de múltiplas drogas) actuarem sinergeticamente de modo a que a célula adquira um potente mecanismo de defesa, como anteriormente referido. Adicionalmente, reduz-se a concentração de substâncias não só no citoplasma como também no espaço periplasmático, o que pode explicar o facto de as BE protegerem as bactérias contra antibióticos β -lactâmicos uma vez que as proteínas receptoras das penicilinas se localizam neste espaço (Lomovskaya e Watkins, 2001a e Nikaido, 2001). Igualmente, em bactérias Gram-negativas, a expressão combinada de BEs compostas por um componente e BEs multicomponente produz um efeito multiplicativo no nível de resistência uma vez que as moléculas são bombeadas para o espaço periplasmático e daí para o meio extracelular (Nikaido, 2001 e Palmer, 2003).

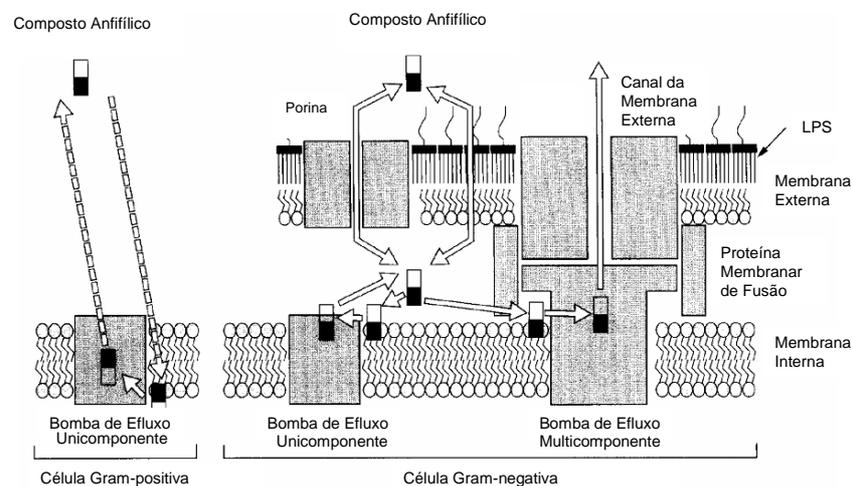


Figura 1.7. – Diversidade estrutural de BE em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (adaptado de Nikaido, 1998).

1.3.3. Diversidade Biológica das Bombas de Efluxo

Os sistemas de efluxo efectuam o transporte dos seus substratos com gasto de energia e como tal podem ser agrupados de acordo com características bioenergéticas e estruturais em: **(1)** transportadores activos primários que obtêm a energia por hidrólise de ATP e são também designados transportadores ABC e **(2)** transportadores activos secundários que actuam por mecanismos de simporte e antiporte, isto é, acoplam o efluxo do substrato ao transporte de um próton (PMF – *Proton Motive Force*) ou ião metálico (sódio) de acordo com o gradiente de concentrações (Paulsen *et al.*, 1996; Bambeke *et al.*, 2000; Langton *et al.*, 2005 e Lynch, 2006).

Os transportadores secundários encontram-se genericamente subdivididos em quatro grandes famílias, de acordo com as semelhanças na estrutura proteica primária e secundária em (Langton *et al.*, 2005 e Marquez, 2005): **(1)** *Major Facilitor Superfamily* (MFS); **(2)** a superfamília *Resistance-Nodulation cell Division* (RND); **(3)** *Small Multidrug Resistance* (SMR), subfamília da superfamília *Drug Metabolite Transporters* (DMT) e **(4)** *Multidrug and Toxic Compound Extrusion* (MATE) subfamília da superfamília *Multidrug Oligosaccharidyl-lipid/Polysaccharide* (MOP) (McKeegan *et al.*, 2003; Bambeke, 2006; Lynch, 2006; Poole e Lomovskaya, 2006 e Poole, 2007).

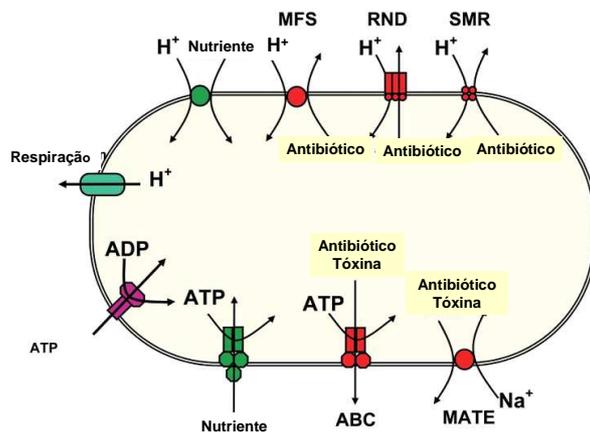


Figura 1.8. – Diversidade e componente energética das BE (adaptado de Langton *et al.*, 2005).

1.3.3.1. Transportadores ABC

Apesar destes transportadores estarem presentes em procariontes e eucariontes (Langton *et al.*, 2005 e Lynch, 2006), é nos microrganismos eucariontes que assumem maior representação. Tipicamente os transportadores ABC são compostos por dois domínios hidrofílicos citoplasmáticos, envolvidos na ligação e hidrólise do ATP, e dois domínios hidrofóbicos transmembranares (Langton *et al.*, 2005; Marquez, 2005 e Lynch, 2006). Esta superfamília contém transportadores que efectuam o efluxo e influxo de substâncias de e para a célula e divide-se em 30 famílias, de acordo com a especificidade ao

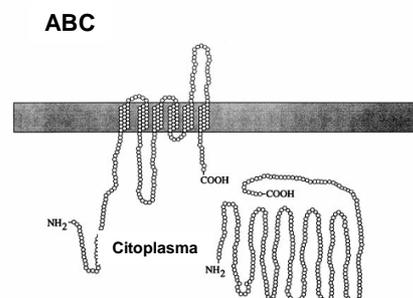


Figura 1.9. – Modelo estrutural de um membro da família ABC (adaptado de Saier *et al.*, 1998).

substrato. Estas proteínas efectuam o transporte de uma variedade de substratos que incluem açúcares, vitaminas, aminoácidos, iões, antibióticos, proteínas e polissacáridos (Lynch, 2006). O fenómeno da multiresistência foi pela primeira vez identificado numa proteína desta superfamília: a P-glicoproteína (P-gp), de mamíferos, cuja super expressão confere resistência a compostos utilizados na quimioterapia em humanos (Paulsen *et al.*, 1996; Langton *et al.*, 2005; Marquez, 2005 e Lynch, 2006), e ainda nos transportadores primários MRP1 e MRP2 (*Multidrug Resistance Protein*) responsáveis, igualmente, pela resistência clínica a fármacos anticancerígenos em humanos (Saier *et al.*, 1998; Borges-Walmsley, 2003; McKeegan *et al.*, 2004 e Kumar e Schweizer, 2005). Os transportadores primários bacterianos são maioritariamente transportadores específicos e estão presentes em microrganismos produtores de antibióticos (*e.g. Streptomyces spp*). No entanto, alguns transportadores ABC conferem MDR (*e.g. LmrA de Lactococcus lactis*) (Marquez, 2005 e Lynch, 2006). Em *E. coli*, um representante desta superfamília é o transportador de macrólidos MacB (Saier *et al.*, 1998; Borges-Walmsley, 2003; McKeegan *et al.*, 2004 e Kumar e Schweizer, 2005).

1.3.3.2. Transportadores Secundários

1.3.3.2.1. Major Facilitor Superfamily (MFS)

Trata-se de uma família ancestral grande e diversa que inclui centenas de membros sequenciados (mais de 300 proteínas sequenciadas). Estas catalizam o sinporte de solutos/catiões (H^+ ou Na^+), o antiporte de soluto/ H^+ ou o antiporte soluto/soluto de diversos substratos. Esta superfamília engloba 17 famílias agrupadas de acordo com a afinidade para o soluto (Paulsen *et al.*, 1996; Saier *et al.*, 1998; Kumar e Schweizer, 2005 e Marquez, 2005). Destas subfamílias, os transportadores de açúcares e drogas são os mais numerosos (Borges-Walmsley *et al.*, 2003). As proteínas da superfamília MFS envolvidas na resistência a drogas são formadas por 12 ou 14 segmentos transmembranares (TMS – *Transmembranar Segments*) o que permite distinguir as duas principais famílias dentro desta superfamília (Paulsen 1996; Borges-Walmsley, *et al.*, 2003 e Marquez, 2005). As restantes proteínas desta superfamília adoptam geralmente uma estrutura de 12 TMS, semelhante aos outros membros da MFS (Paulsen *et al.*, 1996 e Saier *et al.*, 1998). Estes transportadores funcionam, em geral, como componentes únicos (*e.g. NorA de Staphylococcus aureus*). No entanto, em algumas bactérias Gram-negativas funcionam em conjunto com a proteína de fusão membranar (MFPs) e componentes da membrana externa (OMP) de outros sistemas de efluxo (*e.g. EmrAB-TolC de E. coli*) (Saier *et al.*, 1998 e Kumar e Schweizer, 2005). A proteína TetB de *E.coli* constitui o elemento melhor caracterizado desta família e está envolvido no efluxo da tetraciclina (Paulsen *et al.*, 1996).

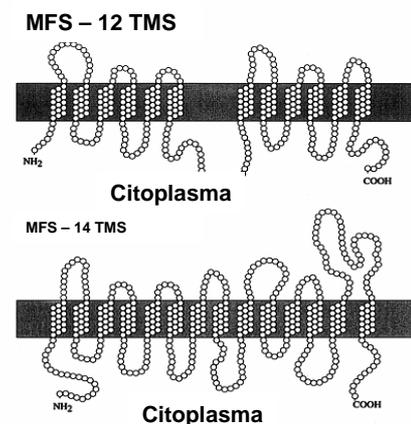


Figura 1.10. – Modelo estrutural de um membro da família MFS (adaptado de Saier *et al.*, 1998).

1.3.3.2.2. Resistance-Nodulation cell Division (RND)

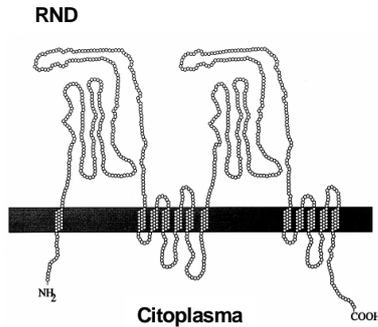


Figura 1.11. - Modelo estrutural de um membro da família RND (adaptado de Saier *et al.*, 1998).

Os membros desta família foram identificados em eubactérias, arqueobactérias e eucariontes. Estes transportadores são codificados, geralmente, por genes situados no cromossoma tendo-se identificado recentemente um gene situado no plasmídeo. Estes transportadores são maiores que os transportadores MFS, com cerca de 1000 resíduos de aminoácidos. No entanto, apesar da disparidade na dimensão as proteínas RND adoptam uma estrutura semelhante às proteínas da superfamília MFS (Saier *et al.*, 1998; Borges-Walmsley *et al.*, 2003 e Kumar e Schweizer, 2005). Propôs-se que a sua estrutura consista em 12 TMS com dois grandes arcos entre o TMS 1 e TMS 2 e TMS 7 e TMS 8 (Paulsen *et al.*, 1996 e Borges-

Walmsley *et al.*, 2003). Na extremidade amino-terminal de cada proteína, a cadeia polipeptídica provavelmente atravessa a membrana citoplasmática uma vez, do citoplasma para o periplasma, seguido de um domínio hidrofílico situado no periplasma. A cadeia polipeptídica atravessa a membrana mais de seis vezes antes de emergir novamente no periplasma, como outro domínio hidrofílico do mesmo tamanho que o primeiro, com a extremidade carboxílica da permease a ficar embebida novamente na membrana (Saier *et al.*, 1998; Borges-Walmsley *et al.*, 2003; Kumar e Schweizer, 2005; Langton *et al.*, 2005 e Marquez, 2005). O efluxo de substratos é efectuado por um mecanismo de antiporte substrato/H⁺. Estes transportadores actuam, em geral, como transportadores de múltiplas drogas, como sejam AcrB (anteriormente designado AcrE) e AcrF (anteriormente designado EnvD) de *E. coli*; MexB de *Pseudomonas aeruginosa* e MtrD de *Neisseria gonorrhoeae* (Paulsen *et al.*, 1996; Saier *et al.*, 1998; Kumar e Schweizer, 2005 e Langton *et al.*, 2005).

Estes são encontrados maioritariamente em bactérias Gram-negativas onde efectuam o transporte através da membrana citoplasmática para o espaço periplasmático pelo que têm de actuar em cooperação com outras proteínas (MFP e OMP), para secretar a droga para o meio extracelular (Langton *et al.*, 2005). Esta cooperação entre proteínas foi descrita para o sistema AcrAB-TolC em *E. coli* e o sistema MexAB-OprM de *P. aeruginosa*. Nestas bactérias estes transportadores estão envolvidos na relevância da resistência clínica (Lomovskaya e Bostian, 2006), sendo as BE da família RND as mais importantes proteínas de efluxo entre as *Enterobacteriaceae* (Pagès *et al.*, 2005).

1.3.3.2.3. Small Multidrug Resistance (SMR)

Esta família é composta pelas proteínas de efluxo de menor dimensão, formadas por aproximadamente 100-110 resíduos de aminoácidos hidrofóbicos com uma topologia de 4 TMS (Saier *et al.*, 1998; Langton *et al.*, 2005 e Marquez, 2005).

Estes transportadores estão envolvidos no efluxo de drogas catiónicas lipofílicas em bactérias (Marquez, 2005). As BE mais bem caracterizadas incluem a bomba Smr de *S. aureus* e a bomba EmrE de *E. coli* implicadas no efluxo de corantes, drogas e catiões. Esta última contribui para a resistência ao brometo de etídeo e violeta de metilo. Outra bomba SMR de resistência a múltiplas drogas com uma homologia próxima a EmrE foi caracterizada em *P. aeruginosa* e tem papel importante na resistência intrínseca ao brometo de etídeo, à acriflavina e a antibióticos aminoglicosídicos (Paulsen *et al.*, 1996; Borges-Walmsley *et al.*, 2003 e Kumar e Schweizer, 2005).

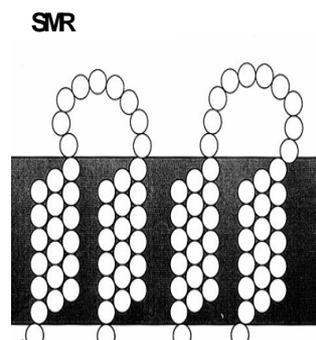


Figura 1.12. – Modelo estrutural de um membro da família SMR (adaptado de Saier *et al.*, 1998).

1.3.3.2.4. *Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE)*

Ao contrário dos transportadores MFS, RND e SMR, que actuam maioritariamente como transportadores por antiporte de droga/protão, as proteínas desta família efectuam o efluxo do substrato associando, crê-se que exclusivamente, o antiporte de iões sódio (Borges-Walmsley *et al.*, 2003; Langton *et al.*, 2005 e Marquez, 2005). Inicialmente julgou-se que as proteínas desta família fossem membros da superfamília MFS, pela semelhança no tamanho (aproximadamente 450 aminoácidos) e organização espacial em 12 TMS. No entanto, apesar da similaridade na estrutura e topologia, demonstrou-se que estas proteínas não têm qualquer homologia com as proteínas MFS (Borges-Walmsley *et al.*, 2003 e Kumar e Schweizer, 2005). Esta família contém mais de 30 proteínas e pode ser subdividida com base na análise filogenética, em três grupos distintos (Langton *et al.*, 2005). Esta nova família foi identificada com a caracterização da proteína NorM, (daí também a designação de família NorM), dependente de Na⁺, em *Vibrio parahaemolyticus*, que confere resistência a múltiplas drogas (*e.g.* corantes, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos) e com a caracterização da sua homóloga Ydhe de *E. coli*, que confere resistência a agentes antimicrobianos catiónicos. Pouco se conhece acerca da sua estrutura, regulação ou mecanismo de actuação. Os estudos têm-se centrado na identificação da sua presença e resistência num número restrito de bactérias. Esta tendência tende a ser invertida à medida que se verifica que os transportadores MATE têm um importante papel na resistência a antibióticos clinicamente relevantes em organismos patogénicos (Borges-Walmsley *et al.*, 2003; Kumar e Schweizer, 2005 e Langton *et al.*, 2005).

1.3.4. BE em *E. coli*

Em *E. coli* existe uma predominância de BE dependentes da força protomotriz onde se prevê, com base na análise do seu genoma, a existência de dezanove BE pertencentes à família MFS, sete transportadores da família SMR e três BE pertencentes à família RND. Apenas se contabilizam sete transportadores do tipo ABC (Borges-Walmsley *et al.*, 2003). Das BE dependentes da PMF, existem pelo menos nove sistemas que são responsáveis pela resistência a múltiplas drogas (MDR), quando

expressas em níveis elevados. Contudo, a maioria destes sistemas estão expressos no tipo selvagem de *E. coli* k-12 a níveis que são insuficientes para conferir resistência substancial a múltiplas drogas (Saier *et al.*, 1998 e Viveiros *et al.*, 2005). Os genes que codificam para estas BE são *emrE*, *acrEF* (anteriormente designado *envCD*), *emrAB*, *emrD*, *acrAB-TolC*, *mdfABC*, *tehA*, *acrD* (homólogo de *acrB*) e *yhiUV*. Os genes *emrD*, *mdfA* e *emrB* pertencem à superfamília MFS, *emrE* e *tehA* à família SMR e são membros da família RND os genes *acrB*, *acrF*, *acrD* e *yhiV* (Viveiros *et al.*, 2007).

1.3.4.1. Sistema AcrAB-TolC e sua Importância

O sistema AcrAB-TolC é o sistema de efluxo de resistência a múltiplas drogas (MDR) melhor estudado (Piddock, 2006a e Viveiros *et al.*, 2007). Este é, como referido, um sistema multicomponente (tripartido), composto por uma proteína transportadora (de efluxo) - AcrB - localizada na membrana interna e pertencente à família RND; uma proteína acessória - AcrA -, que é uma proteína de fusão membranar (MFP) localizada no espaço periplasmático e uma proteína da membrana externa (OMP) - TolC - localizada na membrana externa da bactéria (Piddock, 2006b). Este sistema cataliza o efluxo por um mecanismo dependente da PMF (Murakami *et al.*, 2002). AcrAB-TolC é expresso constitutivamente em *E. coli* e é amplamente responsável pela resistência intrínseca deste microrganismo a uma diversidade de compostos estrutural e funcionalmente distintos (*e.g.* antibióticos, detergentes, corantes, solventes) (Murakami *et al.*, 2002 e Yu *et al.*, 2003). O perfil de substratos do sistema AcrAB-TolC engloba o cloranfenicol, antibióticos β -lactâmicos lipofílicos, tetraciclina, rifampicina, fluoroquinolonas, novobiocina, ácido fusídico, ácido nalidixico, brometo de etídeo, acraflavina, sais biliares, ácidos gordos de cadeia curta, dodecil sulfato de sódio (SDS), Triton X-100 e triclosano (Yu *et al.*, 2003; Mckeegan *et al.* 2004; Piddock, 2006a e Davin-Regli e Pagès, 2007). A função natural deste complexo presume-se que seja o efluxo de sais biliares e seus derivados permitindo a sobrevivência de *E. coli* no seu habitat natural (tracto intestinal) onde existem concentrações elevadas destes compostos (Murakami *et al.*, 2002).

Apesar da diversidade de sistemas de efluxo em *E. coli* apenas se verificou a super expressão de AcrAB-TolC em isolados clínicos. E embora associado a outros mecanismos é inegável a sua relevância na resistência clínica. Por outro lado, o tratamento de infecções por *E. coli* é conseguido com agentes que são muitas vezes substratos desta BE, pelo que a pressão selectiva sobre este microrganismo é elevada e responsável pelo surgimento de fenótipos de MDR (Piddock, 2006b e Plésiat, 2006).

A estrutura de AcrB foi determinada por Murakami *et al.* (2002), a 3,5 Å, por cristalografia de raios-X (Figuras 1.13. e 1.14), o que contribuiu para elucidar e comprovar algumas hipóteses acerca do mecanismo de transporte dos substratos através do sistema AcrAB-TolC e originou a proposição de um novo modelo de transporte - *Periplasmic vacuum cleaner* (Murakami *et al.*, 2002 e Langton *et al.*, 2005). A estrutura de AcrB revela um trímero com 1049 resíduos, de aparência gelificante, composta por uma região transmembranar e uma protuberância que se estende pelo periplasma e se divide em duas partes.

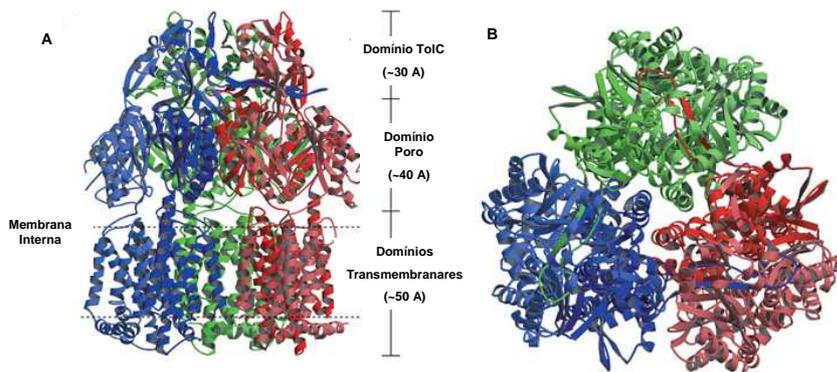


Figura 1.13. – Estrutura de AcrB. **A.** Vista lateral. **B.** Vista de topo (adaptado de Murakami *et al.*, 2002).

A parte superior encontra-se aberta como um funil, e está interligada por um poro ao domínio inferior que se abre numa cavidade central, na superfície da membrana. Julga-se que a cavidade central é o local de ligação dos múltiplos substratos. Recentemente, estudos de co-cristalização revelaram a existência de diversos substratos estruturalmente distintos localizados na cavidade central. Yu *et al.*, (2003) propõem que o local de ligação de substratos em AcrB é composto, com uma componente proteica e lipídica o que explica a larga diversidade de substratos reconhecidos por AcrB. Na região transmembranar as três unidades de AcrB (protómeros) estão organizados num anel que se crê preenchido por fosfolípidos (Murakami *et al.*, 2002; Mckeegan *et al.*, 2003; Paulsen 2003; Langton *et al.*, 2005 e Lomovskaya e Bostian, 2006).

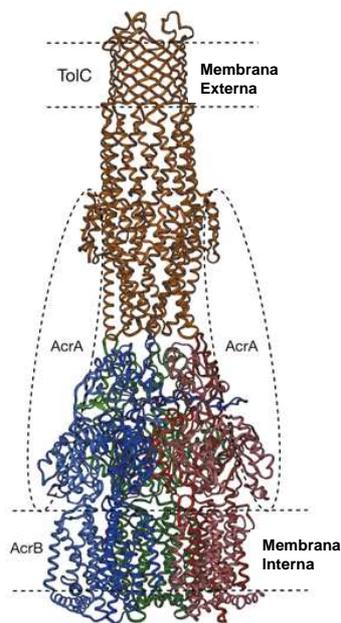


Figura 1.14. – Modelo proposto para o complexo AcrAB-TolC (adaptado de Murakami *et al.*, 2002).

A existência de três vestíbulos localizados na superfície periplasmática imediatamente sobre a superfície externa da membrana plasmática (membrana interna), que liga a cavidade central da proteína AcrB ao periplasma, sugeriu a possibilidade da existência de transporte directo de substratos a partir dessa superfície membranar e do próprio periplasma, não sendo obrigatório que todos os substratos de AcrB sejam captados ao nível do citoplasma celular (Figura 1.15.). Esta teoria explica o transporte de substratos anfífilos como os β -lactâmicos, que se demonstrou não atravessarem a membrana citoplasmática, tendo que ser transportados a partir do periplasma e a consequente resistência conferida pelos transportadores RND (Murakami *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2003; Langton *et al.*, 2005; Lomovskaya e Bostian, 2006). Uma vez que AcrB e TolC contém domínios periplasmáticos grandes com os diâmetros do topo da protuberância e da parte inferior de TolC semelhantes, propôs-se que a protuberância em forma de funil de AcrB interaja com a proteína da membrana externa TolC, onde esta funciona como um exoducto que conduz os substratos para o espaço extracelular, através da membrana externa. Sugeriu-se, ainda, que a MFP - AcrA - funciona como uma

peça estabilizadora da interação entre AcrB e TolC (Murakami *et al.*, 2002; Mckeegan *et al.*, 2003 e Lomovskaya e Bostian, 2006). Assim, segundo este novo modelo os substratos são removidos quer do citoplasma como do espaço periplasmático para o exterior (Murakami *et al.*, 2002), com AcrB a mediar o transporte de substratos do citoplasma sendo estes transportados pelo poro da membrana interna até à periferia sendo recolhidos na cavidade central. Os substratos localizados no periplasma, junto à superfície externa da membrana interna têm acesso à cavidade central pelos vestibulos (Murakami *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2003 e Langton *et al.*, 2005). No entanto, para que o efluxo ocorra AcrAB e TolC têm de se acoplar. Crê-se que AcrA e AcrB estejam permanentemente complexados, sendo a ligação a TolC efectuada quando necessário (passo 1, Figura 1.15.). A ligação de substratos provoca alterações conformacionais em AcrAB permitindo a ligação a TolC. Após esta ligação o substrato é transportado da cavidade central através do poro (passo 2, Figura 1.15.). A translocação de um protão origina a abertura do poro no topo da protuberância e, por conseguinte, do canal de TolC (passo 3, Figura 1.15.) sendo o substrato enviado para o meio extracelular (Langton *et al.*, 2005).

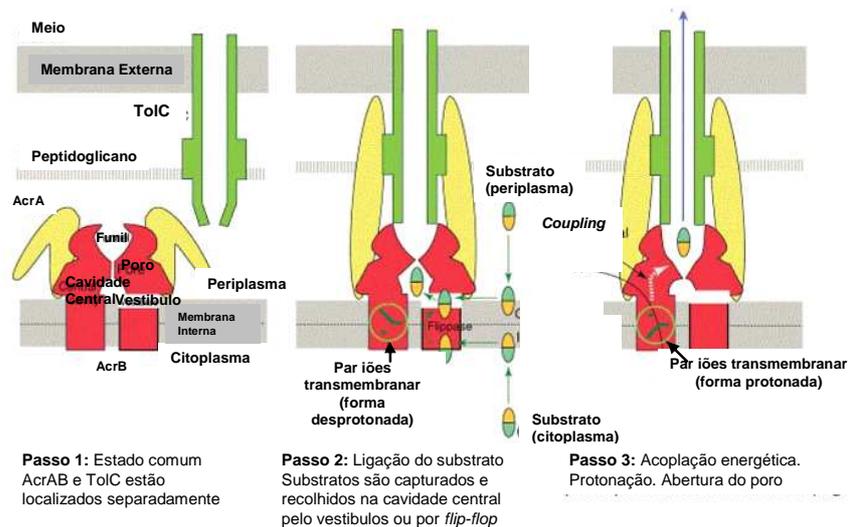


Figura 1.15. – Mecanismo de efluxo por AcrAB-TolC. Após ligação do substrato, a conformação do AcrB altera-se para permitir a ligação a TolC que é seguida de uma alteração da estrutura de AcrA. Abertura do poro por ligação do protão e saída do substrato por transporte activo (adaptado de Langton *et al.*, 2005).

1.4. Importância Clínica da Resistência Mediada por Bombas de Efluxo

A definição da extensão com que as bombas de efluxo contribuem para a resistência em isolados clínicos e o seu impacto na falha da terapêutica é uma tarefa difícil e controversa uma vez que à actividade de efluxo estão associados outros fenómenos de resistência (Hooper, 2005; Pagès *et al.*, 2005 e Bambeke *et al.*, 2006). No entanto, têm sido reportados numerosos exemplos de isolados clínicos onde a actividade de efluxo assume grande expressão e é responsável pela resistência aos antibióticos, sendo indiscutível a importância que este mecanismo assume na prática clínica. Assim

vários sistemas de efluxo que contribuem para a resistência clínica têm sido descritos em bactérias clinicamente importantes como sejam *Campylobacter jejuni* (CmeABC), *E. coli* (AcrAB-TolC, AcrEF-TolC, EmrB, EmrD), *Pseudomonas aeruginosa* (MexXY-OprM), *Streptococcus pneumoniae* (PmrA), *Salmonella typhimurium* (AcrB) e *Staphylococcus aureus* (NorA). Todos estes sistemas são responsáveis pelo efluxo de fluoroquinolonas e as bombas da família RND, ao reconhecerem e actuarem sobre uma diversidade de substratos, correspondem aos sistemas MDR com maior relevância em termos de resistência a antibióticos clinicamente importantes embora os transportadores MFS, SMR e MATE promovam, igualmente, resistência a antibióticos e biocidas (Webber e Piddock e 2003 e Poole, 2004).

Convém atender a que a resistência intrínseca a antibióticos depende da expressão constitutiva e indutiva dos sistemas de efluxo, onde estes agentes podem actuar como indutores e reguladores em algumas BE, ao nível da tradução do mRNA e que é deste balanço que se define o grau de susceptibilidade da estirpe selvagem a um dado antibiótico (Bambeke *et al.*, 2003). Apesar de os níveis basais da actividade de efluxo contribuírem para um decréscimo na susceptibilidade aos antibióticos, em estirpes selvagens, bem como em isolados clínicos e mutantes de laboratório (onde ocorre um incremento entre 4 a 64 vezes no valor da MIC após expressão das BE) esta resistência intrínseca foi devidamente acautelada ao determinar-se a dose efectiva do antibiótico para que as bactérias sejam ainda susceptíveis à terapia nas concentrações utilizadas e definidas para a prática clínica. A utilização de doses não efectivas (ditas subinibitórias ou subclínicas), por má prescrição ou por não aderência à terapêutica, que não eliminam rapidamente a população bacteriana levam à super expressão de BE e aos ajustes na permeabilidade bacteriana que anteriormente se descreveu. A super expressão de BE não confere, por si só e de um modo geral, níveis elevados de resistência com significado clínico mas permite que estas bactérias estejam melhor equipadas para sobreviver na pressão de antibióticos e estabilizem mutações genéticas nos locais alvo destes agentes (Webber e Piddock, 2003) o que representa o primeiro passo para que a bactéria se torne resistente a agentes antimicrobianos de relevância clínica (Piddock, 2006a). Demonstrou-se que em isolados clínicos de *E. coli* resistentes a fluoroquinolonas apresentavam super expressão do sistema AcrAB, no entanto, associado a um decréscimo na expressão de porinas. Adicionalmente, detectaram-se mutações no gene da topoisomerase (que origina a enzima alvo das fluoroquinolonas) contribuindo, igualmente para que estes isolados sejam resistentes à fluoroquinolona ciprofloxacina (Hooper, 2005 e Piddock, 2006a). Assim, a super expressão de BE permite a posterior selecção de mutantes uma vez que os alvos dos antibióticos estão expostos a concentrações subinibitórias garantido que se mantém uma população bacteriana em maior número de onde emergem, com frequência aumentada, mutantes resistentes (Bambeke *et al.*, 2006).

De facto, a actuação simultânea da actividade de efluxo com outros mecanismos de resistência origina sinergismos que estão implicados no surgimento de estirpes altamente resistentes e com um espectro alargado de resistência a diferentes substratos (Webber e Piddock, 2003 e Bambeke *et al.*, 2006).

A resistência cruzada a diferentes classes de antibióticos, é um problema emergente. Observa-se que em bactérias a exposição a um composto que integra o perfil de substratos para uma BE favorece a

super expressão dessa BE e conseqüentemente a resistência cruzada a todos os restantes substratos dessa BE, o que pode incluir antibióticos clinicamente relevantes. Adicionalmente, as BE podem transportar compostos antisépticos com conseqüências semelhantes em termos de resistência cruzada ou pressão selectiva (Webber e Piddock, 2003; Viveiros *et al.*, 2005; Bambeke *et al.*, 2006 e Thorrold *et al.*, 2007).

Igualmente, a expressão simultânea de diversas BE que reconhecem e actuam sobre o mesmo composto contribui para o aumento da resistência individual. Por outro lado, a expressão de BE multicomponentes associadas a BE de um componente leva a efeitos multiplicativos na resistência individual e cruzada de onde emerge o conceito de bombas de efluxo MDR (Palmer, 2003).

Porém, ocorre um aumento substancial da susceptibilidade, traduzido pelo decréscimo do valor da MIC, no caso de se utilizarem estratégias de inactivação ou inibição da actividade das bombas de efluxo (Lomvskaya e Watkins, 2001a; Pagès *et al.*, 2005 e Bambeke *et al.*, 2006).

Em última análise a recombinação genética natural facilita a disseminação da resistência associada à expressão de BE. Em muitos casos, os genes que codificam para as BE e seus reguladores localizam-se em plasmídeos e transposões conjugativos ou transformáveis que podem ser, facilmente, transferidos entre espécies bacterianas distantes (Bambeke *et al.*, 2006).

1.5. Ultrapassando a Resistência Mediada por Bombas de Efluxo

Dado o significado dos sistemas de efluxo, em particular os sistemas MDR da família RND, na resistência a agentes antimicrobianos em microrganismos patogénicos é prioritário considerar este mecanismo no desenho e desenvolvimento de novos agentes e no uso dos já existentes (Poole, 2007). Actualmente, existem duas abordagens para combater o efeito adverso do efluxo na eficiência dos agentes antimicrobianos: (1) pesquisa de antibióticos, nas classes de antibióticos já existentes, no sentido de identificar derivados que sofrem ao mínimo o efeito do efluxo e (2) desenvolvimento de agentes terapêuticos que inibam a actividade das BE - inibidores das bombas de efluxo (Lomovskaya e Watkins, 2001b e Webber e Piddock, 2003).

1.5.1. Agentes com Menor Susceptibilidade ao Efluxo

A optimização da estrutura de moléculas que sofrem o mínimo de efluxo é uma abordagem que tem sido considerada no desenho de novos agentes pelo que se tem assistido ao surgimento de novas moléculas com menor susceptibilidade ao efluxo. É inquestionável o valor das novas fluoroquinolonas (*e.g.* garenoxacina, moxifloxacina e WCK771) no tratamento de infecções por *S. aureus* e *S. pneumoniae* e que advém do facto de sofrerem menor efeito de efluxo pelas BE NorA e PmrA que as fluoroquinolonas antigas (*e.g.* ciprofloxacina, norfloxacina). A recente subclasse de cetólidos derivada dos macrólidos é igualmente uma alternativa emergente aos macrólidos utilizados no tratamento de Streptococci. As gliciliclinas (*e.g.* tigeciclina) são fracos substratos das BE Tet em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas quando comparados com as tradicionais tetraciclina. Apesar desta abordagem ter mérito, a presença de múltiplos mecanismos de efluxo para o mesmo agente no

mesmo organismo impede que se elimine totalmente o efeito de todos os mecanismos de efluxo na resistência a um antibiótico. Por outro lado, a larga distribuição das BE RND em bactérias Gram-negativas e a sua ampla especificidade no que respeita aos substratos (estudos recentes confirmam que mesmo os novos agentes antimicrobianos são substrato das BE RND de *E. coli*), sugerem que porventura esta estratégia não será efectiva em organismos Gram-negativos (Bambeke *et al.*, 2006; Poole e Lomovskaya, 2006 e Poole, 2007).

1.5.2. Inibidores de Bombas de Efluxo

Nesta abordagem pretende-se inibir os mecanismos de efluxo de modo a potenciar a actividade dos antibióticos existentes. O antibiótico é co-administrado com o inibidor que neutraliza a resistência mediada por bombas de efluxo tornando-o mais efectivo, uma vez que aumenta, de um modo rápido e significativo, a concentração intracelular do antibiótico susceptível ao efluxo, mesmo em organismos resistentes (Marquez, 2005 e Pagès *et al.*, 2005). A mais valia desta abordagem reside no potencial terapêutico e microbiológico e na capacidade de restaurar a actividade de uma série de valiosos agentes antimicrobianos considerados de grande valor clínico e cuja actividade se encontra actualmente comprometida devido à resistência mediada pelo efluxo (Webber e Piddock, 2003; Bambeke *et al.*, 2006 e Piddock, 2006a). Resultados *in vitro* demonstram o sinergismo desta combinação e são traduzidos num abaixamento dos valores da MIC. Uma vez que o efluxo pode ser o primeiro passo para a emergência de eventos mutacionais esta estratégia pode ainda reduzir a selecção de mutantes resistentes e suprimir a escalada de desenvolvimento de resistência. Estas moléculas podem ainda ser utilizadas como ferramentas de diagnóstico, de resistência mediada por BE, embora de um modo não específico (Bambeke *et al.*, 2006 e Lynch, 2006). Não obstante, há que atender a que existem, no mesmo microrganismo, outros mecanismos de resistência que actuam em simultâneo e para o mesmo agente contribuindo para a resistência. Pelo que, para alguns casos, a inibição terá apenas significado terapêutico para os antibióticos e nos organismos onde o efluxo é o mecanismo principal para a resistência (e.g. resistência a β -lactâmicos em *P. aeruginosa* conferida pelo sistema MexAB-OprM e por β -lactamases). Outro aspecto relevante é que a mesma bactéria pode conter múltiplos sistemas de efluxo responsáveis pela resistência a um determinado antibiótico (e.g. fluoroquinolonas em Enterobacteriaceae e *P. aeruginosa*). Uma limitação da terapia adjuvante reside nas concentrações elevadas de inibidores. Estes têm de ser utilizados em concentrações superiores às utilizadas para exercerem efeitos farmacológicos o que as torna inviáveis por razões de segurança (Bambeke *et al.*, 2006; Poole e Lomovskaya, 2006 e Poole, 2007).

A actividade de diversos compostos estruturalmente diferentes (Figura 1.16.), com a potencialidade de inibir as BE tem sido testada em várias bactérias Gram-negativas, incluindo *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *H. influenzae* e *Campylobacter jejuni* (Pagès *et al.*, 2005 e Poole, 2005). A inibição da actividade de efluxo pode envolver diversas vertentes (Pagès *et al.*, 2005 e Bambeke *et al.*, 2006): (1) criar inibidores que geram competição ao nível da membrana interna; (2) colapsar a componente energética/força electromotriz do efluxo; (3) criar um “entupimento” no canal da membrana externa; (4) alterar/prevenir

a correcta organização dos complexos transportadores de drogas e (5) inibição da expressão genética dos sistemas de efluxo. Estas abordagens estão dependentes dos estudos (estruturas obtidas por cristalografia) acerca modo de acção das BE e de como se efectua a ligação ao substrato (Bambeke *et al.*, 2006).

O desenho de moléculas que funcionam como inibidores competitivos que se ligam aos locais de ligação dos substratos na BE, mimetizando os agentes antimicrobianos que sofrem efluxo foi uma das primeiras abordagens na inibição do efluxo. No entanto, dados referentes à existência de múltiplos locais de ligação dos substratos em BE RND sugerem que estes inibidores actuarão apenas numa parte dos substratos antimicrobianos. Outra desvantagem é a reduzida afinidade para o alvo o que implica a utilização de doses e tempos de exposição elevados para ser eficaz. A grande vantagem destes compostos é o facto de se crer ser difícil o desenvolvimento de resistência a eles próprios.

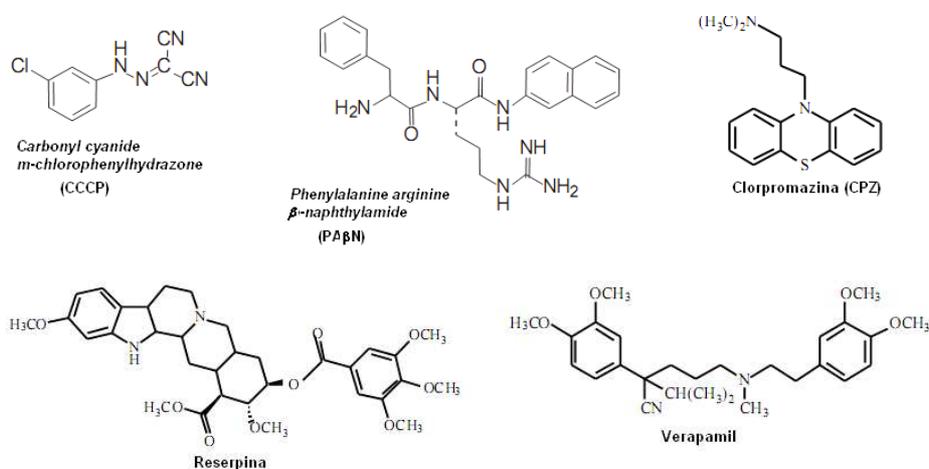


Figura 1.16. – Exemplos de estruturas de inibidores de BE (adaptado de Pagès *et al.*, 2005 e Bambeke *et al.*, 2006).

Outra abordagem corresponde ao desenvolvimento de inibidores não competitivos ou alostéricos que actuam em locais distintos dos locais de ligação ao substrato (locais de modulação), mas cuja disrupção tem impacto na actividade da BE. Espera-se que estes inibidores potenciem a actividade de todos os substratos antimicrobianos da BE, o que, por outro lado limita a sua utilidade clínica (Poole e Lomovskaya, 2006). No entanto, estes inibidores podem ser específicos para um transportador.

Outra estratégia baseia-se no facto de as BE RND serem semelhantes a outros transportadores secundários e, por conseguinte, efectuarem o efluxo de um modo dependente da energia associando o efluxo da droga ao influxo de protões (antiporte droga/protão). Assim, o desacoplamento do efluxo do substrato ao influxo de protões criará um transportador que não só é incapaz de criar resistência mas que promove a hipersusceptibilidade em virtude da sua fácil difusão para o interior da célula (e.g. CCCP). Esta é, no entanto, uma estratégia não específica e o desacoplamento energético afecta não só os transportadores bacterianos como também os transportadores eucariotas o que torna estes compostos altamente tóxicos para o hospedeiro (Bambeke *et al.*, 2006 e Poole e Lomovskaya, 2006).

Abordagens específicas para bactérias Gram-negativas consistem em ter como alvo o poro exoducto do sistema multicomponente do efluxo. Estudos estruturais e bioquímicos de TolC do sistema AcrAB-TolC de *E. coli* revelam que a entrada periplasmática desta proteína pode ser inibida por cátions di- ou trivalentes (Poole e Lomovskaya, 2006). Alternativamente tem-se tentado a alteração/prevenção da correcta organização dos sistemas multicomponentes das bactérias Gram-negativas, por tentativa de definição das regiões proteicas envolvidas nas interacções com outras proteínas dos complexos e síntese de pequenos péptidos (péptidos interface) que mimetizam estas regiões competindo com elas, provocando a disconexão da organização destes sistemas. Uma vez que os locais de ligação RND-MFS-OMP ocorrem aparentemente no periplasma estas moléculas apenas terão de atravessar a membrana externa.

Uma vez que as BE MDR são controladas cromossomicamente por proteínas regulatórias que determinam a altura e extensão com que os sistemas de efluxo devem ser expressos, poder-se-á bloquear a expressão genética atacando esses alvos reguladores. Em *E. coli* o sistema AcrAB-TolC é controlado pela proteína reguladora transcripcional MarA do locus *marRAB*. Assim, inibidores de *mar* inibirão a expressão de *acrAB* e, por conseguinte, o efluxo de agentes antimicrobianos nas bactérias entéricas. Esta abordagem é crítica na medida em que de um modo geral os sistemas regulatórios são únicos para cada BE o que implica a necessidade de um inibidor diferente para cada sistema de efluxo (Poole e Lomovskaya, 2006).

Diversas abordagens podem ser seguidas para a descoberta de inibidores de BE e multiplicam-se as empresas que se dedicam a esta investigação. A Microcide Pharmaceuticals e a Daiichi Pharmaceuticals são duas das que mais têm contribuído para o desenvolvimento destas moléculas. O primeiro inibidor da actividade de efluxo a ser identificado foi o dipéptido amida (L-Phe-L-Arg- β -naphthylamina – anteriormente designado por MC-207,110 ou PAN), que potencia a actividade da levofloxacina em *P. aeruginosa*. Este é substrato de múltiplos sistemas tripartidos pertencentes à família RND (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM) e potencia a actividade de fluoroquinolonas, macrólidos, oxazolidinas, cloranfenicol e rifampicina. Estudos posteriores revelaram que este é um inibidor competitivo. Baseado na sua ampla diversidade de inibição de BE em várias bactérias Gram-negativas, os compostos desta classe, são classificados como inibidores de largo espectro. Diversos outros compostos com capacidade de potenciar a actividade de antibióticos foram identificados: alcalóides de origem vegetal como a reserpina, descrita como agente neuroléptico e antihipertenso e identificado como inibidor da BE Bmr de *Bacillus subtilis*, e de NorA de *S. aureus*; bloqueadores do canal de cálcio como o verapamil e inibidores de ATPase H⁺/K⁺; uma série de fenotiazinas (clorpromazina e tioridazina) e derivados de arilpiperazinas implicados na reversão de MDR em *E. coli* que super expressam BE, entre outros (Pagès *et al.*, 2005; Lomovskaya e Bostian, 2006 e Lynch, 2006). Actualmente, a Mpex Pharmaceuticals conduz a primeira fase de ensaios clínicos relativos ao inibidor, por eles descoberto, o MP-601,205, numa estratégia de co-administração com a ciprofloxacina, envolvido no tratamento de pacientes com fibrose quística (Lomovskaya e Bostian, 2006 e Lynch, 2006).

Não obstante da inexistência, até à data, de inibidores de BE utilizados na prática clínica (e co-administrados com antibióticos) para tratar infecções bacterianas humanas e veterinárias, fica claro

que esta abordagem para contornar o efluxo oferece novas oportunidades para combater o desenvolvimento de resistência a antibióticos melhorando a eficácia ou alargando a utilidade de um largo espectro de drogas em uso clínico e de antibióticos futuros (Lomovskaya e Bostian, 2006; Lynch, 2006 e Piddock, 2006a). Para este fim torna-se essencial possuir bons instrumentos e metodologias de análise do efluxo de antibióticos em microrganismos para assim se poder compreender os mecanismos de efluxo e o modo de actuação dos seus possíveis inibidores.

1.6. Transporte de Brometo de Etídeo em *Escherichia coli*

Os métodos tradicionais para o estudo dos mecanismos de efluxo em bactérias baseiam-se na monitorização da acumulação de antibióticos marcados radioactivamente (^{14}C e ^3H) (e.g. quinolonas como a ciprofloxacina, norfloxacina, ácido nalidixico) ou recorrem à fluorimetria com substratos fluorescentes (e.g. brometo de etídeo) (Piddock *et al.*, 1999; Kyriacou *et al.*, 2004 e Xu *et al.*, 2004). A demonstração e avaliação da actividade de efluxo em mais de trinta espécies de bactérias envolveu estratégias de inactivação e/ou inibição química ou biológica das BE avaliando-se essas estratégias pelo efeito no efluxo e retenção do substrato modelo - brometo de etídeo (EtBr). (Martins *et al.*, 2006). Os primeiros estudos de transporte de EtBr em diferentes estirpes de *E. coli* foram conduzidos por Lambert e LePecq (1984), Jones e Midgley (1985) e Midgley (1986 e 1987).

Apesar de largamente utilizados os tradicionais métodos não se encontram padronizados no que respeita aos instrumentos, reagentes, meios, entre outros parâmetros, o que dificulta a comparação e reprodutibilidade dos resultados entre laboratórios (Pagès *et al.*, 2005). Estes métodos são, em geral, trabalhosos, requerem instrumentação especializada e, em algumas condições têm pouca precisão. Não permitem o controlo da temperatura e baseiam-se em medições *off-line* (discretas) do sinal de fluorescência. Adicionalmente, não reflectem o carácter fisiológico do fenómeno de efluxo uma vez que muitas vezes utilizam condições letais (Martins *et al.*, 2006). Simultaneamente, os métodos anteriores não possuem a sensibilidade necessária para detectar de um modo rápido e eficaz o incremento na actividade intrínseca de efluxo de bactérias susceptíveis a antibióticos e a sua relação com a resistência intrínseca. A caracterização precoce do efluxo em estirpes clinicamente susceptíveis é importante na medida em que permite ajustar a terapêutica em pacientes sob tratamento e minimizar o desenvolvimento de novas variantes resistentes.

Assim, foi nosso objectivo desenvolver um método simples, rápido, barato e reproductível que permita demonstrar e quantificar a actividade de efluxo ao mesmo tempo que possibilite a detecção da actividade intrínseca das BE em estirpes susceptíveis a antibióticos bem como com fenótipo de MDR obviando, assim, as inconsistências dos métodos e procedimentos anteriores. O protocolo desenhado a par do modelo matemático mecanicista (quantificação) desenvolvido associados a uma nova tecnologia: fluorimetria em termociclador de tempo real Rotor-Gene 3000TM da Corbett Research (Sydney, Austrália) representam um método inovador que se distingue dos antecedentes em diversos aspectos.

1.6.1. Fluorimetria em Termociclador de Tempo Real: Rotor-Gene 3000™

O Rotor-Gene 3000™ da Corbett Research (Sydney, Austrália) é um termociclador de tempo real para PCR e, como tal, permite quantificar o número de cópias de DNA e RNA, monitorizando alterações na fluorescência resultantes da ligação de corantes fluorescentes ao ds-DNA, ou seja, indicando o produto de amplificação, durante os ciclos de aquisição, sendo este sinal proporcional à concentração de produtos amplificados. Será esta potencialidade de monitorização do sinal de fluorescência que

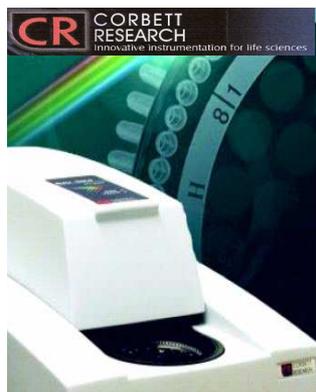


Figura 1.17. – Rotor-Gene 3000™ (retirado de <http://www.corbettlifescience.com>. Acedido em Agosto, 2007)

permite a aplicação deste aparelho ao estudo fluorimétrico versado neste trabalho. Este aparelho utiliza um sistema de centrífuga com rotor de 36 x 0,2 mL microtubos de reacção de parede fina ou rotor de 72 x 0,1 mL tubos *strip*. Como fontes de excitação possui díodos de alta potência de 470, 530, 585 e 625 nm, posicionados lateralmente à câmara (Figura 1.18.). Estes, correspondem, respectivamente, à luz azul, verde, laranja e vermelha e são usados para medir uniformemente o espectro visível. Possui um fotomultímetro (*Photomultiplier* – PMT) posicionado na base da câmara com seis filtros de detecção: 510, 555, 610 nm *bandpass* e 660, 585, 610 nm *high-pass*. A conjugação destes seis filtros (mais dois filtros adicionais para aplicações especializadas) com os filtros de excitação permite a detecção simultânea em quatro canais (*multiplexing system*), o que possibilita a detecção até quatro fluorocromos no

mesmo microtubo de entre uma variedade de fluorocromos (Sybr-Green, FAM, TET, JOE, VIC, MAX, ROX, Tamra Cy3, Cy5, Cy5.5 TexRed, Taqman, Molecular Beacons, FRET, entre outros). A via óptica fixa reduz a variabilidade inter amostral. Os tubos são iluminados à medida que passam no detector e na aquisição de dados a energia é aferida pela média de 20 revoluções para calcular a fluorescência de cada amostra. As amostras são aquecidas e arrefecidas num sistema de controlo térmico a ar. O aquecimento é conseguido por um elemento circular de Crómio-Níquel sendo o sistema fechado para que o ar quente seja apenas ventilado aquando do arrefecimento. O arrefecimento é feito por intermédio de um ventilador no topo da tampa, sendo o ar introduzido pela base. A temperatura pode variar entre os 25 °C e os 99 °C, com uma uniformidade de temperatura entre amostras de +/- 0,01 °C. A exactidão na temperatura é de +/- 0,5 °C e a precisão de +/- 0,1 °C. As amostras no rotor giram a 500 rpm e o design centrífugo faz com que não haja nenhuma variação de temperatura entre elas o que permite que os tempos de espera sejam curtos já que não é necessário tempo de equilíbrio de temperatura, como sucede nos sistemas em bloco de 96 poços. Este sistema permite que o volume de trabalho seja ajustável e permite a integração de robots para a preparação automática das amostras (Operator Manual, 2004; <http://www.corbettlifescience.com>, Acedido em Junho, 2006).

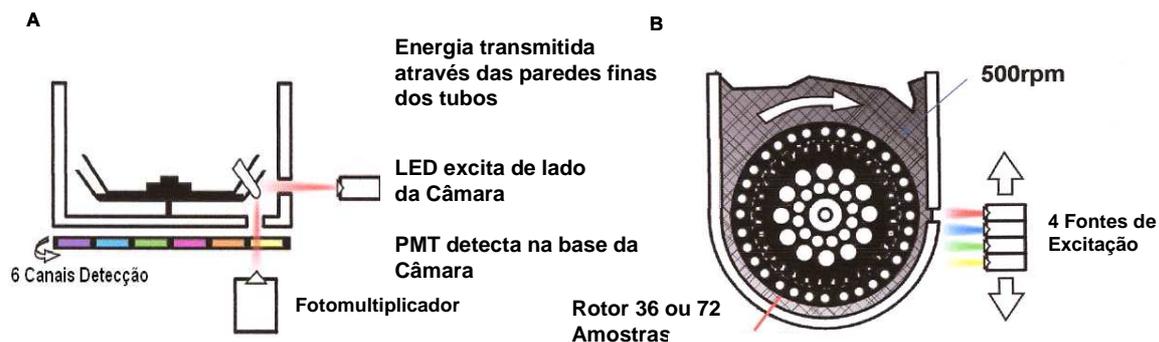


Figura 1.18. – A. Vista lateral da câmara do Rotor-Gene. B. Vista de topo do rotor do Rotor-Gene (adaptado de <http://www.corbettlifescience.com>, Acedido em Junho, 2006).

1.6.2. Princípios Fundamentais

O protocolo foi desenvolvido tendo como estirpe padrão *Escherichia coli* AG100, que corresponde à estirpe K-12 selvagem, uma vez que os seus mecanismos de resistência estão bem definidos e possui o seu principal sistema de efluxo intacto – sistema AcrAB-TolC.

Este sistema tripartido de efluxo funcionará como nosso modelo de efluxo dado ser o sistema melhor caracterizado e para o qual, por conseguinte, existe um maior leque de informação disponível. Por outro lado, a MDR de isolados clínicos de *E. coli* tem sido atribuída à super expressão de AcrAB-TolC o que torna este sistema um interessante modelo de estudo (Piddock, 2006a). A influência do seu grau de actividade foi testada utilizando estirpes mutantes desta bomba de efluxo por comparação com a estirpe padrão. *E. coli* AG100A, que tem o sistema AcrAB-TolC inactivo, por inserção do gene *Kan* do transposão Tn903 (Okuso *et al.*, 1996) e *E. coli* AG100 adaptada a 12 µg/mL de tetraciclina (AG100_{TET}), que possui uma super expressão deste sistema de efluxo (Viveiros *et al.*, 2005).

Como fluorocromo para monitorizar o transporte utilizou-se o EtBr, derivado quaternário de amónia, estruturalmente relacionado com as quinolonas, uma vez que apresenta dois níveis distintos de fluorescência. O EtBr emite níveis reduzidos de fluorescência em solução aquosa (fora das células), ocorrendo um incremento do sinal quando se encontra em ambiente não polar e hidrofóbico, no interior das células onde pode ligar-se a diversos alvos intracelulares (*e.g.*, ss-RNA, ds-RNA, ss-DNA, ds-DNA, sequencias de oligonucleotidos, proteínas) formando diversos complexos e eventualmente intercalar-se no ds-DNA. Neste caso, forma uma ligação forte e específica e o sinal e fluorescência é máximo (Borges-Walmsley *et al.*, 2003; Vardevanyan *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003a; Xu *et al.*, 2004; Ihmels e Otto, 2005 e Martins *et al.*, 2006). Os comprimentos de onda de excitação e emissão, resultante desta ligação, são, respectivamente, 546 nm e 595 nm (Ihmels e Otto, 2005). Esta característica faz com que esta molécula tenha sido reconhecida como a melhor candidata para a monitorização da actividade de efluxo, pelo que tem sido amplamente utilizada como substrato em

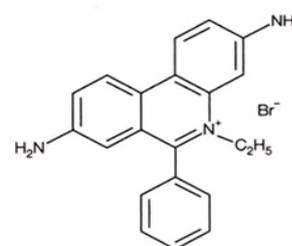


Figura 1.19. - Estrutura química do brometo de etídeo (retirado de <http://www.madsci.org>. Acedido em Setembro, 2007).

estudos de transporte (Xu *et al.*, 2004; Lorch *et al.*, 2005 e Martins *et al.*, 2006) o que permite a comparação dos resultados obtidos com trabalhos anteriores. Por outro lado, o EtBr é substrato comum de muitas BE em Enterobacteriaceae em particular do sistema de efluxo AcrAB-TolC (Bambeke *et al.*, 2006 e Piddock, 2006a), que o extrui activamente através da força protomotriz, desde que a sua concentração no meio não exceda a capacidade da bomba. Apresenta valores de concentração mínima inibitória genericamente elevados para as estirpes testadas ($MIC_{AG100}^{EtBr} = 150 \mu g/mL$; $MIC_{AG100_{TET}}^{EtBr} > 200 \mu g/mL$; $MIC_{AG100A}^{EtBr} = 5 \mu g/mL$) permitindo utilizar uma gama alargada de concentrações deste substrato, garantindo a viabilidade celular (Xu *et al.*, 2003a e Viveiros *et al.*, 2005). A garantia de viabilidade é um requisito fundamental para a correcta análise do efeito de um determinado composto sobre a actividade de efluxo. Adicionalmente, apresenta uma reconhecida fotoestabilidade (Xu *et al.*, 2004), que permite a avaliação da actividade de efluxo por períodos de tempo consideráveis. A actuação sinérgica da permeabilidade da membrana externa e da actividade de efluxo têm um papel crucial no controlo da acumulação intracelular de diversos compostos constituindo um mecanismo de auto protecção contra substâncias nocivas, como anteriormente referido (Nikaido, 2001 e Xu *et al.*, 2004). Este sinérgismo contribui para a resistência intrínseca e adquirida a uma diversidade de compostos estrutural e funcionalmente distintos, entre os quais antibióticos (Kyriacou *et al.*, 2004), permitindo aos microrganismos viverem e adaptarem-se em condições adversas, estando na origem de fenómenos de multirresistência bacteriana uma vez que esta tem sido associada à super-expressão de genes de efluxo endógenos (Ocaktan *et al.*, 1997). A acumulação de EtBr na célula é função destes dois fenómenos, sendo que a entrada do fluorocromo ocorre maioritariamente por difusão passiva, a favor do gradiente de concentração (Jernaes e Steen, 1994; Hancock, 1997; Palmer, 2003 e Xu *et al.*, 2004). Admite-se que este é um processo unívoco no sentido do meio intracelular, e que não ocorre *leaking out* de EtBr do interior da célula ou que se ocorre este é desprezável pois não é passível de ser quantificado pela tecnologia disponível, sendo o efluxo mediado essencialmente pela actividade do sistema AcrAB-TolC.

O incremento da intensidade da fluorescência, face a soluções de EtBr livre, representa uma medida do conteúdo intracelular de EtBr como resultado do equilíbrio dinâmico (reversível) entre o transporte difusivo e o transporte activo mediado por BE, no sentido oposto (Jernaes e Steen, 1994 e Palmer, 2003), Este equilíbrio será, então, função de uma multiplicidade de factores como sejam a permeabilidade da membrana externa e da membrana citoplasmática, do potencial de membrana ($\Delta\psi$), da força protomotriz (ΔpH), da actividade das bombas de efluxo e da concentração de substrato utilizada, entre outros (Midgley, 1986).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Estirpes Bacterianas

Utilizou-se a estirpe selvagem *Escherichia coli* K-12 AG100 (*argE3 thi-1 rpsL xyl mtl Δ(gal-uvrB) supE44*), que contém o sistema de efluxo AcrAB intacto e funcional. A estirpe *E. coli* K-12 AG100A (Δ *acrAB::Tn903 Kan^r*), que provém da estirpe AG100 e que tem o operão *acrAB* inactivo por inserção do gene *Kan* do transposão Tn903 (Okuso *et al.*, 1996). Estas estirpes foram caracterizadas e gentilmente cedidas pelo Dr. Hiroshi Nikaido (Departamentos de Química e Biologia Celular e Molecular, da Universidade da Califórnia, Berkeley, CA, USA). A estirpe *E. coli* AG100, susceptível à tetraciclina, foi induzida, por um processo de exposição a um aumento gradual da concentração de tetraciclina, a um nível elevado de resistência a este antibiótico (12 µg/mL TET), AG100_{TET}. Esta estirpe foi produzida no nosso laboratório e encontra-se caracterizada (Viveiros *et al.*, 2005).

2.2. Condições de Cultura

As estirpes de *E. coli* foram crescidas em 10 mL de meio Luria-Bertani (LB), a 37°C com agitação (220 rpm). Para a cultura de AG100A suplementou-se o meio com 100 µg/mL de canamicina (KAN), garantindo a pressão selectiva necessária para evitar a perda do transposão. Esta estirpe é resistente à KAN. A estirpe AG100_{TET} foi crescida na presença de 12 µg/mL de tetraciclina. Todas as estirpes foram armazenadas a 4°C em placa (LA), com o meio devidamente suplementado e inoculadas a partir destes *stocks* para o meio líquido.

2.3. Compostos

A canamicina (KAN) e a tetraciclina (TET) foram fornecidas pela Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid, Espanha). As soluções de TET foram preparadas em metanol da Pronalab (Lisboa, Portugal) enquanto que para a KAN o solvente foi água destilada estéril. Esta solução foi filtrada com filtros de seringa estéreis de PVDF com 0,22 µm de diâmetro de poro da Rotilabo[®] Carl Roth GmbH (Karlshure, Alemanha). As soluções *stock* foram armazenadas a - 20 °C.

O brometo de etídeo (EtBr) foi fornecido pela Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid, Espanha) e preparado em água destilada estéril. A dissolução do EtBr foi efectuada numa placa de aquecimento magnética SNIJDERS (Tilburg, Holanda), na *hotte*. Estas soluções foram armazenadas ao abrigo a luz a 4 °C. O tampão fosfato (PBS – *Phosphate Buffered Saline*) (10 mM, pH 7,4) e a glucose foram fornecidos, respectivamente, pela Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid, Espanha) e pela Merck (Darmstadt, Alemanha). A solução de glucose foi preparada em água destilada estéril, filtrada com filtros de seringa estéreis de PVDF com 0,22 µm de diâmetro de poro da Rotilabo[®] Carl Roth GmbH (Karlshure, Alemanha) e armazenada a 4 °C.

O *carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone* (CCCP) foi fornecido pela Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid, Espanha) e preparado em 50 % de água destilada estéril e 50 % de metanol. Para uma

dissolução eficaz colocou-se a solução em banho-maria numa placa de aquecimento DESAGA GmbH SARRSTED-Gruppe (Heidelberg, Alemanha). A solução foi armazenada ao abrigo da luz, à temperatura ambiente. O cianeto de potássio (KCN) foi adquirido na Merck (Darmstadt, Alemanha) e foi preparado com água destilada estéril. A clorpromazina (CPZ), a tioridazina (TZ) e o *phe-arg-naphthylamide* (PAN) foram fornecidas pela Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid, Espanha), preparadas em água destilada estéril e filtradas com filtros de seringa estéreis de PVDF com 0,22 µm de diâmetro de poro da Rotilabo[®] Carl Roth GmbH (Karlshure, Alemanha). Estas soluções foram armazenadas a – 20 ° C e ao abrigo da luz.

2.4. Viabilidade Celular

Para obter uma estimativa do número de células viáveis após cada ensaio no Rotor-Gene 3000[™], na presença de diferentes concentrações de EtBr e outros compostos, efectuaram-se diluições sucessivas das amostras ($10^0 - 10^{-5}$) em PBS e plaqueou-se 20 µL em placas de Petri com 20 mL de meio LA. Após 18 h de incubação a 37°C contou-se o número de unidades formadoras de colónias (CFU - *Colony Forming Units*). Como controlo e termo de comparação plaqueou-se as células antes e após cada ensaio no Rotor-Gene 3000[™] na ausência de qualquer agente químico.

2.5. Medições de Fluorescência – Fluorimetria em Termociclador de Tempo Real: Rotor-Gene 3000[™]

O protocolo *standard* para análise fluorimétrica foi desenvolvido tendo como ponto de partida o trabalho efectuado por Vorwieger *et al.* (2006), bem como os artigos publicados nos quais se efectuaram ensaios de transporte de brometo de etídeo em diversos microrganismos (e.g. Yerushalmi *et al.* (1995), Hsieh *et al.*, (1998), Kaatz *et al.*, (2000), Neyfakh *et al.* (2001), Stahl *et al.* (2001), Raherison *et al.* (2002), e Stephan *et al.* (2004)). Os valores para alguns parâmetros do protocolo por nós desenvolvido para *Escherichia coli* foram consultados em trabalhos anteriores, nos quais se utilizou este microrganismo, conforme indicado no protocolo base de análise fluorimétrica em tempo real que a seguir se descreve.

2.5.1. Protocolo standard de acumulação de EtBr por fluorimetria em termociclaor de tempo-real: Rotor-Gene 3000[™]

As culturas bacterianas de *E. coli* foram inoculadas em 10 mL de meio LB e incubadas a 37°C (Turner *et al.*, 1997; Herrera *et al.*, 2002; Bohnert *et al.*, 2005 e Schumacher *et al.*, 2006), com agitação (220 rpm). O crescimento celular foi acompanhado por medição da densidade óptica a 600 nm, até se obter $DO_{600} = 0,6$ (Hirata *et al.*, 2004), fase exponencial de crescimento, num espectrofotómetro de tubos de ensaio Sequoia–Turner Corporation (California, USA). A esta densidade óptica garante-se que as células estão em condições aeróbicas (Herrera *et al.*, 2002). As células foram recolhidas (alíquotas de 1 mL) por centrifugação a 13000 rpm durante 3 minutos à temperatura ambiente, numa

minicentrífuga Biofuge pico Heraeus da Kendro Laboratory Products GmbH (Osterode, Alemanha) (Edgar e Bibi, 1997; Lewinson *et al.*, 2003 e Hirata *et al.*, 2004). Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* duas vezes com tampão PBS, pH=7,4 (Bohnert *et al.*, 2005 e Schumacher *et al.*, 2006). Ajustou-se a DO₆₀₀ a 0,3 (Lewinson *et al.*, 2003), por ressuspensão do *pellet* no mesmo tampão utilizando o espectrofotómetro PU8600 UV/VIS Pye/Unicam Ltd., Philips (Cambridge, UK). Adicionou-se a fonte de energia, glucose, na concentração final de 0,4% (Edgar e Bibi, 1997; Bohnert *et al.*, 2005 e Schumacher *et al.*, 2006) e 1 µg/mL (2,5 µM) de brometo de etídeo (Bohnert *et al.*, 2005). Alíquotas de 100 µL foram distribuídas por microtubos de 0,2 mL. Os inibidores das BE foram adicionados nas concentrações desejadas. As medições fluorimétricas em tempo real foram efectuadas no Rotor-Gene 3000™ da Corbett-Research (Sydney, Austrália), utilizando o filtro para comprimentos de onda de excitação de 530 nm *band-pass* (bp) e como filtro de detecção o filtro de 585 nm *high-pass* (hp), canal A.530/585hp. As medições fluorimétricas decorreram a 37 °C e foram adquiridas em ciclos de 60 segundos.

2.5.2. Protocolo de efluxo por fluorimetria em termociclador de tempo real: Rotor-Gene 3000™

O desenho deste protocolo teve por base os trabalhos de Neifkan *et al.*, (1991), Klyachko *et al.*, (1997), Hsiegh *et al.*, (1998), Markham *et al.*, (1999), Kaatz *et al.*, (2000) e Lewinson *et al.* (2003).

Este protocolo pode dividir-se em duas partes: (A) parte de carregamento, que consiste em carregar as bactérias com EtBr na presença de um inibidor de BE, numa concentração não letal (1/2 MIC) numa abordagem semelhante ao protocolo anterior; (B) efluxo de EtBr, que consiste em monitorizar o decréscimo de fluorescência devido à saída de EtBr das células pela actividade de efluxo, após transferir as bactérias para um meio livre de EtBr.

(A) Carregamento

Sucintamente, as culturas bacterianas de *E. coli* foram incubadas em 10 mL de meio LB, a 37°C, com agitação (220 rpm). O crescimento celular foi acompanhado por medição da densidade óptica a 600 nm, até se obter DO₆₀₀ = 0,6. As células foram recolhidas (alíquotas de 1 mL) por centrifugação a 13000 rpm durante 3 minutos à temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* duas vezes com tampão PBS, pH 7,4, ajustando-se, em seguida, a DO₆₀₀ a 0,3, por ressuspensão do *pellet* no mesmo tampão. Adicionou-se brometo de etídeo na concentração final de 1 µg/mL, e o inibidor da actividade de efluxo uma concentração equivalente a ½ da MIC. O tempo de incubação foi de 60 minutos a 25°C. A monitorização da fluorescência foi efectuada a 25 °C, com aquisições em intervalos de 60 segundos utilizando os filtros de excitação de 530 nm bp e como filtro de detecção o filtro de 585 nm hp canal A.530/585hp.

(B) Efluxo de EtBr

Após o período de carregamento, centrifugou-se 1 mL da suspensão celular a 13000 rpm durante 3 minutos à temperatura ambiente, descartou-se o sobrenadante e ajustou-se a DO_{600} a 0,3, por ressuspensão do *pellet* em PBS. Adicionou-se a fonte de energia, glucose, na concentração de 0,4 %. Quando desejado adicionaram-se inibidores. Alíquotas de 100 μ L foram distribuídas para os microtubos de 0,2 mL do Rotor-Gene 3000TM. A medição da fluorescência foi monitorizada a 37°C sendo as aquisições efectuadas em ciclos de 60 segundos, utilizando o filtro para comprimentos de onda de excitação de 530 nm bp e como filtro de detecção o filtro de 585 nm hp, canal A.530/585hp.

2.5.3. Protocolo para modelação do transporte de EtBr em *E. coli* por fluorimetria em termociclador de tempo real: Rotor-Gene 3000TM

Este protocolo foi desenhado tendo como ponto de partida o protocolo *standard* e atendendo à necessidade de quantificar o EtBr intracelular que resulta da acumulação do EtBr nas células.

Incubou-se as culturas bacterianas de *E. coli* em 10 mL de meio LB, a 37°C, com agitação (220 rpm). O crescimento celular foi acompanhado por medição da densidade óptica a 600 nm, até se obter $DO_{600} = 0,6$. As células foram recolhidas (alíquotas de 1 mL) por centrifugação a 13000 rpm durante 3 minutos à temperatura ambiente, numa minicentrífuga. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* duas vezes com tampão PBS, pH=7,4, e ajustou-se da DO_{600} a 0,3, por ressuspensão do *pellet* no mesmo tampão. Adicionou-se a fonte de energia, glucose, na concentração final de 0,4% e o brometo de etídeo nas concentrações de 1 a 6 μ g/mL para *E. coli* AG100 e AG100_{TET}, e 0,125 a 1,5 μ g/mL para *E. coli* AG100A. Alíquotas de 100 μ L foram distribuídas por microtubos de 0,2 mL, em réplicas de seis microtubos, para cada concentração de EtBr. As medições fluorimétricas em tempo real foram efectuadas no Rotor-Gene 3000TM da Corbett-Research (Sydney, Austrália), utilizando o filtro para comprimentos de onda de excitação de 530 nm bp e como filtro de detecção o filtro de 585 nm hp, canal A.530/585hp. As medições fluorimétricas decorreram a 37 °C, com aquisições em intervalos de 60 segundos, por um período de tempo suficiente de modo a atingir-se o estado estacionário.

Após este período juntou-se os microtubos correspondentes a cada concentração de EtBr, e centrifugou-se o volume de 0,6 mL a 13000 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente, numa minicentrífuga Biofuge pico Heraeus da Kendro Laboratory Products GmbH (Osterode, Alemanha), de modo a depositar o maior número de células possível, recolhendo-se o sobrenadante. O volume de 0,6 mL de sobrenadante correspondente a cada concentração de EtBr foi filtrado utilizando filtros PVDF Durapore, Millex[®] –GV₁₃, de 0,22 μ m de diâmetro de poro e 13 mm de diâmetro da Millipore Corporation (Bedford, USA). Foram removidas alíquotas de 100 μ L de filtrado, para cada concentração de EtBr, e a fluorescência foi monitorizada como previamente descrito.

2.6. Estratégia e rotina de cálculo para a determinação da concentração de EtBr intracelular

Na sequência do protocolo anterior e no sentido de aplicar o modelo matemático desenvolvido (ponto 3.2. da discussão) é necessário converter os dados fluorimétricos em concentração de EtBr intracelular.

A estratégia desenvolvida baseia-se na diferença de fluorescência entre o EtBr livre em solução FL(EtBr em solução), que é possível dosear directamente usando o Rotor-Gene 3000™ nas condições definidas anteriormente, e no interior das células onde ocorre a amplificação do sinal de fluorescência o que impossibilita a sua quantificação directa.

1. Assim com os dados de fluorescência de soluções de EtBr livre estabelece-se uma primeira curva de calibração que relaciona a concentração de EtBr com fluorescência;

2. A cinética de acumulação de EtBr nas células é efectuada de acordo com o descrito (protocolo 2.5.3). O sinal de FL(Células + EtBr) é acompanhado até se atingir um estado estacionário na acumulação de EtBr nas células altura em que se efectua a centrifugação e filtração;

3. Após a centrifugação e filtração, lê-se o sinal de fluorescência do filtrado, $FL(EtBr)_{filtrado\ experimental} = FL(EtBr)_{filt\ exp}$, para cada concentração de EtBr (protocolo 2.5.3.). Esta $FL(EtBr)_{filt\ exp}$, medida experimentalmente, corresponde a uma concentração de EtBr livre no meio, contabilizando apenas o sinal de fluorescência que “sobrou” depois das células terem acumulado EtBr e o sobrenadante ter sido filtrado. Este valor corresponde a uma concentração de EtBr que é inferior à concentração de EtBr caso não tivessemos filtrado, pelo que o valor $FL(EtBr)_{filt\ exp}$ terá de ser corrigido, para um valor de fluorescência real $FL(EtBr)_{filtrado\ real} = FL(EtBr)_{filt\ real}$;

4. Para quantificar o EtBr que se perde após filtração por ficar retido no filtro efectuou-se a filtração de soluções de EtBr a diferentes concentrações (0,25 - 6 µg/mL) para achar uma relação entre a fluorescência antes e a fluorescência depois de filtrar. Esta segunda curva de calibração permite contabilizar a quantidade de EtBr retida no filtro $FL(EtBr)_{retido\ filtro}$ e permite converter os dados de $FL(EtBr)_{filt\ exp}$ em $FL(EtBr)_{filt\ real}$;

5. A diferença entre fluorescência inicial do meio (FL EtBr em solução) e a fluorescência do meio após as células terem sido centrifugadas e filtradas e este valor corrigido para contabilizar as perdas no filtro, $FL(EtBr)_{filt\ real}$, corresponde a um valor de $FL(EtBr)_{intracelular}$. De salientar que o volume se mantém constante em todo o processo.

6. Através da primeira curva de calibração obtida no passo (1), converte-se a $FL(EtBr)_{intracelular}$ em $[EtBr]_{int}$;

7. Aos dados das curvas de acumulação obtidos para cada concentração de EtBr, FL(Células + EtBr) subtrai-se o *background* correspondente à fluorescência do EtBr em solução, para a respectiva concentração;

8. Com os valores do último ponto de fluorescência correspondentes às curvas de acumulação de EtBr nas células devidamente descontadas do *background* (passo 7) e os valores de $[EtBr]_{int}$

obtidos no passo **(6)** é possível traçar uma terceira curva de calibração, que relaciona a concentração de EtBr intracelular e a fluorescência intracelular das células;

9. Com esta curva de calibração convertem-se os dados experimentais de fluorescência relativa à acumulação de EtBr das células descontadas do *background* ($FL(\text{Células} + \text{EtBr}) - FL(\text{PBS} + \text{EtBr})$) ao longo do tempo em concentrações de EtBr intracelular em função do tempo;

10. Utilizando o *software Table Curve*TM 2D da Jandel Scientific - AISN SoftwareSTATISTICA, ajusta-se a equação do modelo aos dados de $[EtBr]_{int}$ vs tempo e determinam-se os valores das constantes k^+, k^- .

3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste trabalho desenvolveram-se protocolos e um modelo matemático mecanicista assentes numa inovadora tecnologia de fluorimetria em termociclador de tempo real, que permitiram a demonstração e quantificação da actividade de efluxo quer em estirpes clinicamente susceptíveis aos antibióticos como em estirpes com fenótipos de multirresistência, ou seja, com diferentes graus de actividade de efluxo.

Como referido, o protocolo foi desenvolvido tendo como estirpe padrão *Escherichia coli* K-12 AG100, que contém o sistema de efluxo AcrAB intacto e funcional. Como fluorocromo para a monitorização do transporte utilizou-se o EtBr e o sinal de fluorescência pôde ser monitorizado utilizando o Rotor-Gene 3000™ da Corbett Research (Sydney, Austrália), com os comprimentos de onda de excitação e emissão, 530 nm bp e 585 nm hp, respectivamente.

A discussão desta tese será efectuada em duas fases. Numa primeira fase (conceptual) pretende-se demonstrar a aplicabilidade do protocolo e tecnologia na demonstração qualitativa da actividade (intrínseca) de efluxo. Na segunda fase aplicar-se-á o modelo matemático desenvolvido para quantificar a contribuição do efluxo nos diferentes fenótipos testados.

3.1. Caracterização do Transporte de EtBr

Na interpretação dos resultados é fundamental ter presente os conceitos básicos que estiveram na origem do desenho do protocolo e pressupostos que se pretendem confirmar experimentalmente (ponto 1.6.2. da introdução). Sucintamente, a acumulação de EtBr na célula é o resultado do equilíbrio dinâmico entre a difusão passiva no sentido do meio intracelular e o transporte activo mediado por BE no sentido inverso, em particular pelo sistema AcrAB-TolC, que o efectua de acordo com a força protomotriz. Este equilíbrio é função de uma diversidade de factores como sejam a permeabilidade da parede celular, o grau de actividade de efluxo e de energização da célula entre outros factores. Uma vez no interior da célula ocorre um incremento do sinal de fluorescência face a soluções de EtBr livre como resultado da ligação do EtBr a diversos alvos intracelulares.

Demonstração da Actividade Intrínseca das Bombas de Efluxo

Para testar a aplicabilidade do protocolo desenvolvido à monitorização do transporte de EtBr e à sua capacidade em detectar a actividade intrínseca das BE em *E. coli* K-12 AG100, procedeu-se de acordo com o descrito no protocolo 2.5.1. Uma vez que o EtBr fluoresce no UV tem de se otimizar a concentração mínima a utilizar para monitorizar o seu transporte aos comprimentos de onda utilizados (comprimento de onda de excitação 530 nm emitindo a 585 nm). Para demonstrar a actividade intrínseca dos sistemas de efluxo implica que se identifique a concentração mínima de EtBr que produz o mínimo de acumulação nas células nas condições óptimas de energização para depois testar as variáveis que afectam o efluxo (temperatura e fonte de carbono), uma vez que é

conhecida a dependência energética destes sistemas. Deste modo, utilizaram-se concentrações diferentes de EtBr, na presença e ausência de células (Figura 3.1.1.).

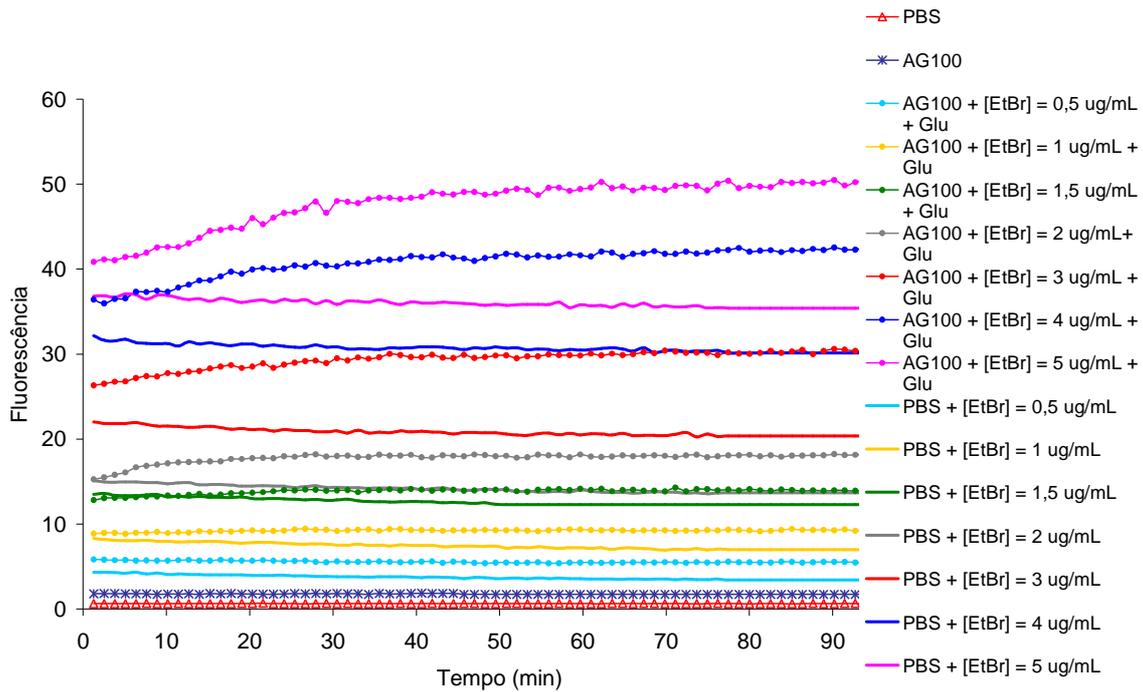


Figura 3.1.1. - Monitorização da intensidade de fluorescência do EtBr em solução (PBS) e da acumulação de diferentes concentrações de EtBr em *E. coli* AG100, a 37 °C e na presença de [Glu] = 0,4%, ao comprimento de onda de excitação de 530 nm bp e de emissão de 585 nm hp.

Após o ensaio, a viabilidade celular é praticamente 100 % para toda a gama de concentrações de EtBr utilizadas. Este resultado corresponde a uma média aritmética dos valores obtidos em diversos ensaios. A determinação da viabilidade celular no final do ensaio para cada controlo é essencial para que se possa avaliar a actividade de um determinado composto sobre as BE. Há que garantir que este é usado em concentrações não letais, de modo a que a fluorescência resultante da acumulação de EtBr ao longo do tempo se deva apenas à difusão do EtBr na célula como resultado do equilíbrio dinâmico entre a difusão passiva no sentido do meio intracelular e o transporte activo mediado por BE no sentido oposto. E não à entrada facilitada de EtBr nas células mortas (que advém da exposição a concentrações letais dos compostos utilizados) ou à ligação do fluorocromo a componentes celulares que se encontram livres no meio como resultado da lise celular, de onde resultaria um incremento do sinal de fluorescência. Só o uso de concentrações não letais de compostos permite avaliar o seu efeito na inibição da actividade de efluxo. Adicionalmente, tem de se garantir que o sinal fluorimétrico detectado não se deve ao efeito de um composto sobre uma subpopulação mas antes a uma percentagem significativa de bactérias, uma vez que é difícil destrinçar a contribuição das células mortas e vivas no incremento do sinal de fluorescência. De referir que no cálculo da percentagem de viabilidade celular, tomou-se como 100 % de viabilidade duas referências distintas. Para a determinação da percentagem de viabilidade da suspensão após o ensaio, tomou-se como 100 % as unidades formadoras de colónias (CFU) correspondentes a células sem EtBr antes de serem

submetidas ao ensaio no Rotor-Gene 3000™. Deste modo, avalia-se a morte celular como resultado das condições experimentais. Para o cálculo da viabilidade das células com EtBr e com os demais inibidores tomou-se como 100 % de viabilidade, as células sem EtBr após o ensaio. Tal procedimento permite avaliar a morte celular como consequência do efeito de cada inibidor, independentemente da morte causada pelas condições do ensaio, embora, como demonstrado no trabalho anterior (Paixão, 2006) não ocorre morte significativa resultante das condições experimentais.

O resultado de viabilidade celular está de acordo com o esperado uma vez que se utilizaram concentrações muito inferiores ao valor da MIC para esta estirpe $MIC_{AG100}^{EtBr} = 150 \mu\text{g/mL}$ (Viveiros *et al.*, 2005),

Na Figura 3.1.2. procura-se os limites superior e inferior das concentrações de EtBr que o sistema consegue monitorizar nas condições anteriormente definidas.

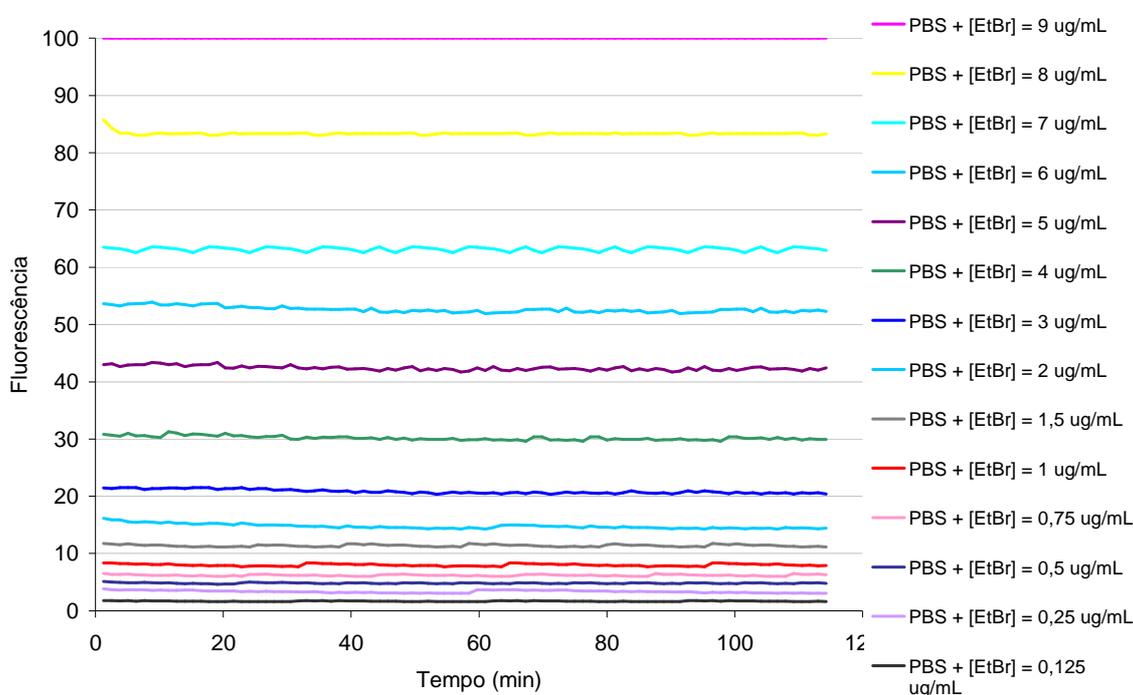


Figura 3.1.2. – Monitorização da fluorescência de diferentes concentrações de EtBr livre em solução ao comprimento de onda de excitação de 530 nm bp e de emissão de 585 nm hp.

Do conjunto das Figuras 3.1.1. e 3.1.2. podemos verificar que o EtBr fluoresce em solução para os comprimentos de onda utilizados, sendo o sinal proporcional à concentração. Esta característica permite o doseamento do EtBr em solução o que será útil para a modelação como veremos mais adiante. Os resultados revelam a alta sensibilidade do Rotor-Gene 3000™, que permite destringir variações de 0,125 $\mu\text{g/mL}$ de EtBr numa gama entre 0,125 $\mu\text{g/mL}$ e 9 $\mu\text{g/mL}$, para as condições utilizadas. A intensidade da fluorescência de EtBr no tampão (PBS) permanece praticamente constante durante cerca de 100 minutos o que demonstra a fotoestabilidade do EtBr e permite a análise fluorimétrica, sem perda da sua actividade, por um período de tempo relativamente alargado. Este resultado está de acordo com o obtido por Xu *et al.*, (2003a). Por outro lado, estes resultados

revelam a existência de um *background* associado às leituras fluorimétricas (correspondente ao EtBr em solução) que terá de ser descontado na interpretação dos dados relativos à acumulação de EtBr em células, tendo particular importância na modelação como veremos adiante. O EtBr em solução emite sinais de fluorescência menos intensos quando comparado com o EtBr na presença de células (Figura 3.1.1.). Nestas condições ocorre um incremento do sinal que resulta da acumulação de EtBr no meio intracelular e consequente ligação aos componentes intracelulares, nomeadamente ao ds-DNA. São estas alterações na intensidade da fluorescência que permitem a monitorização da cinética de acumulação de EtBr em células intactas.

Da Figura 3.1.1. observa-se ainda que:

a) as células (controlo – AG100) não fluorescem por si só. A fluorescência intrínseca associada aos fluorocromos naturais das proteínas, em particular dos aminoácidos tirosina e triptofano, não é detectada, nem constitui uma interferência para os comprimentos de onda utilizados. Os comprimentos de onda de excitação da tirosina e do triptofano, são, respectivamente 275 e 295 nm e os comprimentos de onda de emissão correspondem a 310 e 340 nm, respectivamente (Borges-Walmsley *et al.*, 2003). A utilização de tampão PBS como meio para ressuspensão das células para efectuar as leituras fluorimétricas no Rotor-Gene 3000TM, em detrimento do meio LB, evita a fluorescência intrínseca associada às proteínas deste último (Jones *et al.*, 2003) como evidenciado pelo controlo PBS (Figura 3.1.1.) que não apresenta fluorescência e consequentemente não interfere no sinal das leituras fluorimétricas. Ao mesmo tempo, cria as condições ideais para que se interrompa a replicação (meio mínimo), garantindo que não ocorre um aumento no número de efectivos durante o ensaio. Este resultado foi comprovado no trabalho anterior (Paixão *et al.*, 2006). Acresce ainda que os microrganismos patogénicos crescem num ambiente de limitação nutricional no hospedeiro, pelo que os ensaios devem ser efectuados em meio mínimo, para uma maior aproximação à realidade (Bailey *et al.*, 2006).

b) As células uma vez na presença de EtBr vão incrementando o seu sinal de fluorescência face aos controlos só com células (AG100) e face ao EtBr livre em solução (linhas simples), até se atingir um estado estacionário. O incremento do sinal é o reflexo da acumulação e ligação aos alvos intracelulares e o estado estacionário reflete o estabelecimento do equilíbrio dinâmico entre o processo difusivo no sentido do meio intracelular (função da permeabilidade da membrana) e a actividade de efluxo no sentido inverso mediada, em parte, pelo sistema AcrAB-TolC que nesta estirpe se encontra activo e funcional e que tem como substrato o EtBr (Yu *et al.*, 2003; Mckeegan *et al.* 2004 e Piddock, 2006a).

c) A acumulação de diferentes concentrações de EtBr em *E. coli* AG100, sob condições que maximizam o efluxo, ou seja, 37 °C e na presença de glucose (0,4 %) inicia-se para concentrações superiores a 1 µg/mL de fluorocromo (Figura 3.1.1.). Os níveis basais de fluorescência observados nas células na presença de 1 µg/mL EtBr reflectem a resistência intrínseca desta bactéria ao fluorocromo, que se traduz numa actividade de efluxo basal que leva a uma retenção mínima de EtBr a 37 °C na presença de glucose. Pelo que deverá ser esta a concentração a utilizar para a demonstração da actividade intrínseca de efluxo. Esta concentração corresponde a um valor muito inferior aos valores de MIC para esta e outras estirpes a testar

($MIC_{AG100}^{EtBr} = 150 \mu\text{g/mL}$; $MIC_{AG100TET}^{EtBr} = 200 \mu\text{g/mL}$ e $MIC_{AG100A}^{EtBr} = 5 \mu\text{g/mL}$) (Viveiros *et al.*, 2005), não exercendo um efeito bacteriostático, pelo que assegura a viabilidade celular no final do ensaio. Adicionalmente, corresponde a 10 % do limite de detecção do aparelho, o que permite acompanhar a cinética de acumulação de EtBr na presença de inibidores de BE. Intensidades de fluorescência acima deste valor basal reflectem desequilíbrios no processo de influxo e efluxo de EtBr o que permite avaliar a acção de determinado agente na acumulação de EtBr. Quanto maior o sinal de fluorescência significa que uma maior quantidade de EtBr se acumulou na célula e se ligou aos alvos intracelulares nomeadamente ao ds-DNA e, por conseguinte, maior a inibição das BE. O sinal de fluorescência é inversamente proporcional à actividade das BE. Quando este atinge o máximo significa que todos os mecanismos de resistência ao influxo de EtBr na célula foram inibidos e, por conseguinte, a entrada do fluorocromo depende apenas da difusão. Adicionalmente, esta concentração reduzida não interfere na difusão de outras moléculas, ou seja, não exerce um efeito de competição quando na presença, por exemplo, de inibidores (Xu *et al.*, 2004). Por outro lado, a concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ tem sido um valor recorrente em outros estudos de cinética de transporte em *E. coli*, o que permite comparar os resultados obtidos com trabalhos anteriores.

Um aspecto comum a todas as BE é a sua dependência energética que advém da hidrólise enzimática de ATP. Dado o efluxo de substratos ser um processo enzimático é, por conseguinte, dependente da temperatura. Enquanto as BE de um só componente obtêm energia directamente da hidrólise de ATP por cinases ou ATPases, os sistemas multicomponentes, como seja o sistema tripartido AcrAB-TolC, de *E. coli*, obtêm energia a partir do gradiente protónico gerado pela cadeia transportadora de electrões ou pela hidrólise de ATP por ATPases dependentes da temperatura (Martins *et al.*, 2006). Deste modo, quando são empregues condições energeticamente limitantes, como sejam, decréscimo de temperatura (25 °C), ausência de fonte de carbono (glucose) ou ambas em simultâneo será expectável a ocorrência de um incremento na acumulação de EtBr nas células, em particular para 1 $\mu\text{g/mL}$ de EtBr, que nas condições óptimas de efluxo gera o mínimo de acumulação (Figuras 3.1.3. e 3.1.4.) dada a dependência energética destes sistemas.

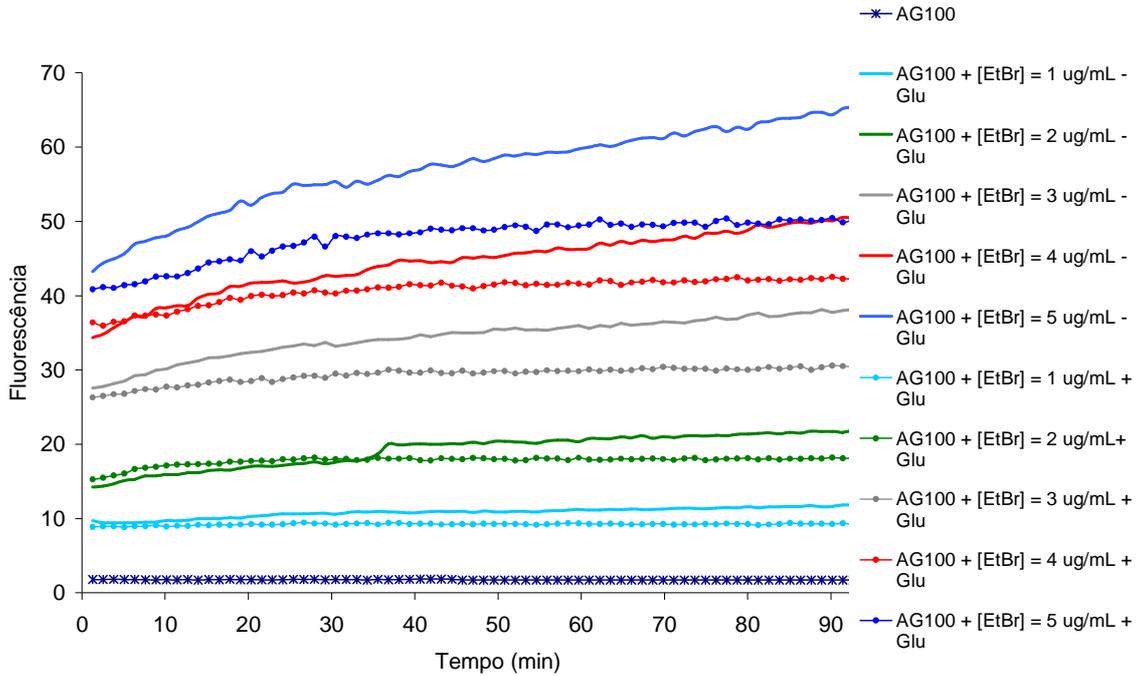


Figura 3.1.3. - Influência da ausência da fonte de carbono na acumulação de EtBr em *E. coli* AG100 a 37 °C. Comparação com as condições óptimas de efluxo (37°C e [Glu]=0,4%).

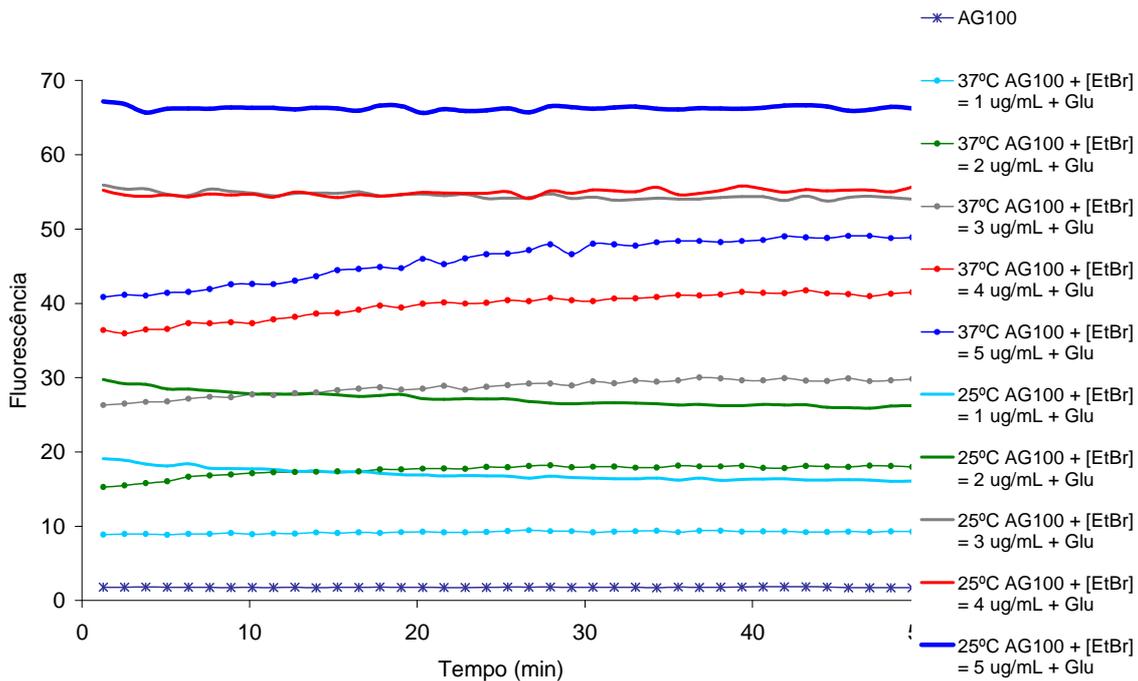


Figura 3.1.4. – Influência da redução da temperatura (25 °C) na acumulação de EtBr em *E. coli* AG100 na presença de [Glucose] = 0,4 %. Comparação com as condições óptimas de efluxo (37°C e [Glu]=0,4%).

Ao eliminar-se a fonte de carbono (glucose) está a inibir-se a actividade das BE que obtém energia a partir da hidrólise de ATP e também as dependentes do gradiente protónico, uma vez que estas duas componentes estão interligadas. A célula não produz ATP e portanto, não tem energia para activar os seus sistemas de efluxo, sendo o equilíbrio dinâmico deslocado no sentido do meio intracelular o que

resulta numa maior acumulação de EtBr no interior das células e consequente ligação deste aos alvos intracelulares, mesmo a 37 °C (Figura 3.1.3.). Na ausência de glucose para o tempo em que decorre o ensaio não se atinge um estado estacionário, ou seja, um equilíbrio entre os dois fenómenos de transporte a difusão no sentido do meio intracelular e o transporte activo mediado por BE no sentido oposto. Este efeito é mais notório para concentrações maiores de EtBr. O influxo permanente de EtBr denota a dependência da actividade de efluxo da fonte de carbono.

Do mesmo modo e dado este ser um processo enzimático, o decréscimo da temperatura origina um incremento na acumulação de EtBr, uma vez que se inibem estes sistemas de efluxo (Figura 3.1.4.).

Os resultados expressos nas Figuras 3.1.3. e 3.1.4. estão de acordo com o esperado o que demonstra a dependência energética dos sistemas de efluxo em particular de AcrAB-TolC que tem o EtBr como substrato e que, para esta estirpe, se encontra activo e funcional. A Figura 3.1.5. sintetiza este comportamento para as diferentes concentrações de EtBr após 30 minutos de ensaio.

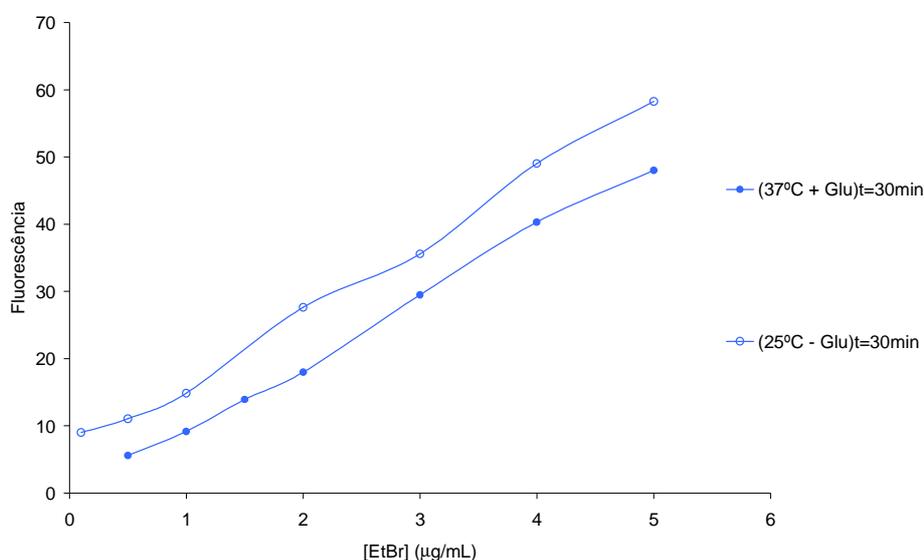


Figura 3.1.5. – Síntese da influência da ausência de glucose e redução da temperatura face às condições óptimas de efluxo (37 °C na presença de [Glucose] = 0,4 %), após 30 min de ensaio. A ausência de glucose e redução de temperatura provocam um incremento na acumulação de EtBr face às condições óptimas de efluxo.

A demonstração final da dependência energética dos sistemas de efluxo de EtBr em *E. coli* encontra-se na Figura 3.1.6., onde se demonstra que o decréscimo da temperatura para 25 °C reduz em 90 % a concentração mínima de EtBr (0,1 µg/ml) que provoca uma acumulação idêntica a 1 µg/ml de EtBr nas condições óptimas de efluxo (37 °C e presença de glucose). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Martins *et al.*, (2006).

Deste modo, o protocolo de acumulação desenvolvido, a metodologia utilizada e a estratégia seguida permitiu demonstrar com elevada sensibilidade a actividade intrínseca de efluxo em *E. coli* AG100 e a sua dependência energética uma vez que a cinética de acumulação reage consistentemente às variações de temperatura e à presença ou ausência da fonte de carbono. Estes resultados permitiram demonstrar que o efluxo é um fenómeno de transporte activo o que está de acordo com os demais trabalhos anteriores.

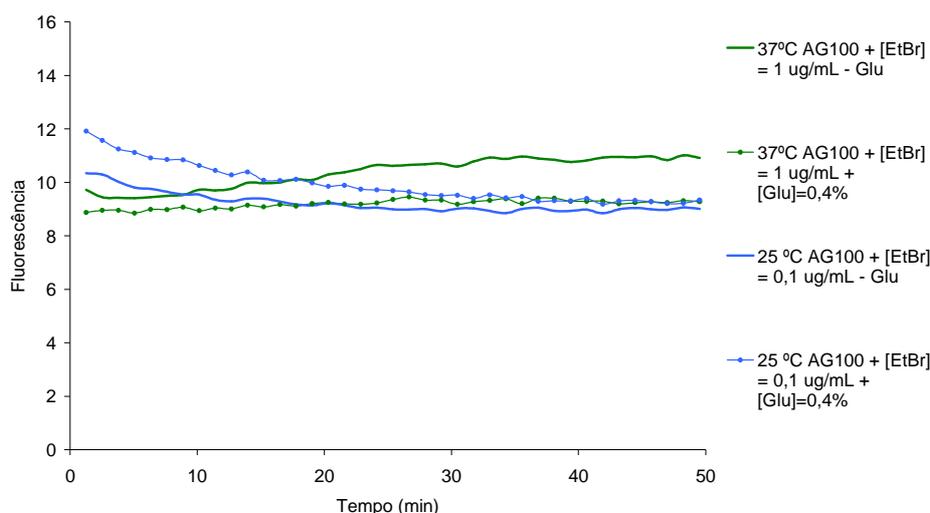


Figura 3.1.6. - Influência da ausência de glicose e da redução da temperatura (25 °C) na acumulação intracelular de EtBr. Concentração de EtBr que produz uma acumulação idêntica a 1 µg/mL de EtBr nas condições óptimas de efluxo.

Contudo os protocolos de acumulação e as cinéticas de acumulação de EtBr são apenas uma medida indirecta da capacidade de efluxo de uma bactéria, estando sujeitos a variações devidas a mudanças da sua permeabilidade. A melhor forma de se ter uma medida directa da actividade de efluxo de uma bactéria e de se demonstrar inequivocamente a actividade de um inibidor de BE será ao poder-se isolar e visualizar esse efluxo a ocorrer na ausência do inibidor. A tecnologia bem como as metodologias desenvolvidas neste trabalho oferecem essa possibilidade.

Demonstração da Actividade de Efluxo e do Efluxo Activo

Empregando as condições óptimas nas quais ocorre uma acumulação reduzida de EtBr (1 µg/mL, 37 °C na presença de glicose) e adicionando concentrações crescentes de inibidores é possível identificar a concentração mínima de inibidor que gera acumulação de EtBr. Esta estratégia foi empregue anteriormente (Paixão, 2006), tendo-se estudado o efeito inibitório na actividade de efluxo produzido pela presença de compostos como o *carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone* (CCCP), a clorpromazina (CPZ), tioridazina (TZ), verapamil (VP) e o *phe-arg-naphthylamide* (PAN), em *E. coli* AG100, e em particular, sobre o sistema AcrAB-TolC, por comparação com a estirpe AG100A que possui este sistema inactivo. De entre os inibidores estudados os mais promissores foram as fenotiazinas que, quando usadas em concentrações que não inibam a replicação e não sejam letais para as bactérias, produzem efeitos muito significativos na acumulação de EtBr em *E. coli*.

O CPZ pertence à família das fenotiazinas. Esta é uma molécula receptora antagonista e inibidora da ligação do cálcio à proteína calmodulina, em bactérias. Inibe a actividade de ATPases (e de outras enzimas) dependentes de cálcio por inibição do acesso a este catião o que promove a inibição dos processos de transporte (influxo e efluxo) (Kaatz *et al.*, 2003 e Amaral *et al.*, 2007). A existência de

Ca^{2+} livre no meio intracelular tem uma função fulcral na regulação dos processos fisiológicos em procariontes, como a divisão celular e sinalização na transdução (Jones *et al.*, 2003). É utilizada como neuroléptico e antiemético e evidencia um efeito modesto mas extenso de actividade antimicrobiana (Kaatz *et al.*, 2003). Os mecanismos através dos quais exerce a sua função antimicrobiana e/ou potencia a actividade de outros agentes antimicrobianos em bactérias, recai sobre a capacidade de matar as bactérias fagocitadas (Kaatz *et al.*, 2003 e Ordway *et al.*, 2003). Provou-se que as fenotiazinas têm uma acção inibitória na actividade das BE potenciando, deste modo, a acção de outros agentes antimicrobianos, reduzindo a resistência a antibióticos e, em alguns casos, sendo responsáveis pela reversão total da resistência em células cancerígenas e bactérias (Kaatz *et al.*, 2003; Ordway *et al.*, 2004 e Amaral *et al.*, 2007). De acordo com Kaatz *et al.*, (2003) a inibição das BE por estas fenotiazinas pode envolver a interacção directa com a bomba e em menor extensão a redução do potencial de membrana. As fenotiazinas alteram a morfologia das bactérias para concentrações inferiores àquelas que inibem a sua replicação. Em *E. coli*, provocam a filamentação da bactéria (Ordway *et al.*, 2003).

A Figura 3.1.7. demonstra que concentrações crescentes de CPZ (5 a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) promovem incrementos na acumulação de EtBr, de um modo dependente da concentração de inibidor, que não ocorrem na ausência destas moléculas, em condições de máximo efluxo (37 °C e presença de glucose). As concentrações utilizadas são inferiores ao valor de MIC previamente determinado ($\text{MIC}_{\text{AG100}}^{\text{CPZ}} = 60\mu\text{g}/\text{mL}$) (Viveiros *et al.*, 2005) pelo que se assegura a não letalidade destes inibidores.

O incremento do sinal de fluorescência resulta da maior acumulação de EtBr e a sua consequente ligação aos alvos intracelulares, como resultado da inibição das BE. A inibição do efluxo na presença de glucose origina que o estado estacionário seja atingido a um tempo superior ao ocorrido para as células na presença somente de EtBr. No entanto, este patamar ocorre para um tempo inferior ao observado na inibição na ausência da fonte de carbono. Nesta situação, ocorre uma maior acumulação de EtBr sendo o equilíbrio entre os processos difusivo e o transporte activo mediado por BE atingido mais tardiamente. Neste último caso, o efeito mais pronunciado na acumulação intracelular de EtBr evidencia o sinergismo entre a ausência da fonte de carbono e a presença de inibidor.

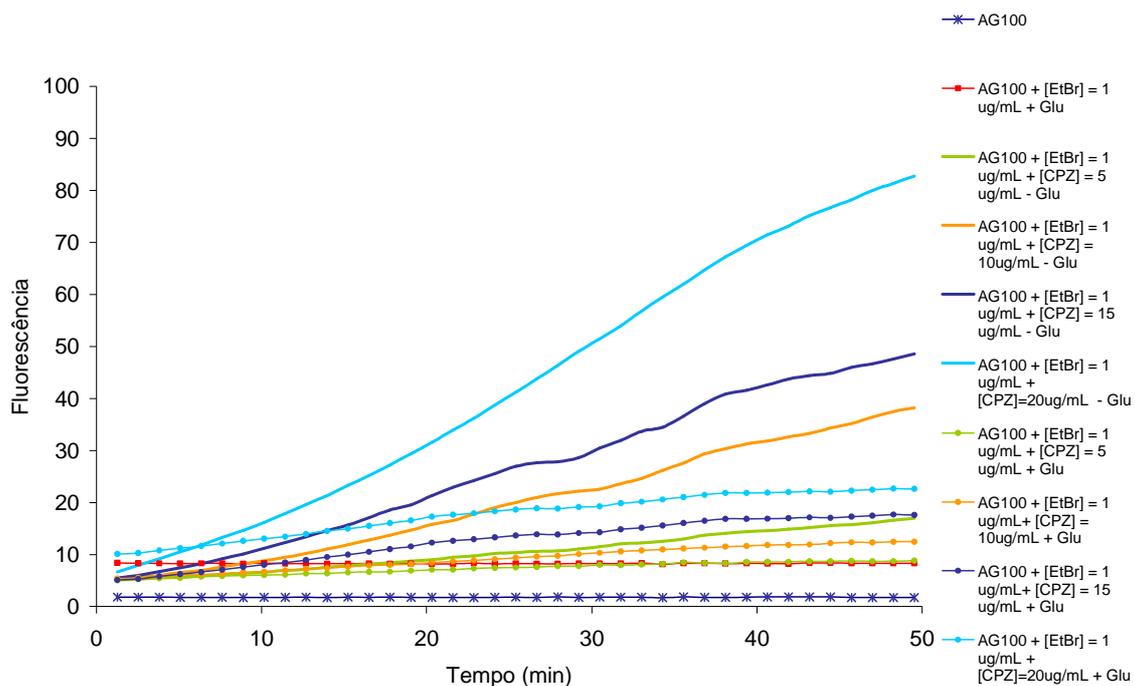


Figura 3.1.7. - Influência de concentrações crescentes de CPZ na acumulação intracelular de 1 µg/mL de EtBr em *E. coli* AG100 a 37 °C na ausência e presença de glicose (0,4%).

Para tentar destrinçar e isolar a componente do efluxo da componente da difusão adopta-se uma estratégia de carregamento das células com EtBr sendo estas lavadas e o meio substituído por novo meio sem fluorocromo, como descrito no protocolo 2.5.2. Ao garantir-se condições experimentais de máxima acumulação uma maior quantidade de EtBr irá acumular-se nas células e assim poder-se-á visualizar melhor o efluxo quando o inibidor for retirado do meio.

Através dos resultados anteriores definem-se como melhores condições para favorecer a acumulação de 1 µg/mL EtBr a ausência de glicose, acumulação a 25 °C e na presença de uma concentração não letal de inibidor. Após lavagem para a remoção do EtBr e inibidor o meio é repostado substituindo-o por (1) meio sem glicose e sem inibidor; (2) meio com glicose e sem inibidor; (3) meio sem glicose e com inibidor e (4) meio com glicose e com inibidor. Esta abordagem permitirá comprovar a dependência energética (fonte de carbono) dos sistemas de efluxo, avaliar de um modo mais directo o efeito inibitório dos inibidores de BE e determinar a concentração óptima que inibe totalmente estes sistemas, se se utilizar uma gama de concentrações de inibidor. A fluorescência foi monitorizada durante 15 minutos a 37 °C, de acordo com o descrito no protocolo 2.5.2.. Os resultados de efluxo são apresentados em termos de fluorescência relativa uma vez que este é um fenómeno muito rápido que ocorre nos primeiros instantes que decorrem entre a lavagem e o início das leituras fluorimétricas no Rotor-Gene 3000™, havendo alguma discrepância entre o sinal de fluorescência final resultante da acumulação de EtBr na presença do inibidor e o sinal de fluorescência inicial no ensaio de efluxo devido ao facto de ser impossível proceder à lavagem das células sem interromper a captura de sinal. Os resultados da Figura 3.1.8. correspondem ao efluxo de células carregadas com 1 µg/mL de EtBr na presença de 20 µg/mL de CPZ a 25 °C na ausência de glicose durante 60 minutos.

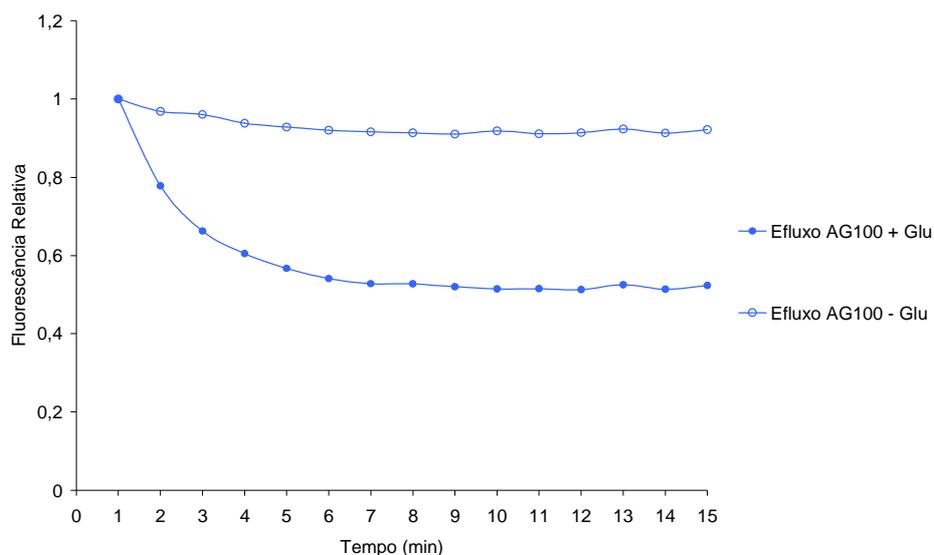


Figura 3.1.8. – Influência da glicose (0,4 %) no efluxo de EtBr a 37°C. Células previamente carregadas com 1 µg/mL de EtBr na ausência de glicose e na presença de 20 µg/mL de CPZ a 25 °C.

A restauração das condições óptimas que minimizam a acumulação de EtBr, ou seja, presença de glicose (0,4 %) a 37 °C potenciam o efluxo e este passa a ser facilmente visualizado no fluorímetro. Na presença de glicose a 37 °C o efluxo é muito mais rápido, sendo praticamente obviado na ausência da fonte de carbono (Figura 3.1.8.), o que demonstra, mais uma vez, a dependência energética destes sistemas e prova que o efluxo é um transporte activo.

Estes ensaios de carregamento das células na presença de um inibidor de BE, sendo o EtBr activamente removido das células quando estas são energizadas permite inferir, tal como havíamos pressuposto (ponto 1.6.2. da introdução) que o EtBr dentro das células se liga de uma forma transiente a outros alvos que não o ds-DNA (Caron *et al.*, 1998 e Joux e Lebaron, 2000). Ligações essas que serão muito menos fortes e menos específicas, eventualmente por ligações electrostáticas, do que a ligação por intercalação nos resíduos de guanina-citosina do ds-DNA. De facto, em células intactas o interior da membrana encontra-se carregado negativamente o que favorece a interacção electrostática entre essas cargas e as cargas positivas do flourocromo (Silva *et al.*, 2004). Adicionalmente, é hoje reconhecido que o EtBr acumula e pode alcançar e ligar-se a uma diversidade de alvos intracelulares (*e.g.*, ss-RNA, ds-RNA, ss-DNA, sequencias de oligonucleotidos, proteínas) (Vardevanyan *et al.*, 2003 e Martins *et al.*, 2006), formando diversos complexos que originam um incremento de fluorescência em relação a soluções contendo EtBr livre. Eventualmente, uma pequena parcela de EtBr pode alcançar o ds-DNA e a ele ligar-se por intercalação, sendo esta uma ligação específica (Ihmels e Otto, 2005). Uma vez ligado ao ds-DNA forma uma ligação de tal modo forte (Ihmels e Otto, 2005) que a actividade de efluxo não será suficiente para o “desligar” desta macromolécula e o remover da célula. Quando tal acontece a viabilidade celular é reduzida ou totalmente obviada dada a natureza tóxica do composto (Martins *et al.*, 2006). Nestas circunstâncias o EtBr inibe a DNA polimerase, exercendo deste modo um efeito bacteriostático (Nordmeier, 1992).

Adicionalmente, ensaios efectuados com liposomas demonstraram que a alteração da fluorescência de EtBr é independente da presença de DNA (Lorch *et al.*, 2005), o que sustenta a hipótese de que o EtBr ao penetrar nas células pode ligar-se a outros alvos que não ds-DNA. O pressuposto de que o EtBr se liga a outros alvos que não o ds-DNA vai de encontro ao modelo proposto para o funcionamento do sistema tripartido AcrAB-TolC de *E. coli* (ponto 1.3.4.1. da introdução), em que os substratos que penetram na célula podem sofrer efluxo para o meio extracelular a partir do periplasma, antes de alcançarem o citoplasma, onde eventualmente se ligariam ao ds-DNA. Deste modo, estes resultados sugerem que o EtBr se liga a diversos alvos intracelulares sendo essa ligação reversível.

Adicionando concentrações crescentes de inibidor ([CPZ] = 5 – 10 -15 µg/mL) nas condições que favorecem o efluxo (37 °C na presença de glucose) (Figura 3.1.9.), obtêm-se níveis de inibição da actividade de efluxo gradualmente maiores ocorrendo uma completa inibição da actividade de efluxo para uma concentração mínima de CPZ igual a 15 µg/mL.

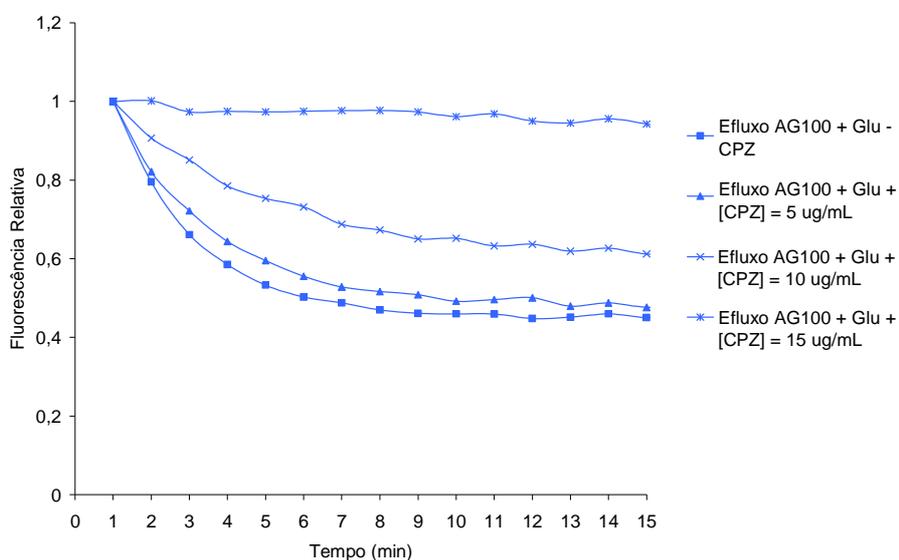


Figura 3.1.9. – Efeito de concentrações crescentes de CPZ na inibição da actividade de efluxo a 37 °C e na presença de glucose. Células previamente carregadas com 1 µg/mL de EtBr na ausência de glucose e na presença de 20 µg/mL de CPZ a 25 °C.

A eliminação total da actividade de efluxo é conseguida em condições de privação da fonte de carbono (Figura 3.1.10.), recorrendo-se a concentrações muito menores de CPZ evidenciando o efeito sinérgico da falta de glucose e presença de inibidor na retenção de EtBr. Para uma [CPZ] = 3 µg/mL consegue-se a total inibição da actividade de efluxo o que reforça, uma vez mais a dependência da fonte de carbono no efluxo activo de EtBr em *E. coli*. A retenção de EtBr nas células na presença de inibidores da actividade de efluxo demonstra, directa e inequivocamente, a presença destes sistemas de efluxo activo em *E. coli* que estão implicados na remoção intracelular de EtBr.

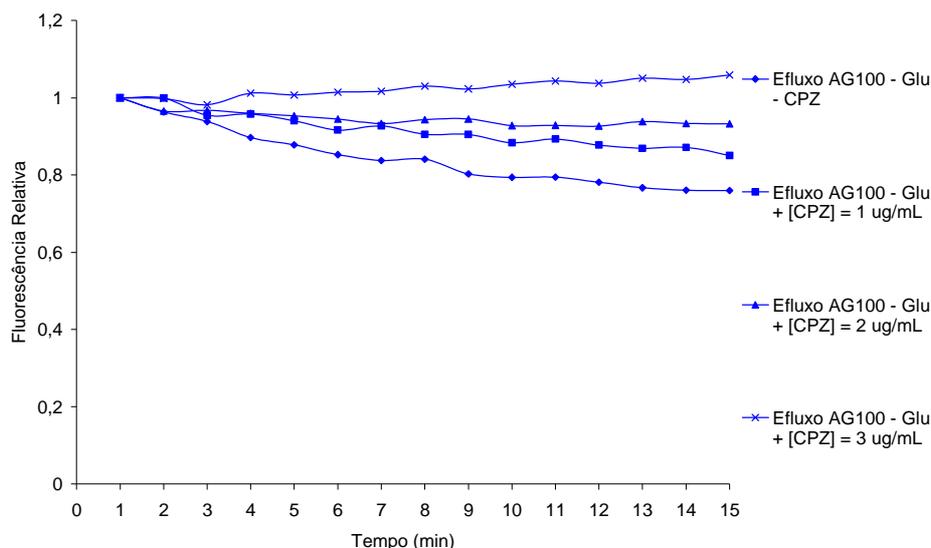


Figura 3.1.10. - Efeito de concentrações crescentes de CPZ na inibição da actividade de efluxo a 37°C e na ausência de glucose. Células previamente carregadas com 1 µg/mL de EtBr na ausência de glucose e na presença de 20 µg/mL de CPZ a 25 °C.

A abordagem metodológica empregue (protocolo efluxo) permite verificar o efeito de diversos compostos na inibição da actividade de efluxo, constituindo uma excelente metodologia de escrutínio de novos inibidores que permite seleccionar a concentração mínima que provoca total retenção de EtBr nas células.

Em seguida testou-se o efeito da inibição “cruzada”. Para as mesmas condições de acumulação (acumulação de 1 µg/mL sem glucose na presença de 20 µg/mL CPZ a 25 °C) efectuou-se o protocolo de efluxo na presença de outros inibidores, tioridazina (TZ) e *L-Phe-L-Arg-β-naphthylamide* (PAβN). A tioridazina pertence à família das fenotiazinas e tal como CPZ tem características e efeitos análogos. O PAβN é um inibidor das BE que consiste num dipéptido associado a uma quinolona, na extremidade carboxil e uma aminoprolina na extremidade amina. Este mostrou exibir um efeito nos mecanismos de efluxo de várias bactérias Gram-negativas reduzindo a resistência a levofloxacina em estirpes de *P. aeruginosa* e *E. coli* que super expressam o sistema MexAB-OprM e AcrAB-TolC, respectivamente (Marquez *et al.*, 2005 e Pagès *et al.*, 2005). Foi descrito que este composto poderá funcionar como um inibidor específico deste sistema (Viveiros *et al.*, 2005). É ainda responsável pela melhoria da acção antimicrobiana dos macrólidos azitromicina, claritromicina e eritromicina numa variedade de bactérias Gram-negativas, como sejam, *Salmonella Typhimurium*, *Haemophilus influenza* e *Escherichia coli*. Todas estas bactérias contendo o sistema AcrAB. As concentrações usadas são inferiores aos valores de MIC previamente determinados ($MIC_{AG100}^{TZ} = 100 \mu\text{g} / \text{mL}$; $MIC_{AG100}^{PAN} > 200 \mu\text{g} / \text{mL}$) (Viveiros *et al.*, 2005).

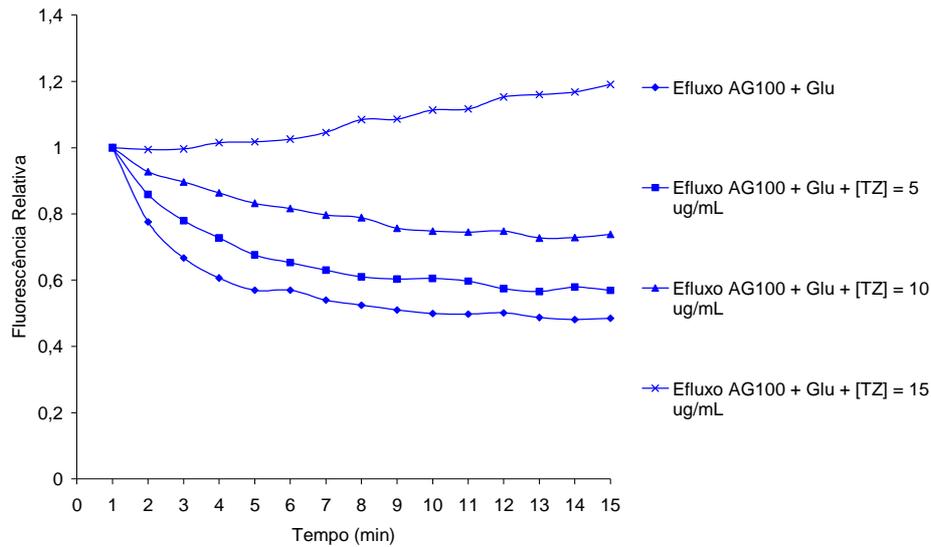


Figura 3.1.11. – Efluxo (a 37°C e na presença de 0,4% de glucose) de células de *E. coli* AG100 carregadas com 1 µg/mL de EtBr na presença de 20 µg/mL de CPZ a 25 °C sem glucose. Efeito inibitório de concentrações crescentes de tioridazina (TZ).

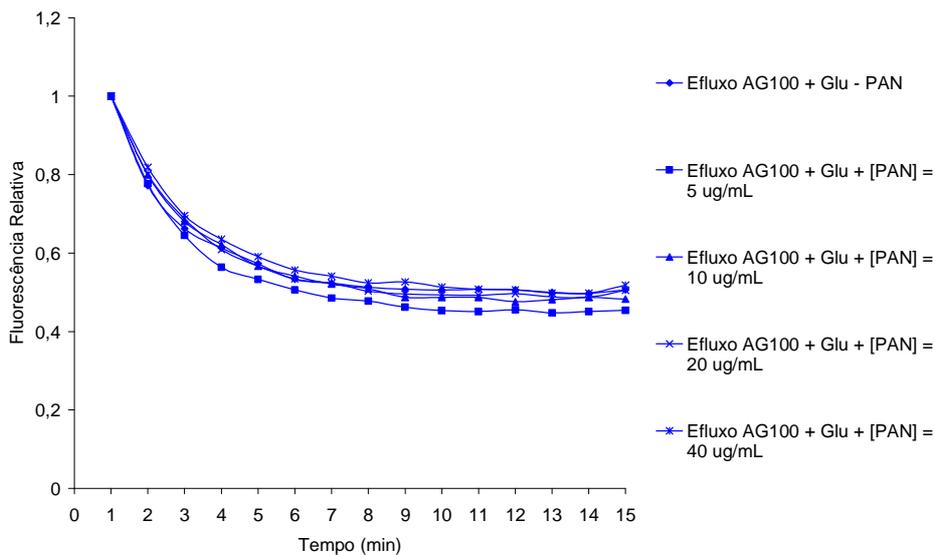


Figura 3.1.12. - Efluxo (a 37°C e na presença de 0,4% de glucose) de células de *E. coli* AG100 carregadas com 1 µg/mL de EtBr na presença de 20 µg/mL de CPZ a 25 °C sem glucose. Efeito inibitório de concentrações crescentes de *L-Phe-L-Arg-β-naphthylamide* (PAN).

Na presença de glucose o efeito da adição da TZ demonstrou para a mesma concentração de 15 µg/mL um efeito inibitório ligeiramente superior a CPZ (Figura 3.1.11.). Já o PAN não apresenta qualquer efeito de inibição para as concentrações utilizadas (Figura 3.1.12.). De facto julgava-se que o PβAN tinha um efeito inibitório específico e directo no sistema AcrAB (Viveiros *et al.*, 2005). No entanto, o resultado anterior, bem como a abordagem efectuada no trabalho precedente (Paixão, 2006) demonstraram que tal poderá não ser verdade, pelo menos no período de tempo em que se

efectua os ensaios de acumulação e efluxo. Esta é a demonstração que a tecnologia e a metodologia utilizadas neste trabalho irão ser de grande importância para a caracterização do modo de acção dos inibidores de bombas de efluxo em bactérias. Embora descrito na literatura como um inibidor directo e específico do sistema AcrAB-TolC ele não afecta directamente o efluxo em *E. coli*. Os seus efeitos inibitórios terão de ser explicados por acção inibitória de longo prazo, possivelmente na regulação de expressão do sistema, problema que será explorado em futuros trabalhos.

Estes resultados, obtidos segundo o protocolo de efluxo (protocolo 2.5.2.) são consistentes e estão em sintonia com os resultados obtidos numa abordagem indirecta de estudo da actividade de efluxo, ou seja, observando o efeito dos inibidores por acumulação de EtBr (protocolo 2.5.1.) nas condições que favorecem o efluxo (37 °C e presença de glucose (0,4%)) (Paixão, 2006). Estes resultados evidenciam a validade de ambas as abordagens metodológicas (protocolo de efluxo vs protocolo de acumulação).

Apesar de se ter demonstrado a inibição do efluxo por adição de concentrações crescentes de inibidores para eliminar a dúvida se o decréscimo de fluorescência se deverá em parte ao *photobleaching* de EtBr ou ao *leaking out* do fluorocromo da célula tecem-se as seguintes considerações e abordagens experimentais com vista a avaliar estas hipóteses:

a) os resultados da Figura 3.1.1. evidenciam, tal como referido, a fotoestabilidade do EtBr, o que permite a análise fluorimétrica sem perda de sinal durante o período do ensaio. No caso do efluxo este período é extremamente curto (15 min).

b) demonstra-se que não ocorre *leaking out* ou que este pode ser negligenciável face à actividade de efluxo, efectuando-se um ensaio onde se mata as células de *E. coli* AG100 por exposição a 20 mM de KCN, durante cerca de duas horas, devidamente certificado por contagem de CFUs, procedendo-se depois de acordo com o protocolo de efluxo (Figura 3.1.13.). O KCN é um inibidor das citocromo oxidases do Complexo III na cadeia respiratória transportadora de electrões de *E. coli* impedindo a transferência destes para o oxigénio e conseqüente síntese de ATP por fosforilação oxidativa ao nível da cadeia respiratória (Kitajima-Ihara e Yagi, 1998). Trata-se um potente inibidor e um composto extremamente tóxico, pela capacidade em “atacar” o transporte electrónico (Miles, 2003). A adição de KCN induz a entrada de EtBr como reflexo da inibição das BE dependentes da hidrólise de ATP, como demonstrado no trabalho anterior (Paixão, 2006), por actuação ao nível da cadeia transportadora de electrões.

O resultado (Figura 3.1.13.) evidencia que o EtBr que entra nas células por via da morte das mesmas, não sai mesmo quando são restabelecidas as condições óptimas de efluxo (37°C na presença de glucose) após lavagem. O controlo relativo ao efluxo situa-se a um nível de fluorescência praticamente idêntico às células carregadas com 1 µg/mL de EtBr na presença de 20 mM de KCN.

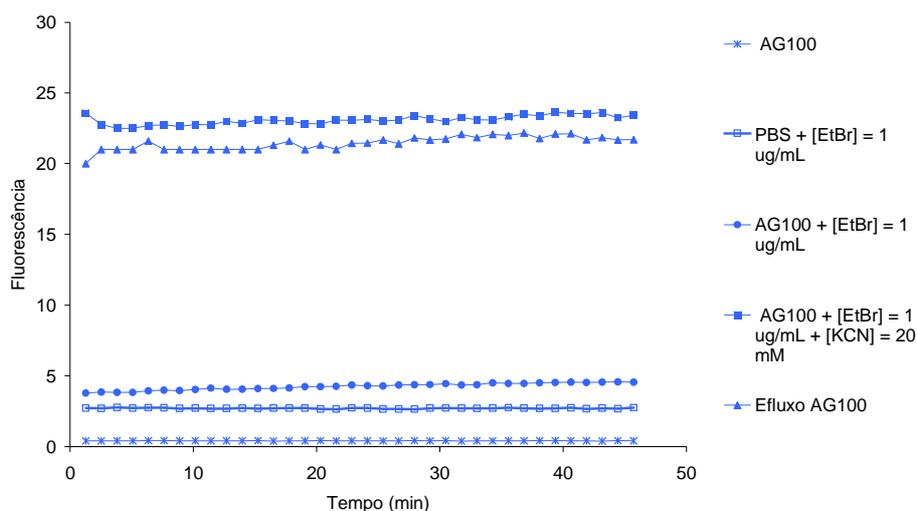


Figura 3.1.13. – Efluxo de EtBr na presença de glucose a 37 °C de células de *E. coli* AG100 previamente carregadas (mortas) com 1 µg/mL de EtBr na presença de 20 mM de KCN.

Deste modo, demonstra-se que não há *leaking out* de EtBr e que o decréscimo de fluorescência é, de facto, devido à actividade de efluxo activo, como previamente demonstrado.

Demonstração do Efluxo Activo de EtBr Mediado por Bombas Dependentes da Força Protomotriz

Como corolário da hipótese anteriormente colocada de que esta tecnologia e metodologia serão úteis na demonstração das propriedades e mecanismos do efluxo em bactérias procurou-se aplicar o trabalho anteriormente descrito à demonstração experimental do dogma de que o sistema AcrAB-TolC depende da força protomotriz. Este dogma tem-se baseado nos efeitos a longo prazo dos desacopladores na resistência aos antibióticos e na utilização de protocolos de acumulação, tal como efectuado no trabalho anterior (Paixão, 2006). Neste trabalho procurou-se utilizar as vantagens da visualização directa do efluxo.

O grau de actividade deste sistema foi testado recorrendo à estirpe padrão, AG100, que possui o sistema AcrAB-TolC activo e funcional, à estirpe AG100A que possui este sistema inactivo por inserção do gene *Kan* do transposição Tn903 (Okuso *et al.*, 1996) e à estirpe de *E. coli* AG100 adaptada a 12 µg/mL de tetraciclina (AG100_{TET}) que apresenta a super expressão deste sistema de efluxo (Viveiros *et al.*, 2005).

Os resultados (Figura 3.1.14.) correspondem ao efluxo de células carregadas na presença de 5 µg/mL de CCCP valor inferior à MIC para as três estirpes (MIC_{AG100}^{CCCP} = 10 µg/mL; MIC_{AG100A}^{CCCP} = 10 µg/mL e MIC_{AG100TET}^{CCCP} = 20 µg/mL (Viveiros *et al.*, 2005)).

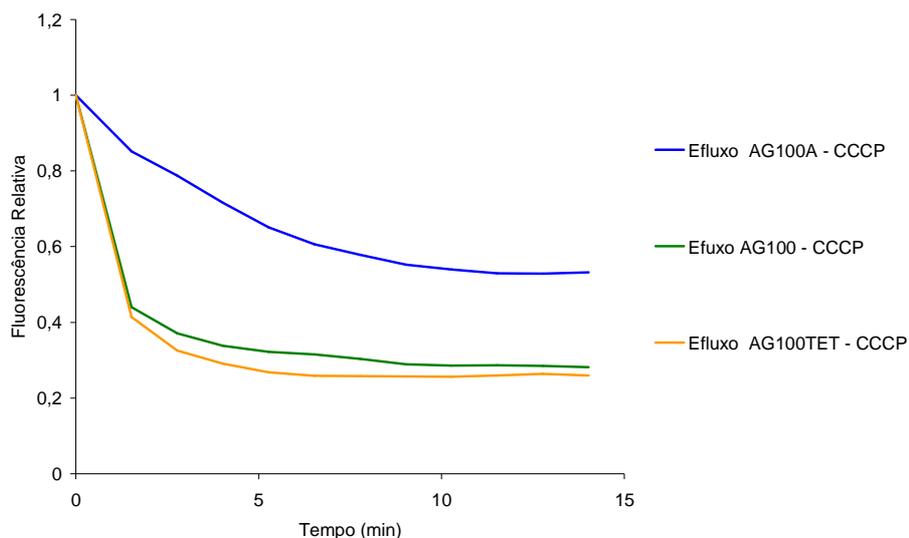


Figura 3.1.14. – Efluxo de EtBr em AG100, AG100A e AG100_{TET} em células previamente carregadas com 1 µg/mL de EtBr na presença de 5 µg/mL CCCP.

Os resultados (Figura 3.1.14.) evidenciam a maior retenção de EtBr na estirpe AG100A que possui o sistema AcrAB inactivo. Segue-se a estirpe padrão que o extrui activamente através da força protomotriz. A menor retenção é feita pela estirpe AG100_{TET} uma vez que apresenta a super expressão deste sistema removendo o EtBr de um modo mais eficaz do interior das células, atingindo-se um patamar de fluorescência relativa a um nível inferior comparativamente às estirpes anteriores. Este comportamento demonstra a implicação das BE na remoção do EtBr, em particular do sistema AcrAB, uma vez que as três estirpes diferem entre si pelo grau de actividade deste sistema.

A adição de 5 µg/mL de CCCP (concentração idêntica à que produziu acumulação) no final da lavagem (Figura 3.1.15.) origina uma maior retenção de EtBr nas três estirpes indicando que este inibe a actividade de efluxo e que esta actividade é em parte devida à força protomotriz, o que está de acordo com os trabalhos anteriores. O estudo da componente energética associada ao gradiente protónico tem sido efectuado por recurso a este composto (Ghoul, *et al.*, 1989). O CCCP é um agente desacoplador de electrões, que anula a ligação obrigatória entre a cadeia respiratória e o potencial protónico nas células procariotas, pelo que a energia é libertada preferencialmente sob a forma de calor em vez de ATP (Low *et al.*, 1999). É um ácido fraco lipossolúvel e, como tal, dissolve-se na bicamada fosfolipídica da parede *E. coli* anulando o potencial de membrana por dissipação do gradiente de protões. Ele colapsa o gradiente de pH ligando um protão ao lado ácido da membrana, difundindo-se através desta e libertando um protão no lado alcalino da membrana. O CCCP pode transportar protões para o interior da célula sem a participação da ATP sintase. Assim, a força protomotriz (PMF) é anulada e o ATP não pode ser sintetizado. A desenergização de *E. coli* resulta do aumento da permeabilidade da membrana aos protões (Riondet *et al.*, 1999), enquanto a respiração celular continua e pode até ser estimulada (Ghoul *et al.*, 1989; Low *et al.*, 1999 e Riondet *et al.*, 1999).

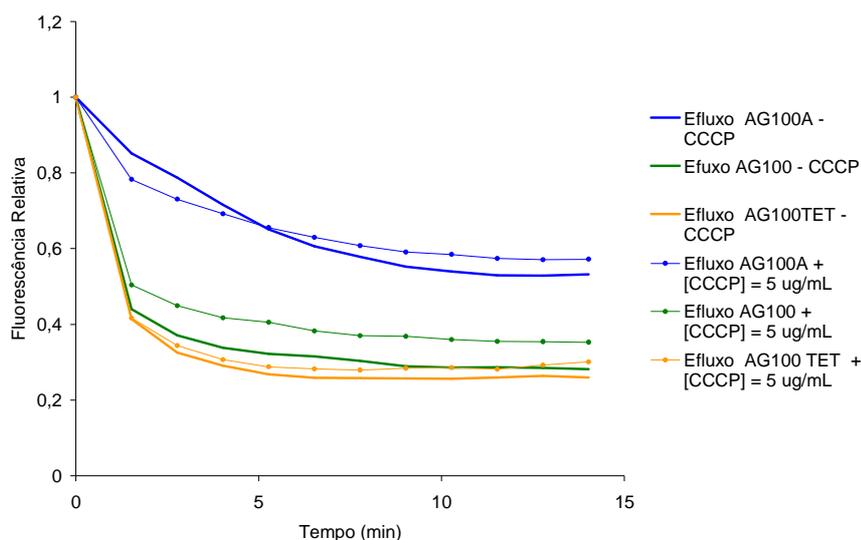


Figura 3.1.15. – Inibição do efluxo de EtBr em AG100, AG100A e AG100_{TET} na presença de 5 µg/mL de CCCP em células previamente carregadas com 1 µg/mL de EtBr na presença de 5 µg/mL CCCP.

No entanto o efeito deste inibidor da actividade de efluxo é inferior ao observado para CPZ na concentração próxima que produz acumulação, ou seja, não ocorre a completa retenção de EtBr na célula o que sugere que o efluxo de EtBr será igualmente mediado por outras BE, porventura dependentes da hidrólise de ATP, uma vez que como vimos podemos desprezar o *leaking out* de fluorocromo ou, por outro lado, este será um inibidor menos potente que CPZ tendo que se otimizar a concentração mínima que produz total retenção sem, no entanto, causar morte celular.

Assim, foi possível demonstrar por visualização directa que o efluxo de EtBr é um processo de transporte activo mediado por BE em *E. coli*, em particular pelo sistema AcrAB-TolC, e que este mecanismo de resistência pode ser inibido.

Demonstrada a existência do mecanismo biológico de transporte e sendo este apenas uma das componentes da resistência intrínseca aos antibióticos foi colocado o desafio seguinte de se proceder à modelação do processo de transporte EtBr em *E. coli*. Para tal tem de se entrar em linha de conta com todas as variáveis que afectam o transporte deste substrato em *E. coli*, a permeabilidade e o efluxo, pelo que o protocolo de eleição para o efeito será o protocolo de acumulação.

3.2. Modelação do Transporte de EtBr

Nesta segunda fase do trabalho pretendeu-se modelar o transporte de EtBr através de *E. coli* tendo-se para tal definido um protocolo de monitorização do seu transporte por fluorimetria em termociclador de tempo real (Rotor-Gene 3000™) (protocolo 2.5.3). O protocolo foi definido tendo como estirpe padrão *E. coli* AG100 sendo, por conseguinte, o procedimento integral descrito em maior detalhe para esta estirpe. O EtBr tem sido muito utilizado como sonda para estudar a permeabilidade e mecanismos de efluxo em bactérias sendo particularmente útil uma vez que apresenta níveis menos intensos de fluorescência em ambiente aquoso, fora das células, ocorrendo um incremento de sinal quando se encontra no meio intracelular em particular em ambientes hidrofóbicos e apolares. É aceite que o EtBr entra na célula por difusão passiva a favor do gradiente de concentração sendo removido do meio intracelular pela actividade de efluxo sendo este um transporte activo, tal como demonstrado na primeira parte deste trabalho. Uma vez no meio intracelular pode ligar-se a uma diversidade de alvos e intercalar-se no ds-DNA, atingindo o ds-DNA cromossómico só em elevadas concentrações intracelulares e que afectam a viabilidade celular. Assim, a intensidade da fluorescência das células é uma medida do conteúdo intracelular de EtBr que resulta do equilíbrio dinâmico entre estes dois processos de transporte estando dependente de uma multiplicidade de factores. A primeira condição experimental foi a utilização de concentrações de EtBr que garantiam no final dos ensaios 100% de viabilidade.

A quantificação do efluxo passou pela definição de parâmetros correspondentes a taxas de influxo e de efluxo de EtBr expressas matematicamente no modelo mecanicista desenvolvido e que a seguir se descreve.

Fazendo um balanço à taxa de variação da concentração de EtBr intracelular e assumindo uma cinética de primeira ordem, tem-se que:

$$\frac{d[\text{EtBr}]_{\text{int}}}{dt} = k^+[\text{EtBr}]_{\text{ext}} - k^-[\text{EtBr}]_{\text{int}} \quad (3.2.1.)$$

onde, $[\text{EtBr}]_{\text{int}}$ corresponde à concentração intracelular de EtBr na célula ($\mu\text{g}/\text{mL}$); $[\text{EtBr}]_{\text{ext}}$ é a concentração de EtBr no meio extracelular ($\mu\text{g}/\text{mL}$); k^+ corresponde à taxa de entrada de EtBr na célula (min^{-1}) e k^- corresponde à taxa de saída de EtBr do meio intracelular (min^{-1}). Utilizando a lei da conservação para o $[\text{EtBr}]_{\text{Tot}}$:

$$[\text{EtBr}]_{\text{Tot}} = [\text{EtBr}]_{\text{ext}} + [\text{EtBr}]_{\text{int}} \quad (3.2.2.)$$

Substituindo a equação (3.2.2.) em (3.2.1.) obtém-se:

$$\frac{d[\text{EtBr}]_{\text{int}}}{dt} = k^+([\text{EtBr}]_{\text{Tot}} - [\text{EtBr}]_{\text{int}}) - k^-[\text{EtBr}]_{\text{int}} \quad (3.2.3.)$$

ou seja,

$$\frac{d[\text{EtBr}]_{\text{int}}}{dt} = k^+ [\text{EtBr}]_{\text{Tot}} - (k^+ + k^-) [\text{EtBr}]_{\text{int}} \quad (3.2.4.)$$

De modo a resolver a equação anterior de forma explícita podemos usar a seguinte mudança de variável:

$$x = [\text{EtBr}]_{\text{int}} - \frac{k^+}{k^+ + k^-} [\text{EtBr}]_{\text{Tot}} \quad (3.2.5.)$$

Fazendo a substituição da equação (3.2.5.) em (3.2.4.) obtém-se:

$$\frac{dx}{dt} = k^+ [\text{EtBr}]_{\text{Tot}} - (k^+ + k^-) \left(x + \frac{k^+}{k^+ + k^-} [\text{EtBr}]_{\text{Tot}} \right) \quad (3.2.6.)$$

isto é,

$$\frac{dx}{dt} = -(k^+ + k^-) x \quad (3.2.7.)$$

A solução genérica da equação anterior é:

$$x(t) = x(t=0) e^{-(k^+ + k^-)t} \quad (3.2.8.)$$

Desfazendo a mudança de variáveis, por substituição de (3.2.5.) em (3.2.8.), obtém-se a equação final para a variação da concentração de EtBr no interior da célula:

$$\boxed{[\text{EtBr}]_{\text{int}}(t) = \frac{k^+}{k^+ + k^-} [\text{EtBr}]_{\text{Tot}} + \left([\text{EtBr}]_{\text{int}}(t=0) - \frac{k^+}{k^+ + k^-} [\text{EtBr}]_{\text{Tot}} \right) e^{-(k^+ + k^-)t}} \quad (3.2.9.)$$

A equação do modelo desenvolvido (3.2.9.) depende de três parâmetros (k^+ , k^- e $[\text{EtBr}]_{\text{int}}(t=0)$). Apesar da concentração de EtBr intracelular no instante inicial ser obviamente nula, deixou-se este parâmetro livre de forma a controlar a acumulação nos instantes que medeiam o instante entre a introdução do EtBr no meio e o início das leituras de fluorescência no Rotor-Gene 3000™.

Este modelo corresponde a uma abordagem lata do processo de transporte não restringindo à partida o tipo de transporte associado à entrada e saída de EtBr das células. Esta aproximação ser-nos-á útil

para identificar os fenómenos de transporte associados permitindo comprovar ou refutar as permissas previamente postuladas.

Para determinar os parâmetros devolvidos pelo modelo (k^+, k^-) é necessário estabelecer uma estratégia que permita determinar a concentração de EtBr no interior das células ($[EtBr]_{int}$), após o período de exposição ao fluorocromo e análise fluorimétrica no Rotor-Gene 3000TM, de modo a poder ajustar o modelo dado pela equação (3.2.9.) (dados de $[EtBr]_{int}$ vs tempo) aos dados experimentais de acumulação de EtBr para as diferentes estirpes de *E. coli* (dados de fluorescência vs tempo). Esta estratégia está sumariada no ponto 2.6. dos materiais e métodos e será descrita em pormenor ao longo desta secção para *E. coli* AG100. Ao nível experimental o protocolo final encontra-se descrito (protocolo 2.5.3). Este resultou de um trabalho moroso de tentativa e erro, que será discutido mais adiante.

A aplicação do modelo e a inerente abordagem de doseamento do EtBr intracelular implicaram o estudo da dependência da cinética de transporte com a concentração de substrato (EtBr). A monitorização deste transporte foi efectuada como descrito no protocolo 2.5.3., garantindo as condições necessárias para a existência de actividade de efluxo, ou seja, 37°C e na presença de glucose, uma vez que este é um transporte activo. Utilizou-se como comprimento de onda de excitação 530 nm e de emissão 585 nm.

As experiências foram efectuadas em triplicado para cada estirpe testada e os valores dos parâmetros apresentados correspondem às médias obtidas para os três ensaios e respectivo desvio padrão. Os gráficos das cinéticas correspondem à média dos três ensaios efectuados para cada estirpe. Os restantes gráficos são apresentados com os resultados dos três ensaios e o respectivo valor médio.

Os resultados da cinética de transporte para *E. coli* AG100 na presença de diferentes concentrações de EtBr estão presentes na Figura 3.2.1..

No final do ensaio confirmava-se a viabilidade celular de 100 % para a gama de concentrações de EtBr utilizadas. Estes resultados estão de acordo com o esperado uma vez que se utilizaram concentrações muito inferiores ao valor da MIC para esta estirpe ($MIC_{AG100}^{EtBr} = 150 \mu g/mL$) (Viveiros *et al.*, 2005), e havia-se previamente garantido que as condições experimentais não levavam à letalidade celular (Paixão, 2006).

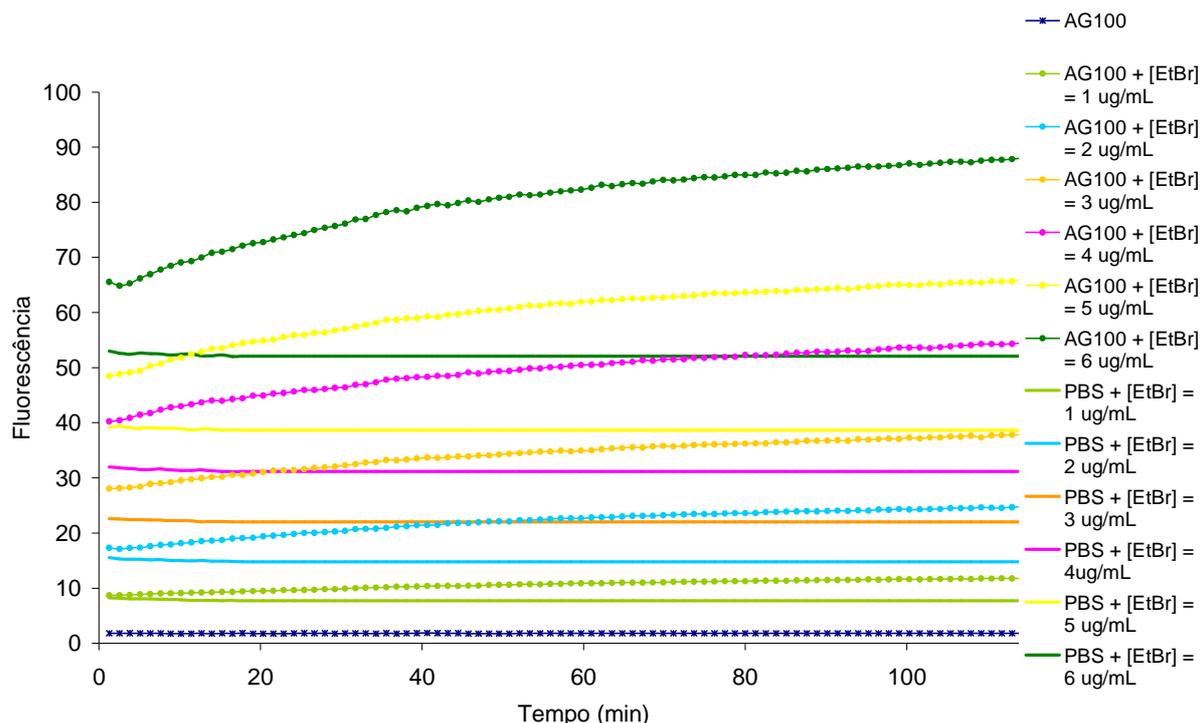


Figura 3.2.1. – Monitorização do transporte de diferentes concentrações de EtBr em *E. coli* AG100, a 37 °C e na presença de glucose (0,4 %), utilizando como comprimento de onda de excitação 530 nm e de emissão 585 nm. Fluorescência associada ao EtBr livre em solução (controles PBS+EtBr).

Os resultados demonstram a dependência da cinética de acumulação de EtBr com a concentração de substrato. Quanto maior a concentração de EtBr no meio extracelular maior a acumulação de fluorocromo nas células. A acumulação de EtBr é mais rápida nos primeiros 40 minutos, quando a diferença do gradiente de concentração entre o exterior e interior do meio intracelular é maior, observando-se em seguida uma desaceleração do processo de influxo. Este resultado sugere que a cinética de influxo depende da concentração de substrato no meio, como evidenciado pela Figura 3.2.2., onde se representa o declive das curvas da cinética de transporte para diferentes concentrações de EtBr em função da concentração exterior de fluorocromo, nos primeiros 40 minutos.

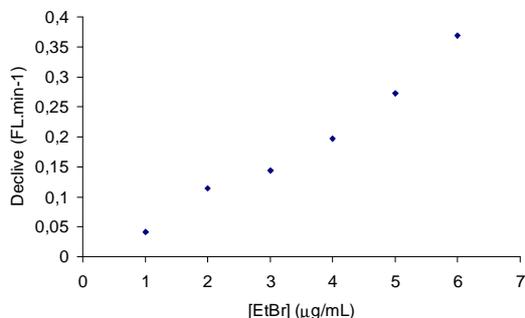


Figura 3.2.2. – Dependência da cinética transporte de EtBr com a concentração exterior de substrato nos primeiros 40 minutos.

No entanto, embora se observe uma desaceleração no processo de influxo após cerca de 40 minutos de monitorização da fluorescência, os resultados apontam para um influxo permanente de fluorocromo na célula. Após cerca duas horas de ensaio não se verificou o estabelecimento de um estado estacionário bem definido sendo esta tendência tanto mais notória quanto maior a concentração de EtBr no meio. Uma vez que as células se encontram viáveis este resultado não é o reflexo da entrada de EtBr na célula por um mecanismo mais rápido como resultado das células mortas. Por outro lado, este resultado poderia indicar a ocorrência de divisão celular e a subsequente ligação do EtBr a um maior número de alvos celulares (e.g. proteínas) das células “filhas”. No entanto, as condições experimentais (meio mínimo, PBS) não permitem uma divisão celular eficaz devendo esta (caso ocorra) estar a um nível muito reduzido e não havendo aumento significativo do número de efectivos da população, como previamente determinado (Paixão, 2006). Deste modo, apenas se infere que o tempo de duas horas não foi suficiente para se atingir o estado estacionário devendo este ser alcançado a um tempo superior.

Como vimos anteriormente existe uma interferência do sinal de fluorescência que provém da fluorescência intrínseca do EtBr em solução (PBS) (Figuras 3.1.1. e 3.1.2.) e que é detectada para os comprimentos de onda utilizados ($c.d.o._{exc} = 530 \text{ nm}$ e $c.d.o._{emi} = 585 \text{ nm}$).

Como referido na primeira parte, estes resultados evidenciaram a elevada sensibilidade do aparelho que permite destriçar variações de $0,125 \mu\text{g/mL}$ numa gama entre $0,125$ e $9 \mu\text{g/mL}$ de EtBr e revelaram a fotoestabilidade do EtBr o que permite a análise fluorimétrica, sem perda da sua actividade, por um período de tempo relativamente alargado. O EtBr em solução emite sinais de fluorescência menos intensos quando comparado com o EtBr na presença de células, para uma concentração idêntica de fluorocromo (Figura 3.1.1. ou 3.2.1.). Nestas condições ocorre um incremento do sinal que resulta da acumulação de EtBr no meio intracelular e conseqüente ligação aos componentes intracelulares, nomeadamente ao ds-DNA. São estas alterações na intensidade da fluorescência que permitem a monitorização da cinética de acumulação de EtBr em células intactas.

Esta fluorescência associada ao EtBr livre em solução (Figura 3.2.3.) corresponde a uma concentração de EtBr que é a única que conseguimos quantificar directamente ($[\text{EtBr}]_{inicial} = [\text{EtBr}]_{ini}$), uma vez que quando o EtBr entra na célula e se acumula ligando-se a diversos alvos intracelulares ocorre uma amplificação de sinal de fluorescência que não nos permite estabelecer uma correspondência directa entre esta fluorescência e a concentração de EtBr. Deste modo, com os dados de $FL(\text{EtBr livre em solução}) = FL(\text{PBS} + \text{EtBr}) = FL_0 = FL_{inicial}$ para diferentes concentrações de fluorocromo é possível traçar uma curva de calibração (FL_0 vs $[\text{EtBr}]_{ini}$) que permite determinar a concentração de EtBr livre em solução.

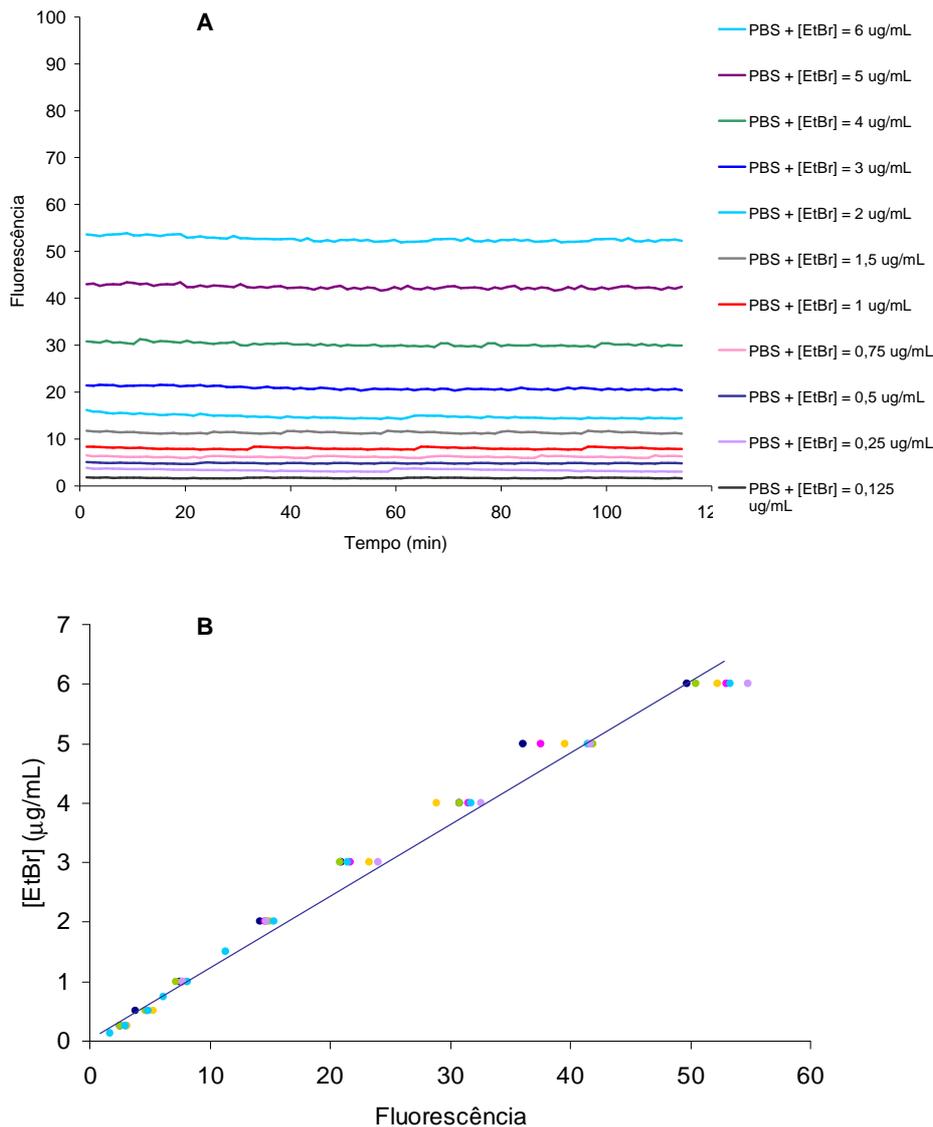


Figura 3.2.3. – A. Fluorescência de EtBr livre em solução (PBS). **B.** Quantificação de EtBr livre em solução.

O ajuste anterior permitiu encontrar uma relação que relaciona a fluorescência (FL_0) com o EtBr livre em solução e que é igual ao EtBr inicial $[EtBr]_{ini}$.

$$[EtBr]_{ini} = 0,1201 \times FL_0 + 0,0373 \quad (3.2.10.)$$

$R = 0,99$

No entanto, para uma correcta análise dos resultados este *background* de fluorescência tem de ser descontado à fluorescência do EtBr na presença das células. Só assim se reflecte a intensidade de fluorescência como resultado do influxo de EtBr no meio intracelular.

À medida que o EtBr entra na célula o *background* associado ao EtBr no meio extracelular diminui e deverá diminuir com uma tendência semelhante (exponencial) à entrada de fluorocromo na célula, mas de um modo inverso. No entanto, é impossível tecnologicamente monitorizar em simultâneo

estes dois fenómenos utilizando o Rotor-Gene 3000™. Apesar do EtBr fluorescer a comprimentos de onda distintos quando se encontra livre em solução (máximo de absorvância a 480 nm (Chaudhuri *et al.*, 1975 e Doglia *et al.*, 1983) e no interior das células, eventualmente intercalado no ds-DNA o Rotor-Gene 3000™ não permite a monitorização da fluorescência nesse comprimento de onda, restringindo a análise fluorimétrica para comprimentos de onda superiores no visível, quando o EtBr se encontra no interior das células e eventualmente intercalado no ds-DNA. Sendo assim, como primeira aproximação esta interferência foi descontada de um modo directo por simples subtração do valor de fluorescência da solução de EtBr à fluorescência das curvas de acumulação de EtBr nas células, para a concentração de fluorocromo correspondente. Esta aproximação é justificada pelo facto de o EtBr fluorescer muito mais no meio intracelular do que em solução. De facto, ao medirmos a fluorescência após o ensaio ou seja, do filtrado final (protocolo 2.5.3.), e compararmos a diferença entre esta fluorescência e a inicial (EtBr em solução) com o diferencial entre a fluorescência inicial e após as células terem acumulado EtBr, verificamos que o primeiro diferencial é muito pequeno quando comparado com a diferença de fluorescência entre o EtBr inicial e a fluorescência final das células. Logo, podemos considerar que esta fluorescência é constante, sendo desprezável a forma como decai ao longo do ensaio. Validando assim, a aproximação efectuada. A Figura 3.2.4. ilustra o supra referido e corresponde a uma média dos três ensaios efectuados para AG100.

Adicionalmente, testou-se descontar como *background* uma dinâmica de fluorescência do meio linear, correspondente a uma recta tendo como pontos extremos a fluorescência inicial (EtBr em solução) e como fluorescência final a fluorescência do filtrado real. Comparando esta abordagem, mais trabalhosa, com a anterior, os resultados obtidos eram semelhantes em termos de concentração intracelular de EtBr, o que tornou ainda mais plausível a primeira abordagem/aproximação efectuada.

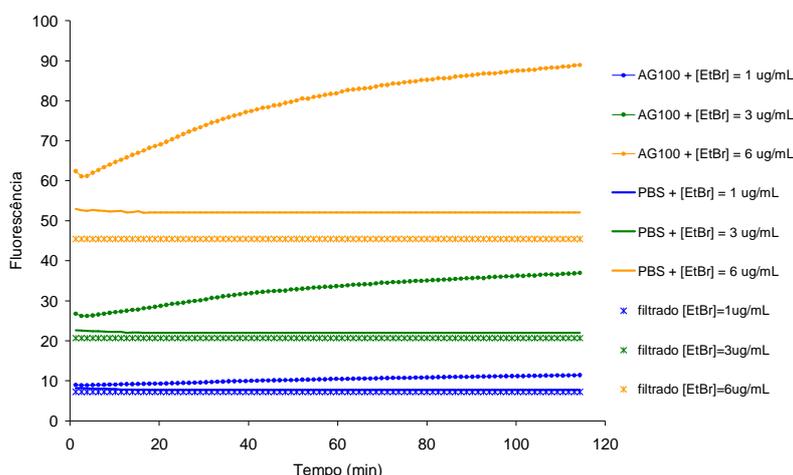


Figura 3.2.4. – Comparação de intensidade de fluorescência de EtBr (1 - 3 - 6 µg/mL) na presença de células, livre em solução antes e depois de as células terem acumulado EtBr.

Deste modo, procedendo de acordo com o descrito para descontar a interferência da fluorescência do EtBr livre em solução aos dados de fluorescência de EtBr nas células obtém-se os resultados expressos na Figura 3.2.5..

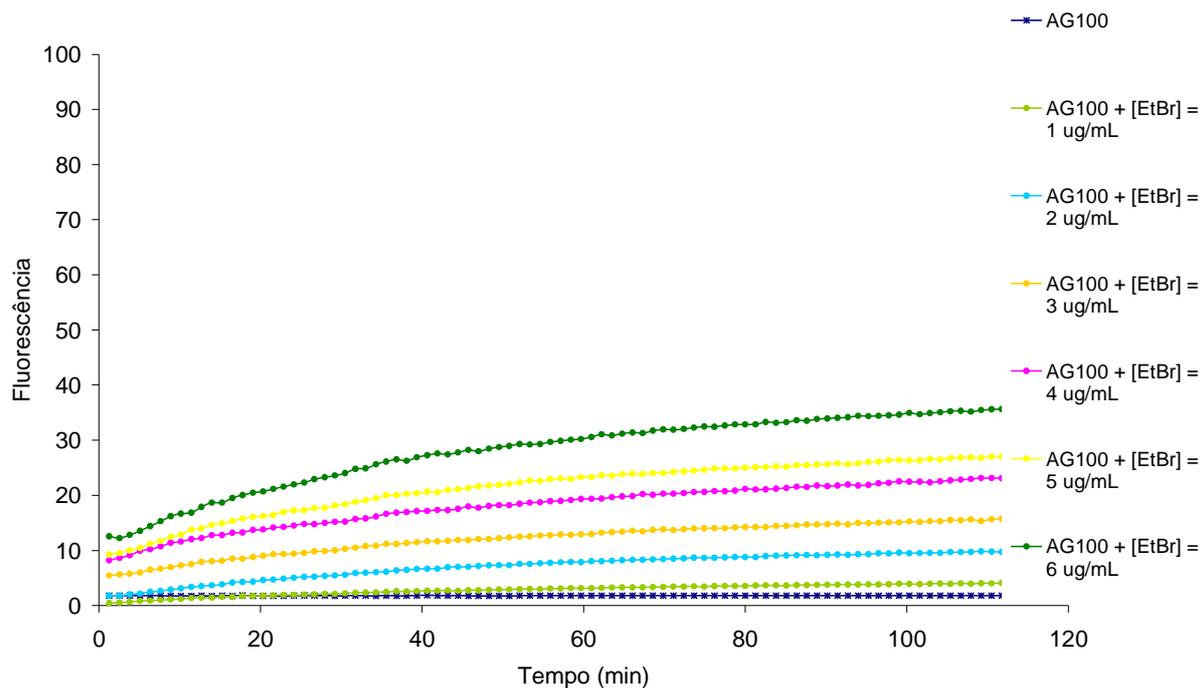


Figura 3.2.5. – Intensidade de fluorescência do EtBr no meio intracelular, em *E. coli* AG100.

De acordo com o protocolo desenvolvido (protocolo 2.5.3) e para garantir a remoção de todas as células, de modo a não haver interferências no sinal de fluorescência devido à deficiente centrifugação e ligação do fluorocromo presente no sobrenadante a células e detritos celulares em suspensão, de onde resulta (como vimos experimentalmente) um incremento do sinal de fluorescência, foi necessário introduzir um passo de filtração do sobrenadante resultante da centrifugação.

De facto, o protocolo inicial para determinação da concentração de EtBr intracelular baseava-se apenas na centrifugação (3 min a 13000 rpm) das suspensões celulares após acumulação de EtBr. No entanto, este processo revelou-se insuficiente para a deposição total das células de onde resultava um incremento significativo do sinal de fluorescência na leitura do sobrenadante. Este incremento revelou-se de tal modo elevado que a diferença entre a fluorescência inicial, associada ao EtBr livre em solução, e a fluorescência do sobrenadante dava valores negativos correspondentes à fluorescência intracelular, ou seja, correspondentes a uma concentração de EtBr nas células, o que não tinha qualquer significado. Assim, tentou-se otimizar esta metodologia através da manipulação das condições de centrifugação (tempo e rotações) de modo a reduzir e tornar positivo este diferencial e tendo em atenção a viabilidade celular. No entanto, a centrifugação, independentemente das condições usadas, revelou-se insuficiente para a deposição total das células.

Tentou-se em seguida recorrer ao espectrofotómetro UV/VIS para monitorizar a fluorescência final das células após acumulação de EtBr tendo como comprimento de onda máximo de absorção 480 nm, ou seja, correspondentes ao EtBr sozinho, eliminando assim interferências relativas à ligação deste a componentes celulares. Esta abordagem era, à partida, interessante uma vez que permitiria distinguir claramente o EtBr ligado ao DNA e a outros componentes celulares e EtBr livre utilizando diferentes

comprimentos de onda e duas tecnologias distintas eliminando a necessidade de centrifugar. No entanto, a espectroscopia UV/VIS revelou-se insuficiente para destringir diferenças de concentração tão pequenas (1 µg/mL) em soluções de EtBr quanto aquelas que se podia distinguir por fluorimetria utilizando o Rotor-Gene 3000™, tendo sido rejeitada evidenciando a “potência” da fluorimetria que tem um poder de resolução superior permitindo destringir variações de concentração muito inferiores às detectadas por espectroscopia de UV/VIS. Esta abordagem não pode ser feita apenas no Rotor-Gene 3000™ uma vez que este modelo só opera na zona do visível, para comprimentos de onda superiores.

Deste modo, optou-se por filtrar o sobrenadante após a deposição da maioria das células por centrifugação (10 min a 13000 rpm). É de referir que não foi possível testar diferentes tipos de filtro dada a limitação temporal deste estágio pelo que se utilizaram os disponíveis, ou seja, os filtros PVDF (Fluoreto de Polivinilideno) Durapore, Millex® -GV₁₃, de 0,22 µm de diâmetro de poro e 13 mm de diâmetro da Millipore Corporation (Bedford, USA), por terem um diâmetro de poro suficientemente reduzido para reterem as células e permitirem a permeação de algum EtBr.

No entanto, a percentagem de retenção de EtBr no filtro (Figura 3.2.6.) para diferentes concentrações de EtBr, é relativamente elevada, aproximadamente 25%. Estes resultados evidenciam a necessidade de corrigir os valores de filtrado experimental e num futuro estudar/testar outros filtros que permitam uma maior permeação do fluorocromo. De salientar que o volume de retenção dos filtros é de 30 µL, muito inferior ao utilizado nos ensaios (600 µL), pelo que é desprezável.

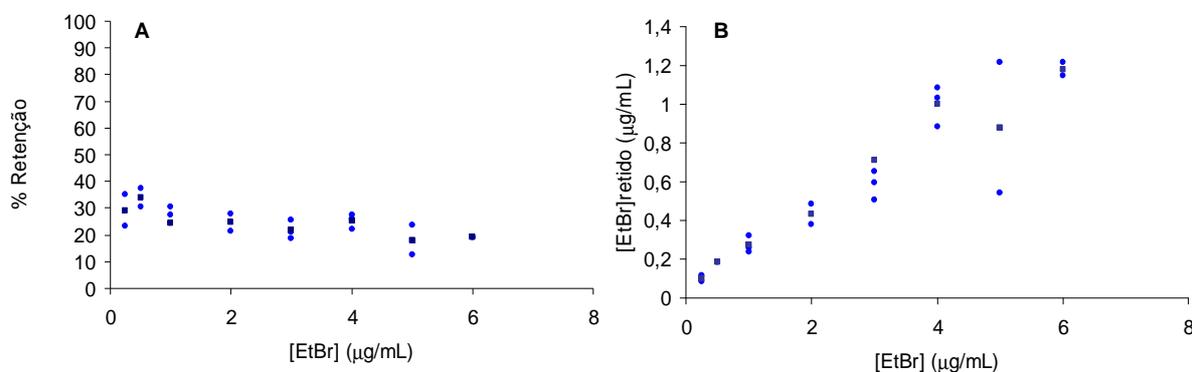


Figura 3.2.6. – **A.** Percentagem de retenção de EtBr e **B.** concentração de EtBr retido nos filtros de PVDF Durapore, Millex® - GV₁₃ da Millipore Corporation (Bedford, USA), em vários ensaios para diferentes concentrações de EtBr e respectiva média (quadrados).

É no entanto, necessário assumir que o EtBr não interfere nem reage com a matriz da membrana não sendo o sinal de fluorescência do EtBr afectado pela filtração.

Este passo adicional (filtração) suscitou um novo problema, a perda de EtBr por retenção no filtro, como demonstra a Figura 3.2.6. Para contabilizar estas perdas filtraram-se soluções de EtBr a diferentes concentrações (0,25 - 6 µg/mL), para achar uma relação entre a fluorescência antes e a fluorescência depois de filtrar (Figura 3.2.7.). Esta segunda curva de calibração permite contabilizar a quantidade de EtBr retida no filtro e vai permitir corrigir a fluorescência do filtrado lida

experimentalmente, $FL(EtBr)_{filtrado\ experimental} = FL(EtBr)_{filt\ exp}$ (protocolo 2.5.3.), e que é inferior à fluorescência real, $FL(EtBr)_{filtrado\ real} = FL(EtBr)_{filt\ real}$, em virtude de uma porção ficar retida no filtro.

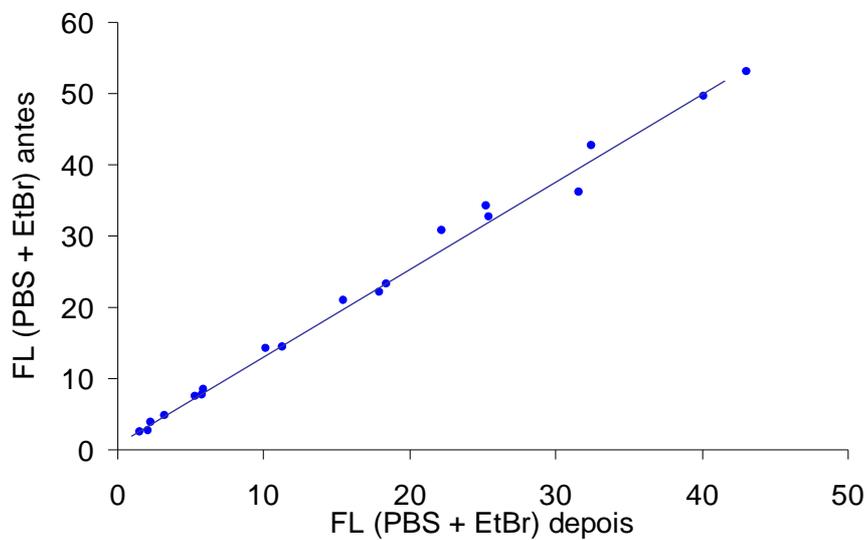


Figura 3.2.7. – Relação entre a fluorescência de soluções de EtBr antes e depois da filtração com os filtros PVDF Durapore, Millex® –GV₁₃ da Millipore Corporation (Bedford, USA).

A relação que permite quantificar a perda de EtBr por retenção no filtro é dada pela equação 3.2.11..

$$FL(PBS + EtBr)_{antes} = 1,2289 \times FL(PBS + EtBr)_{depois} + 0,7032 \quad (3.2.11.)$$

$$R = 0,99$$

Deste modo, com os dados de fluorescência relativos ao EtBr livre em solução, à cinética de acumulação de diferentes concentrações de EtBr em *E. coli* devidamente descontados do *background* (Figura 3.2.5.) e com os valores de fluorescência do filtrado corrigidos é possível determinar a concentração de EtBr intracelular, $[EtBr]_{int}$, por diferença entre a concentração de EtBr inicial no meio e a concentração final de EtBr no meio após as células terem acumulado fluorocromo e serem removidas por centrifugação e filtração, uma vez que o volume se mantém constante. Sucintamente, sabemos que:

$$FL(EtBr)_{int} = FL(EtBr)_{ini} - FL(EtBr)_{filt\ real} \quad (3.2.12.)$$

onde $FL(EtBr)_{ini}$ corresponde à fluorescência associada à concentração inicial de EtBr que medimos experimentalmente pelas soluções de EtBr e $FL(EtBr)_{filt\ real}$ corresponde à fluorescência associada à concentração de EtBr no filtrado determinada após correção dos valores de fluorescência do filtrado medidos experimentalmente. Com este diferencial e recorrendo à curva de calibração dada pela equação 3.2.10. converte-se a fluorescência intracelular, $FL(EtBr)_{int}$ em concentração de EtBr intracelular, $[EtBr]_{int}$.

De modo a ajustar o modelo dado pela equação **3.1.9.** ($[EtBr]_{int}$ vs tempo) aos dados experimentais de acumulação de EtBr nas células (Fluorescência vs tempo) relaciona-se a $[EtBr]_{int}$ anteriormente calculada com a fluorescência final relativa ao último ponto das células na presença de EtBr devidamente descontados do *background* (Figura 3.2.5.), para as diferentes concentrações de EtBr. Esta relação permite traçar uma terceira curva de calibração (equação 3.2.13.), que possibilita a conversão dados experimentais de fluorescência intracelular, FL_{int} em função do tempo em concentração intracelular de EtBr em função do tempo (Figura 3.2.8.).

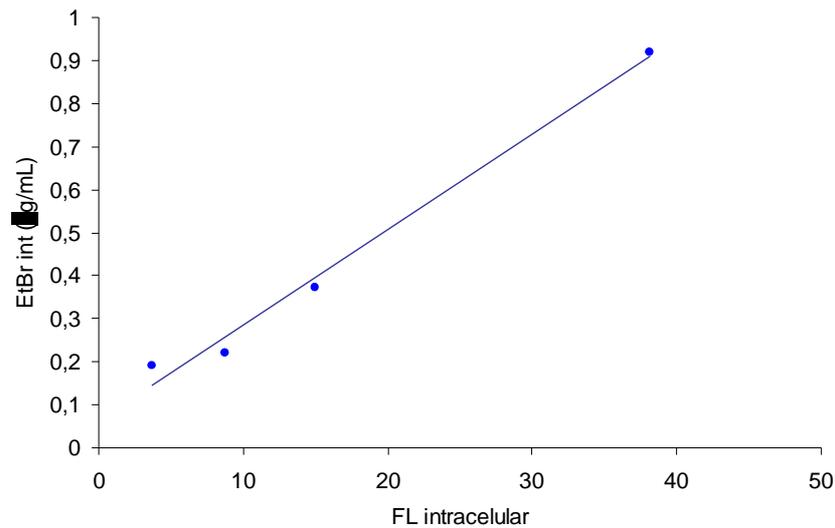


Figura 3.2.8. – Relação entre a $[EtBr]_{int}$ e a FL intracelular para *E. coli* AG100.

A relação anterior é traduzida pela equação 3.2.13..

$$[EtBr]_{int} = 0,022 \times FL_{int} + 0,06 \quad (3.2.13.)$$

(R=0,99)

A conversão dos dados de fluorescência intracelular em concentração de EtBr intracelular está expressa na Figura 3.2.9..

Como se verifica pelos resultados (Figura 3.2.9.) apenas uma pequena quantidade de EtBr entra nas células intactas. Estes resultados evidenciam a eficácia dos mecanismos de protecção da célula, nomeadamente a barreira de permeabilidade mediada pela membrana externa e actividade de efluxo.

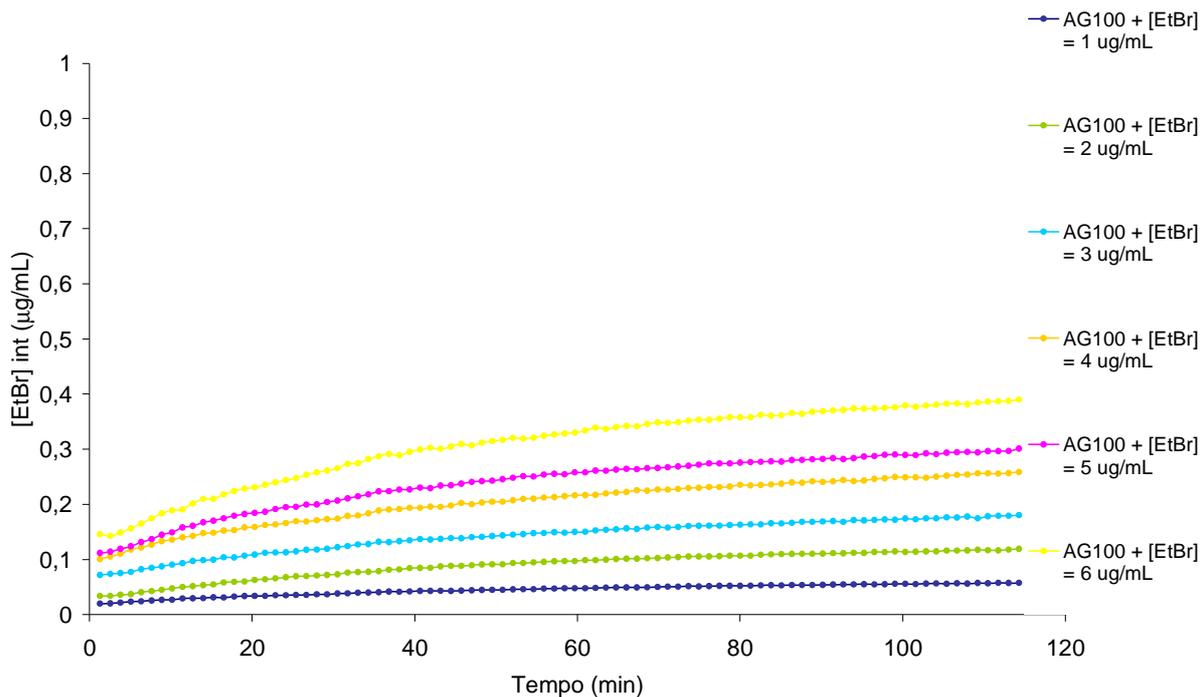


Figura 3.2.9. – Concentração de EtBr intracelular em função do tempo para *E. coli* AG100.

Utilizando o *software Table Curve™* 2D da Jandel Scientific - AISN SoftwareSTATISTICA, ajusta-se a equação do modelo (3.2.9.) aos dados de $[EtBr]_{int}$ vs tempo e determinam-se os valores das constantes k^+ , k^- como pretendido. A Figura 3.2.10. permite verificar o ajuste do modelo aos dados experimentais.

Como se vê pela Figura 3.2.10. o modelo ajusta-se bem aos dados experimentais convertidos em concentração intracelular de EtBr, para *E. coli* AG100. O coeficiente de correlação médio para os três ensaios a diferentes concentrações é de $R = 0,99 \pm 0,004$. Deste modo conclui-se que o modelo desenvolvido descreve bem a cinética de transporte de EtBr nesta estirpe.

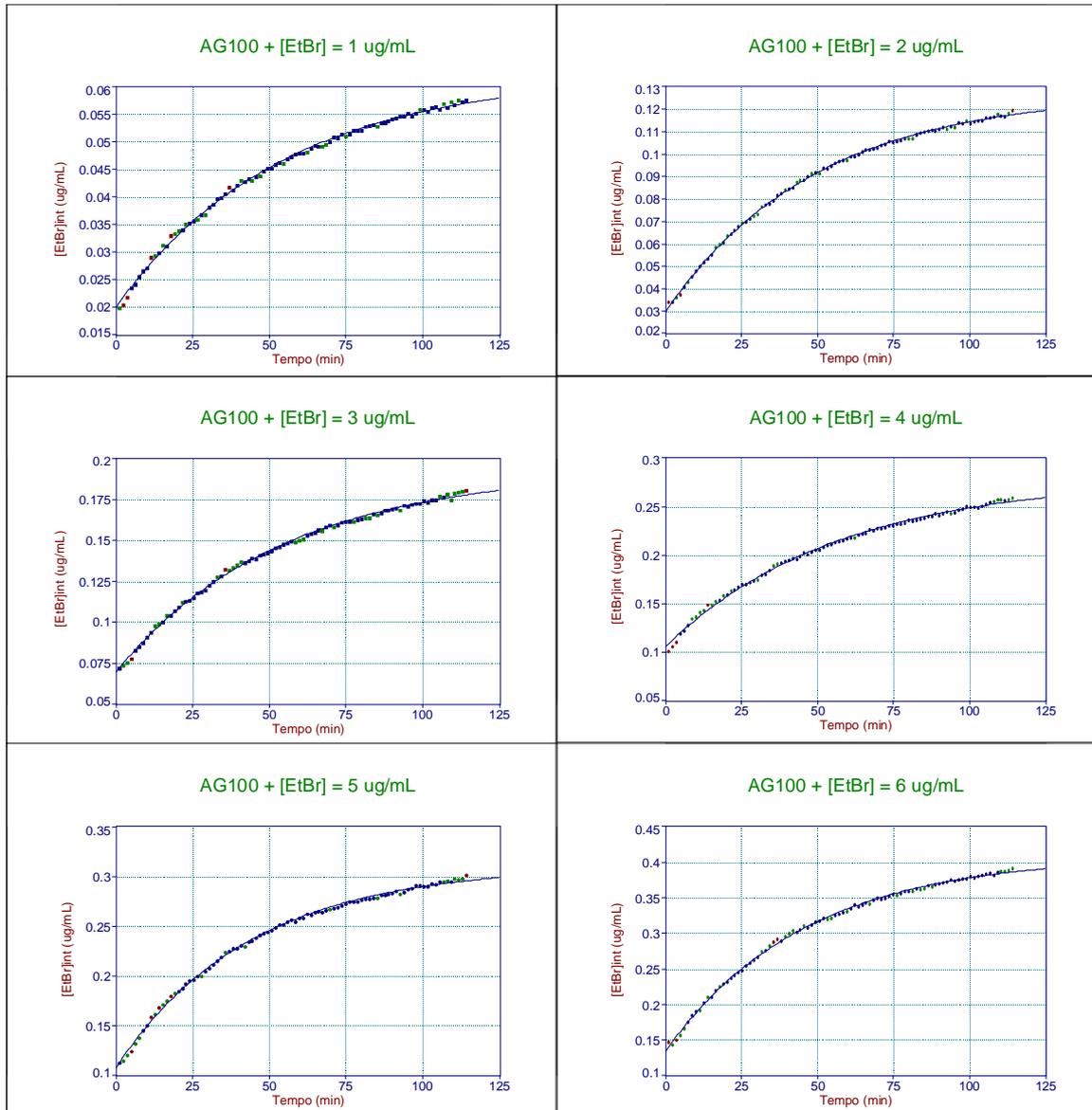


Figura 3.2.10. – Exemplicação do ajuste do modelo aos dados experimentais convertidos em concentração de EtBr intracelular, para as concentrações extracelulares iniciais de EtBr (1-6 µg/mL) em *E. coli* AG100.

Os valores das constantes k^+ , k^- para *E. coli* AG100, relativos aos três ensaios efectuados para esta estirpe encontram-se nas Figuras 3.2.11.A. e 3.2.11.B.

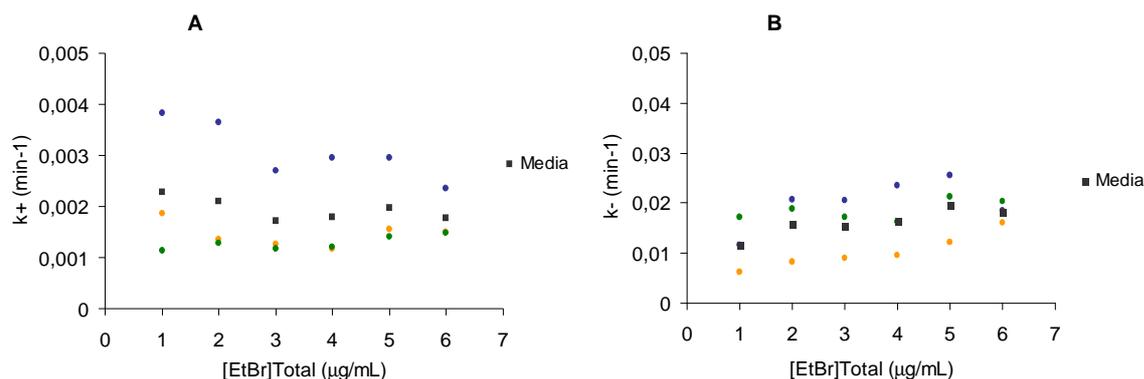


Figura 3.2.11. – **A.** Valores de taxas de entrada (k^+) e **B.** de saída (k^-) em função da concentração exterior inicial de EtBr, para *E. coli* AG100, dados pelo modelo, para os três ensaios efectuados e respectiva média.

Pelos resultados expressos na Figura 3.2.11.A. verificamos que a taxa de influxo (k_{AG100}^+) é independente da concentração de EtBr no meio, o que é compatível com o pressuposto inicial de que a entrada de fluorocromo na célula ocorre por difusão passiva, não havendo transporte activo implicado no influxo de EtBr. O valor médio correspondente à taxa de influxo de EtBr em *E. coli* AG100 é de $k_{AG100}^+ = 0,0019 \pm 0,0009 \text{ min}^{-1}$.

A Figura 3.2.11.B. demonstra uma tendência constante (declive ~ nulo) correspondente à taxa de saída de EtBr das células, indicando que k^- é independente da concentração exterior de EtBr. Independentemente da concentração de EtBr no meio a taxa a que o EtBr é expulso do meio intracelular é constante. Este resultado poderia sugerir que o EtBr uma vez na célula podia sair por difusão. No entanto, demonstrámos que não há *leaking out* de EtBr nas células (ponto 3.1. da apresentação e discussão de resultados). Uma vez no meio intracelular o EtBr liga-se a componentes celulares sendo que outra parte é removida da célula por transporte activo, mediado por bombas de efluxo, em particular pelo sistema AcrAB-TolC. Deste modo, estes resultados sugerem que as BE estão saturadas para as concentrações de EtBr utilizadas. O valor médio correspondente à taxa de saída (k_{AG100}^-) de EtBr da célula é $k_{AG100}^- = 0,0173 \pm 0,0057 \text{ min}^{-1}$.

Convém salientar que o modelo desenvolvido é um modelo simples que resultou de um balanço ao EtBr intracelular. Trata-se de uma abordagem lata ao processo de transporte, sendo um modelo abrangente que não fixa à partida o tipo de transporte (activo ou passivo) associado à entrada e saída de EtBr das células. As taxas de entrada e saída de EtBr são globais, ou seja, caso houvesse transporte activo na entrada de EtBr ela seria o somatório das duas componentes de transporte. O mesmo sucederia para a saída de fluorocromo das células.

Assim, como o modelo demonstrou que a entrada de EtBr na célula ocorre por difusão passiva e que não há *leaking out* (ponto 3.1. da apresentação e discussão de resultados) de EtBr das células sendo a saída do fluorocromo por transporte activo mediado por bombas de efluxo (ponto 3.1. da apresentação e discussão de resultados), as taxas de entrada e saída correspondem, respectivamente, a taxas de difusão e taxas de efluxo mediado pela actividade das bombas. De

salientar que a taxa de efluxo é global na medida em que engloba o número de BE e a sua actividade específica para o substrato em causa. Deste modo, esta abordagem representa uma vantagem pois não limitou o modelo e permitiu identificar o tipo de transporte associado à entrada e saída de EtBr, através do estudo da cinética de transporte de diferentes concentrações de substrato.

A velocidade máxima de entrada de EtBr na célula ocorre no instante inicial, quando a concentração de EtBr intracelular é ainda nula e a concentração exterior é máxima. Recorrendo à equação (3.2.1.) tem-se que a velocidade máxima, v_{\max} ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}^{-1}$), é dada por:

$$v_{\max} = k^+ [EtBr]_{Tot} \quad (3.2.14.)$$

uma vez que o termo $k^- [EtBr]_{int}$ no instante $t=0$ é nulo e $[EtBr]_{ext}$ é igual à $[EtBr]_{Tot}$ para este instante.

Os valores de velocidade máxima (Figura 3.2.12.) indicam que esta depende da concentração de EtBr inicialmente no meio. Quanto maior a concentração exterior de EtBr maior a velocidade de entrada de EtBr na célula, uma vez que maior é o gradiente de concentração entre os dois lados da membrana celular. Estes resultados comprovam que a entrada de fluorocromo na célula ocorre por transporte passivo a favor do gradiente de concentração.

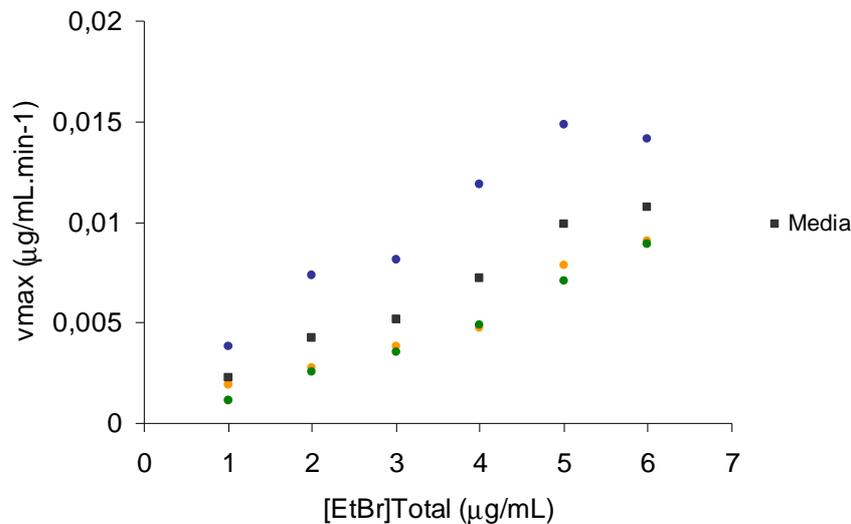


Figura 3.2.12. – Representação dos valores de velocidade máxima (v_{\max}) em função da concentração exterior inicial de EtBr, dados pelo modelo, para os três ensaios efectuados e respectiva média, para *E. coli* AG100.

Através do modelo é possível determinar a concentração máxima de EtBr no meio intracelular. Esta ocorre quando os dois processos de transporte de EtBr na célula estão equilibrados, ou seja, no estado estacionário, $\lim_{t \rightarrow \infty} [EtBr]_{int}(t)$:

$$[EtBr]_{int}^{ss} = \frac{k^+}{k^+ + k^-} [EtBr]_{Tot} \quad (3.2.15.)$$

A Figura 3.2.13. sumaria os resultados da concentração intracelular de EtBr no estado estacionário, $[EtBr]_{int}^{SS}$, em função da concentração de EtBr exterior inicial.

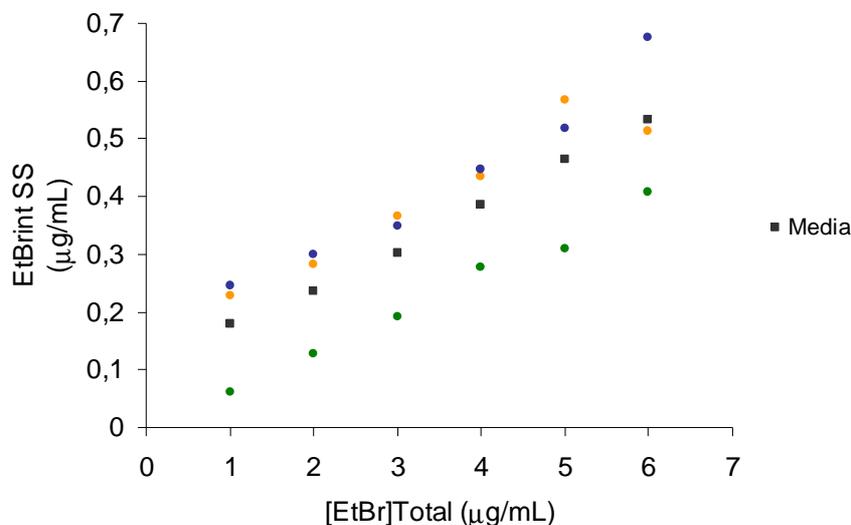


Figura 3.2.13. – Representação da concentração intracelular no estado estacionário em função da concentração exterior inicial de EtBr, dados pelo modelo, para os três ensaios efectuados e respectiva média para *E. coli* AG100.

Os resultados anteriores (Figura 3.2.13.) permitem, à semelhança dos da Figura 3.2.9., constatar que muito pouco EtBr entra na célula o que evidencia a elevada barreira de permeabilidade composta por a membrana externa e pela actividade de efluxo. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Lambert e LePecq (1984) que demonstraram que em células intactas pouco EtBr entra na célula. No estado estacionário as células acumulam aproximadamente 10 % da concentração de EtBr exterior inicialmente no meio (Figura 3.2.13.). No entanto, esta pequena concentração é responsável por um incremento elevado de fluorescência face às soluções de EtBr livre.

No sentido de avaliar quantitativamente a importância dos sistemas de efluxo, em particular de AcrAB-TolC, no transporte de EtBr em *E. coli* procedeu-se de modo idêntico ao anterior utilizando duas estirpes mutantes: *E. coli* AG100A que possui este sistema inactivo por inserção do gene *Kan* do transposão Tn903 (Okuso *et al.*, 1996) e *E. coli* AG100 adaptada a 12 µg/mL de tetraciclina (AG100_{TET}) que apresenta a super expressão de AcrAB-TolC (Viveiros *et al.*, 2005). Esta abordagem permitiu avaliar a aplicabilidade do modelo a outras estirpes. No entanto, de modo a garantir a total viabilidade celular e atendendo à MIC previamente determinada para ambas as estirpes ($MIC_{AG100A}^{EtBr} = 5\mu\text{g/mL}$; $MIC_{AG100TET}^{EtBr} > 200\mu\text{g/mL}$) (Viveiros *et al.*, 2005) teve de se adaptar as concentrações de EtBr a utilizar. Se para AG100_{TET} foi possível utilizar a mesma gama de concentrações utilizada para AG100 (1 a 6 µg/mL), para AG100A foi necessário utilizar concentrações entre 0,125 a 1,5 µg/ml de modo a garantir a total viabilidade celular (Figuras 3.2.14.A. e 3.2.14.B.). Estes resultados foram comprovados pela determinação das CFU após o ensaio para

cada estirpe e cada concentração de fluorocromo, tendo-se obtido cerca de 100 % de viabilidade celular.

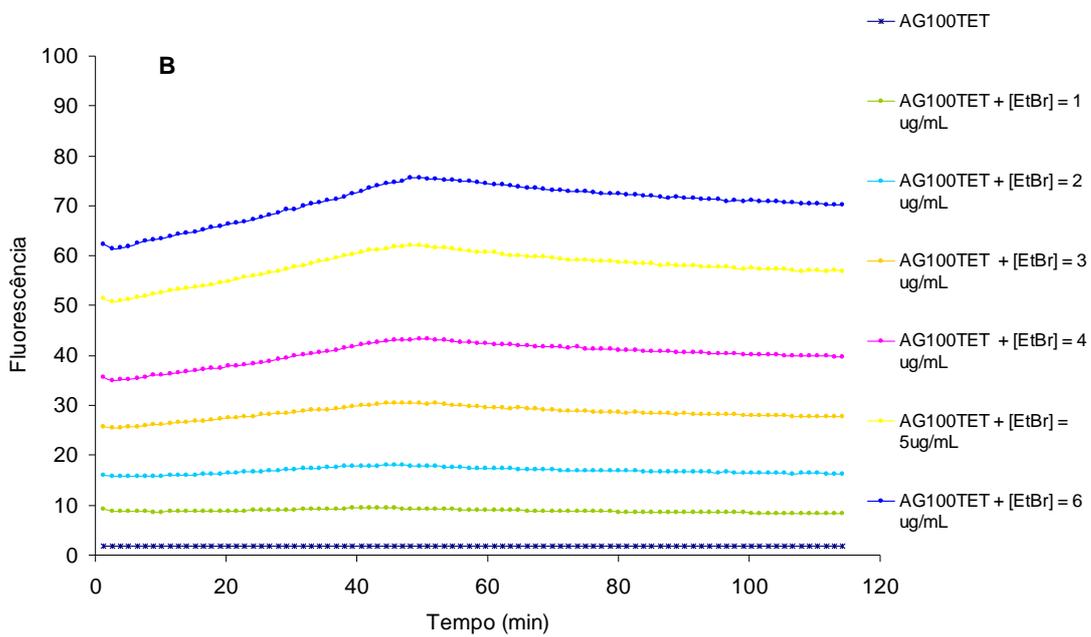
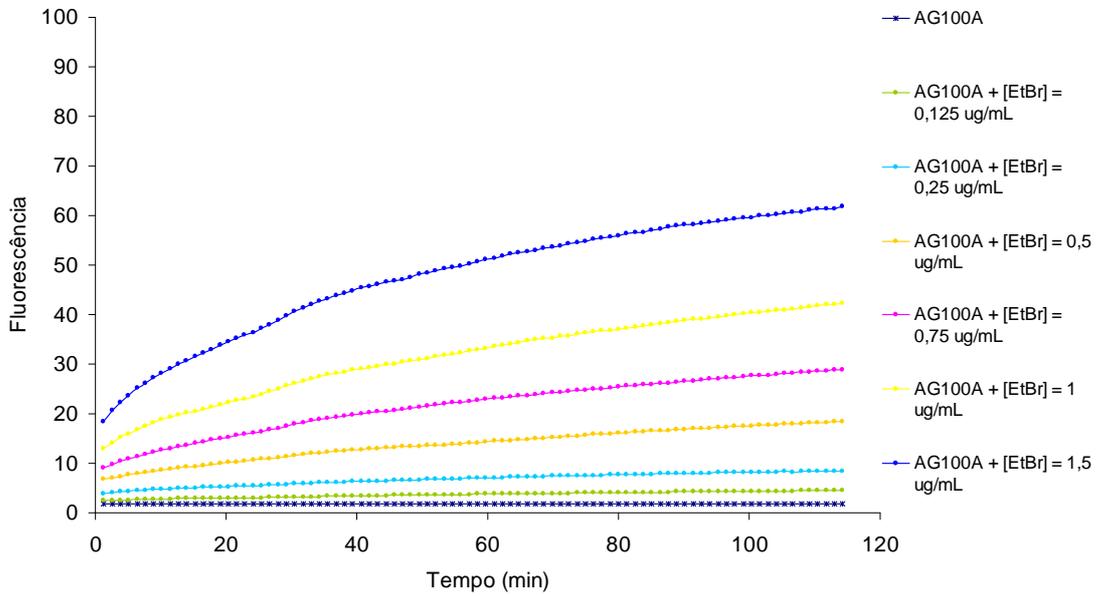


Figura 3.2.14. – Cinética de transporte de EtBr em **A.** *E. coli* AG100A e **B.** *E. coli* AG100TET (média dos três ensaios).

Os resultados da dependência da acumulação de EtBr com a estirpe apresentam-se para 1 µg/mL de EtBr uma vez que é esta a concentração comum às três estirpes (Figura 3.2.15.).

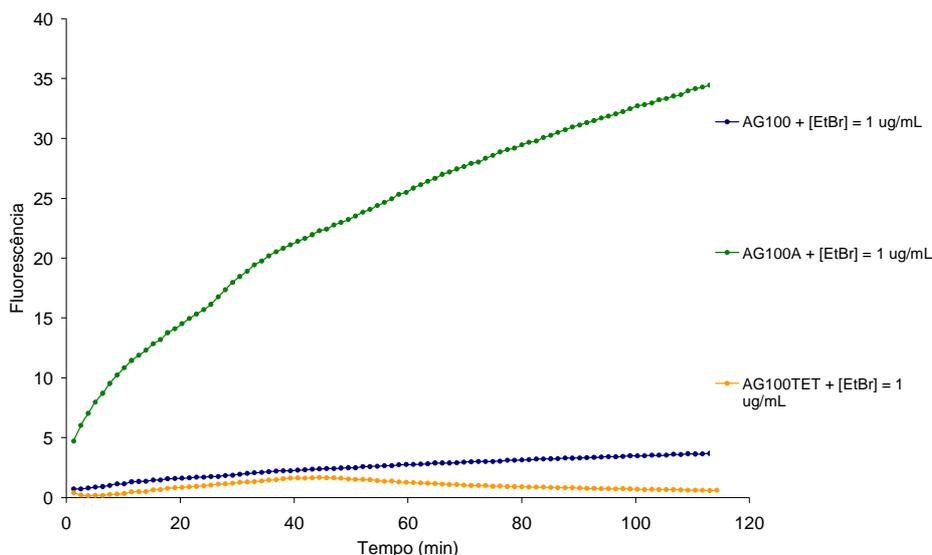


Figura 3.2.15. – Comparação da cinética de transporte de 1 µg/mL de EtBr para as três estirpes de *E. coli*: AG100, AG100A e AG100_{TET}.

Na primeira parte deste trabalho e em trabalhos anteriores (e.g. Paixão, 2006) demonstrou-se que EtBr é substrato de AcrAB-TolC que o remove activamente das células por transporte activo através da força protomotriz.

Os resultados expressos na Figura 3.2.15. evidenciam a dependência da acumulação intracelular de EtBr com a estirpe mutante indicando que a estirpe AG100A (com o sistema AcrAB-TolC inactivo) apresenta uma maior e mais rápida acumulação de EtBr comparativamente às estirpes AG100 e AG100_{TET}, não se atingindo um estado estacionário no período do ensaio. De facto, o equilíbrio dinâmico entre os dois processos de transporte (difusão e transporte activo) está deslocado no sentido do meio intracelular em virtude da ausência deste sistema de efluxo AcrAB-TolC. AG100 e AG100_{TET} apresentam valores de fluorescência muito inferiores aos observados para AG100A e muito próximos entre si evidenciando a sua capacidade de remover o EtBr das células pela actividade de efluxo, em particular pelo AcrAB-TolC, que nestas estirpes está activo e funcional. Por outro lado, a estirpe AG100_{TET} apresenta uma menor e mais lenta acumulação de EtBr em relação a AG100 e AG100A, como resultado da super expressão deste sistema de efluxo. Para esta estirpe ocorre um máximo de acumulação até aos 50 minutos de ensaio, verificando-se em seguida um decréscimo de fluorescência até se atingir um estado estacionário. Este comportamento será o resultado da remoção do EtBr da célula por acção de AcrAB-TolC que nesta estirpe se encontra super expresso. Uma vez que estas estirpes diferem entre si pelo grau de actividade de AcrAB estes resultados consolidam os anteriores evidenciando a implicação deste sistema no controlo da acumulação de substrato (EtBr) nas células e reflectem a cinética de efluxo.

O decréscimo de fluorescência associado à estirpe AG100_{TET} é visível para toda a gama de concentrações usadas (Figuras 3.2.14.B. ou 3.2.16.). De facto, demonstrámos que não se trata de perda de fluorescência do EtBr uma vez que comprovámos a fotoestabilidade do fluorocromo, nem se trata de perda de viabilidade celular como consequência do uso de concentrações elevadas de

fluorocromo uma vez que se utilizaram concentrações muito inferiores à MIC e se comprovou, pela determinação de CFU após o ensaio, que as células permanecem viáveis. À partida estes resultados evidenciam a maior actividade de AcrAB-TolC que nesta estirpe se encontra super expresso.

Genericamente para toda a gama de concentrações testada (excepto para 5 µg/mL EtBr) e durante o período de ensaio AG100_{TET} acumula menos EtBr que AG100 (Figura 3.2.16.). No entanto, esta estirpe apresenta um comportamento distinto em dois períodos de tempo. Até aos 50 minutos observa-se uma menor acumulação de EtBr face à estirpe padrão o que poderá ser explicado pela actuação de AcrAB que nesta estirpe se encontra super expresso. No entanto, observa-se um influxo permanente de EtBr nesse período de tempo e com uma tendência linear, sugerindo que não há actividade de efluxo, sendo o reflexo de uma entrada de fluorocromo no meio intracelular por difusão onde não há participação de BE a actuar em sentido oposto. Após este período ocorre um decréscimo da fluorescência traduzindo a remoção mais eficaz de fluorocromo por AG100_{TET}. Este comportamento pode sugerir duas hipóteses. A existência de um tempo necessário para a indução do AcrAB, correspondente à primeira fase do transporte de EtBr (primeiros 50 minutos). Uma vez que a estirpe mutante difere de AG100 no número de BE (AcrAB) activas (número de BE superior em AG100_{TET}), porventura há uma necessidade de mais energia para activar o maior número de BE, sendo requerido um tempo (primeira fase até aos 50 minutos) para activar este sistema. Outra hipótese é a ocorrência da indução de outras BE que não o AcrAB e que estão implicadas no efluxo deste fluorocromo (e.g. AcrEF). Essa indução demora 50 minutos.

Esta discussão será efectuada, mais adiante, quantitativamente por aplicação do modelo a AG100_{TET} e por comparação desta com a estirpe padrão.

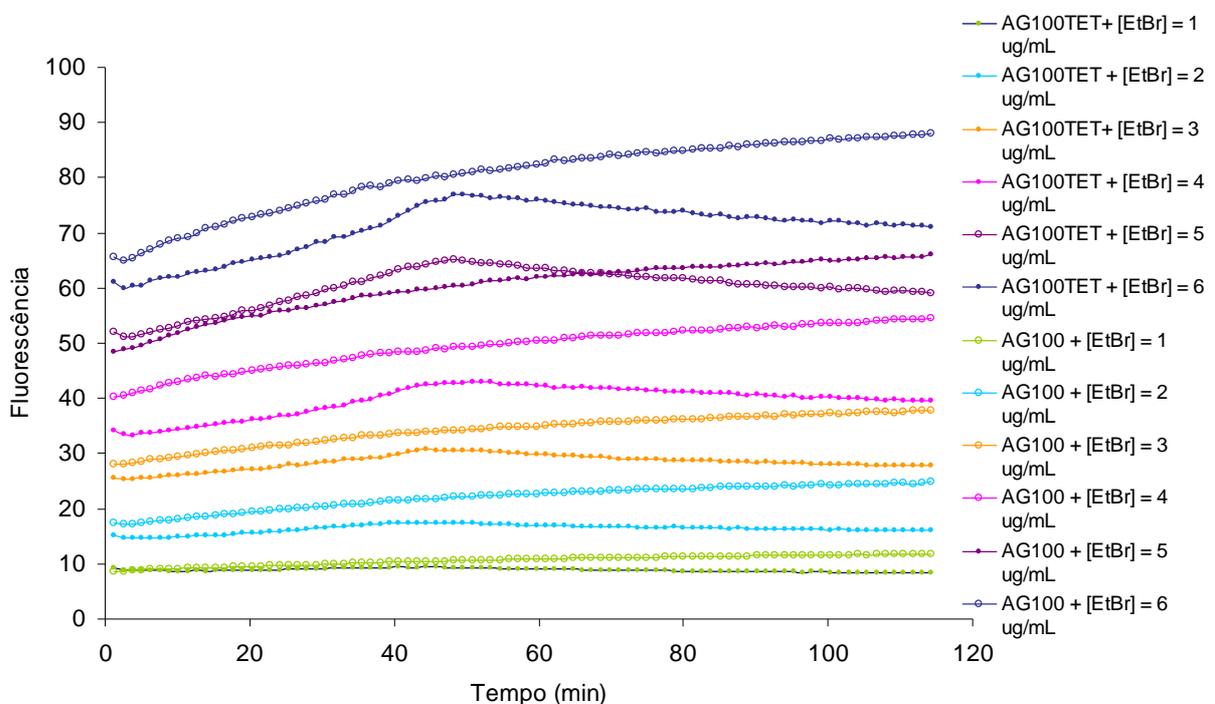


Figura 3.2.16. – Comparação da cinética de transporte de EtBr (1-6 µg/mL) entre *E. coli* AG100 e *E. coli* AG100_{TET}.

Tal como referido a demonstração do modelo foi efectuada para a estirpe padrão, pretendendo-se nesta secção apenas comprovar a sua aplicabilidade nas estirpes mutantes para avaliar quantitativamente a actividade de efluxo.

Os valores das constantes apresentados correspondem aos valores médios com o respectivo desvio padrão. No sentido de facilitar a comparação dos resultados obtidos para as estirpes mutantes com a estirpe padrão os valores das taxas de influxo e de efluxo vêm associados ao valor P do este ANOVA. Este corresponde à probabilidade da hipótese nula ser verdadeira. Entenda-se como hipótese nula não haver diferenças entre as médias das amostras. A hipótese nula aceita-se ou rejeita-se conforme o valor P seja superior ou inferior ao nível de significância (α) previamente especificado. Neste estudo considerou-se $\alpha = 0,05$, que corresponde ao limiar tipicamente utilizado.

Desenvolvido o modelo para AG100 e seguindo a mesma metodologia para estas duas estirpes verificamos (Figura 3.2.17.) que a abordagem empregue para o doseamento de EtBr intracelular traduz as diferenças na acumulação de fluorocromo pelas três estirpes utilizadas.

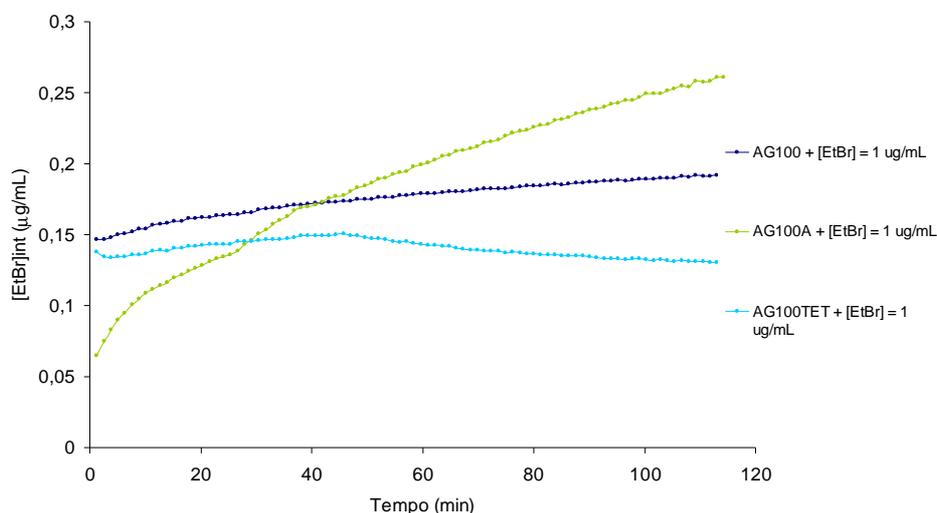


Figura 3.2.17. – Concentração intracelular de EtBr para as três estirpes na presença de 1 $\mu\text{g/mL}$ de EtBr exterior.

A Figura 3.2.17. demonstra a aplicabilidade da abordagem seguida para a quantificação do EtBr intracelular. As diferenças observadas nos instantes iniciais têm que ver com o erro experimental e o erro associado ao ajuste da curva de calibração $[\text{EtBr}]_{\text{int}}$ e FL que permite a conversão dos dados de fluorescência em concentrações intracelulares de EtBr.

Verificamos pela Figura 3.2.18. que o modelo desenvolvido expresso pela equação (3.2.9.) se ajusta ao comportamento de AG100A, mas não se ajusta a AG100_{TET}. Uma vez que o comportamento e consequentemente o ajuste é idêntico para as restantes concentrações testadas apenas se demonstra o ajuste (aplicabilidade do modelo na descrição da cinética de transporte) para a concentração comum de 1 $\mu\text{g/mL}$ de EtBr.

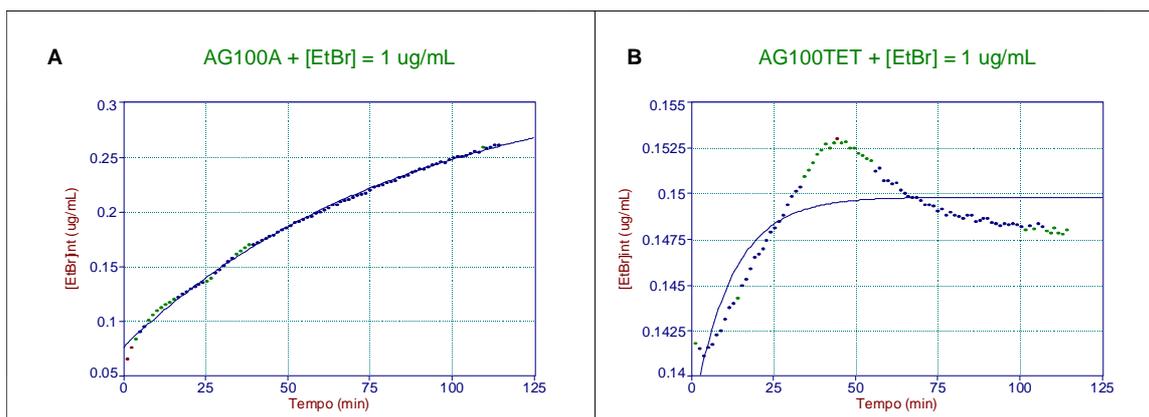


Figura 3.2.18. – Exemplificação do ajuste do modelo aos dados experimentais convertidos em concentração intracelular de EtBr para as estirpes **A.** AG100A e **B.** AG100_{TET}, para a concentração de EtBr exterior no instante inicial de 1 µg/mL.

Os coeficientes de correlação para os ajustes anteriores são de $R=0,99$ e de $R=0,82$ para AG100A e AG100_{TET}, respectivamente. Estes resultados reflectem a aplicabilidade do modelo à cinética obtida para AG100A e a não aplicabilidade à estirpe AG100_{TET}.

Para AG100A os valores das constantes de entrada e de efluxo estão expressas na Figura 3.2.19..

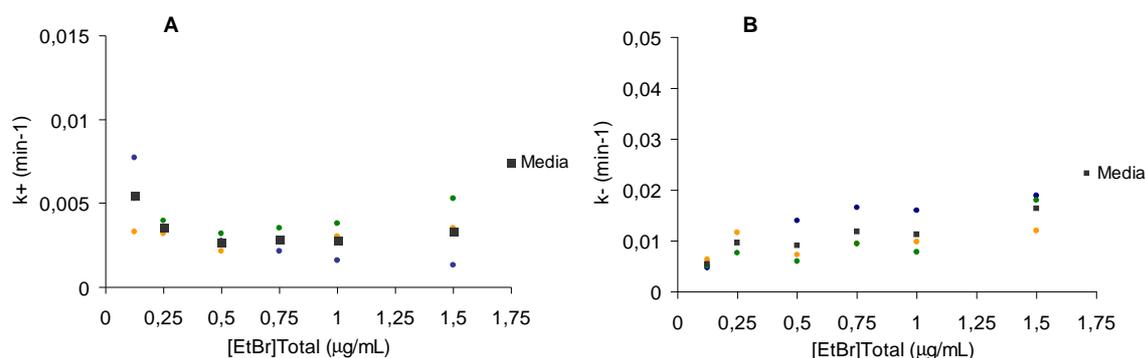


Figura 3.2.19. – Valores das taxas de **A.** entrada e de **B.** efluxo, para *E. coli* AG100A dados pelo modelo, para os três ensaios efectuados e respectiva média.

A tendência observada para as taxas de influxo e de efluxo nesta estirpe é idêntica à observada para a estirpe padrão. Ou seja o influxo corresponde a um processo de difusão passiva e a saída corresponde ao transporte activo mediado por BE estando estas saturadas.

A taxa de influxo média para AG100A, $k_{AG100A}^+ = 0,0035 \pm 0,0012 \text{ min}^{-1}$ (valor $P = 0,0012$) é significativamente superior à de AG100 ($k_{AG100}^+ = 0,0019 \pm 0,0009 \text{ min}^{-1}$).

Este resultado é oposto ao esperado uma vez que as estirpes apenas diferem, à partida, na actividade de efluxo e não na permeabilidade da membrana, pelo que seria de esperar que a taxa de influxo (k^+) fosse igual em ambas as estirpes. A ausência de AcrAB só faria com que k^- fosse inferior e portanto o estado estacionário fosse superior. Este resultado vem confirmado pelo valor P , muito

inferior ao nível de significância estabelecido, que indica que existe uma probabilidade elevada das taxas de influxo serem de facto distintas entre estas duas estirpes.

De facto, tem sido sugerido a existência de uma relação entre a permeabilidade do envelope celular e actividade de efluxo (Viveiros *et al.*, 2007). A confirmar-se a diferença existente na taxa de entrada entre estas estirpes, seria interessante efectuar outro tipo de análise no sentido de avaliar a permeabilidade da membrana. Porventura pode ocorrer algum mecanismo de adaptação fisiológica, como alteração na regulação da expressão de porinas, uma vez que sabemos que, por exemplo, a super expressão de determinada porina implica o decréscimo da expressão de outras (e.g. OmpC e OmpF ou OmpX e OmpC/OmpF (Liu e Ferenci, 2001 e Viveiros *et al.*, 2007)). O mesmo pode acontecer em relação aos sistemas de efluxo e porinas, como tem sido sugerido (Viveiros *et al.*, 2007).

O valor da constante de efluxo para AG100A, $k_{AG100A}^- = 0,0106 \pm 0,0033 \text{ min}^{-1}$ é muito inferior (valor $P = 0,0023$) ao obtido para AG100 ($k_{AG100}^- = 0,0173 \pm 0,0057 \text{ min}^{-1}$). De um modo lato a taxa de efluxo na estirpe padrão é 60 % superior à estimada para AG100A. Este resultado está de acordo com o esperado e traduz a ausência do sistema de efluxo AcrAB-TolC em AG100A e consequentemente a maior dificuldade desta estirpe em expulsar o EtBr do meio intracelular. A discrepância entre os valores das taxas de efluxo, vem também expressa pelo valor P muito inferior ao nível de significância previamente estabelecido, indicando que as taxas de efluxo são, de facto, distintas.

No estado estacionário, para idêntica concentração de EtBr extracelular ($1 \mu\text{g/mL}$), atinge-se uma concentração intracelular de fluorocromo superior em *E. coli* AG100A, $[EtBr]_{intAG100A}^{ss} = 0,2792 \pm 0,1180 \mu\text{g/mL}$, face à estirpe padrão, $[EtBr]_{intAG100}^{ss} = 0,1789 \pm 0,1015 \mu\text{g/mL}$ o que corresponde a um aumento de cerca de 60%. Este resultado está de acordo com o esperado. A inactivação do sistema AcrAB, em AG100A desloca o equilíbrio no sentido do meio intracelular permitindo a incorporação intracelular de uma maior quantidade de fluorocromo.

Perante estes resultados podemos concluir que o modelo se ajusta bem ao comportamento de estirpes que apresentam este tipo de cinética de transporte e consegue destrinçar a componente de influxo e efluxo de um modo coerente.

Como vimos para AG100_{TET} (Figura 3.2.18.B.) o modelo não se ajusta directamente aos dados experimentais devido ao seu comportamento variar de dois modos distintos para dois períodos de tempo. No entanto, se aplicarmos exactamente o mesmo modelo dividindo a cinética de transporte em dois períodos (até aos 50 minutos e após 50 minutos) é possível ajustar exactamente o mesmo modelo aos dados experimentais (Figura 3.2.20.). O coeficiente de correlação (R) médio (dos três ensaios efectuados e para as concentrações testadas) relativo aos ajustes de $0,99 \pm 0,19$ e de $0,99 \pm 0,001$, para o período até 50 minutos e após os 50 minutos, respectivamente.

O ajuste em duas fases e a subsequente determinação das taxas de entrada e de efluxo para ambos os períodos irá permitir inferir acerca do fenómeno adjacente ao decréscimo de fluorescência já

referido anteriormente e permitirá tirar algumas conclusões acerca das hipóteses previamente referidas.

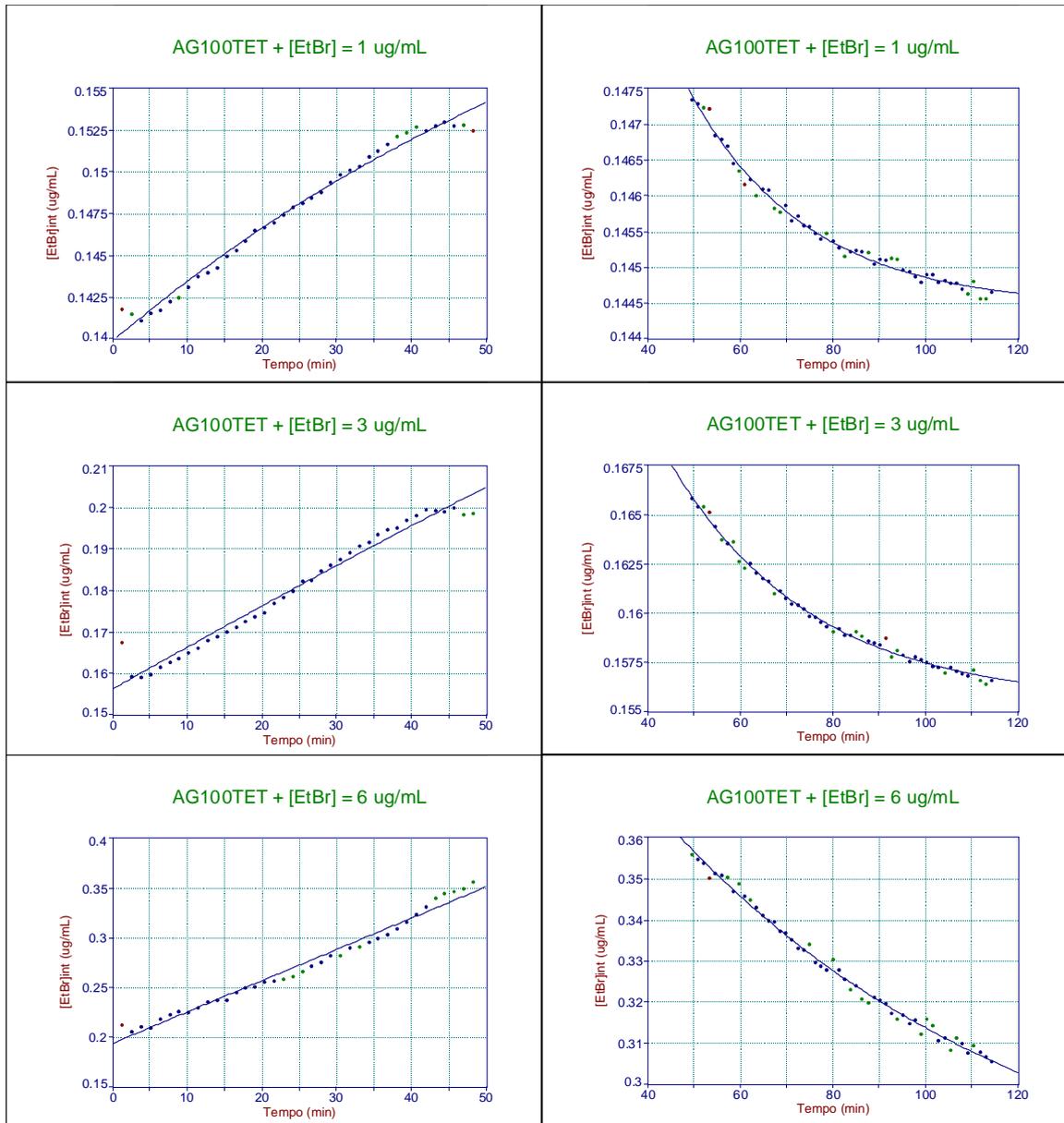


Figura 3.2.20. – Exemplicação do ajuste do modelo à cinética de transporte de EtBr em *E. coli* AG100_{TET}, dividindo a cinética em duas fases, para três concentrações de EtBr (1-3-6 µg/mL).

A Figura 3.2.21. demonstra a dependência da taxa de influxo (k^+) e de efluxo (k^-) no período inicial (até aos 50 minutos) para os três ensaios efectuados e a média desses valores.

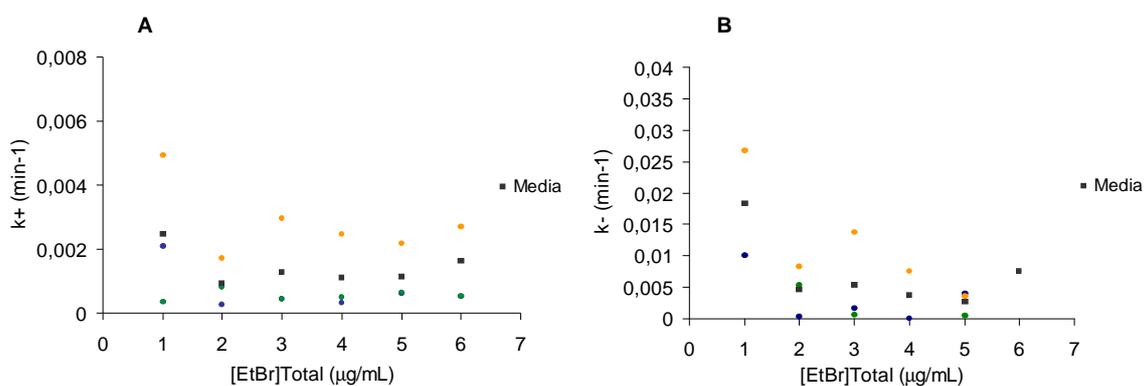


Figura 3.2.21. - Valores das taxas de **A.** entrada e de **B.** efluxo para AG100_{TET} no período inicial, primeiros 50 minutos, dados pelo modelo, para os três ensaios efectuados e respectiva média.

No período inicial, as taxas de entrada e saída demonstram uma dependência constante com o aumento da concentração de substrato, à semelhança do observado para AG100. Sugerindo o mesmo tipo de fenómeno de transporte para o influxo (difusão passiva) e saturação das BE na remoção do fluorocromo da célula.

A taxa de entrada de EtBr em AG100_{TET} ($k_{AG100TET}^+ = 0,0016 \pm 0,0014 \text{ min}^{-1}$) é praticamente idêntica (valor $P = 0,61$) à obtida para AG100 ($k_{AG100}^+ = 0,0019 \pm 0,0009 \text{ min}^{-1}$). Este resultado está de acordo com o esperado pois estas estirpes apenas diferem, à partida, na actividade de efluxo, sendo a permeabilidade semelhante. Por outro lado, neste período, a taxa de efluxo é para a estirpe mutante, $k_{AG100TET}^- = 0,0070 \pm 0,0061 \text{ min}^{-1}$, significativamente inferior (valor $P = 0,0005$) à obtida para a estirpe selvagem ($k_{AG100}^- = 0,0173 \pm 0,0057 \text{ min}^{-1}$), indicando que neste período não há grande actividade de efluxo. Este resultado vai de encontro à hipótese formulada inicialmente de que nesta fase (primeiros 50 minutos) o sistema AcrAB não estará activo. Este período corresponderá a uma fase *lag* em que a célula necessite de atingir um determinado nível energético para induzir os sistemas de efluxo AcrAB que nesta estirpe se encontram em maior número. Por outro lado, poderá corresponder a uma fase de indução de novos sistemas de efluxo que tenham o EtBr como substrato. Estes resultados expressam bem o comportamento linear na acumulação de EtBr observada nestes primeiros 50 minutos, evidenciando apenas o influxo, como processo difusivo dependente da concentração de EtBr no meio e a ausência de actividade de efluxo no sentido oposto.

Após este período, as taxas de influxo (k^+) e de efluxo (k^-) que resultam do ajuste feito a partir dos 50 minutos, estão expressas na Figura 3.2.22.

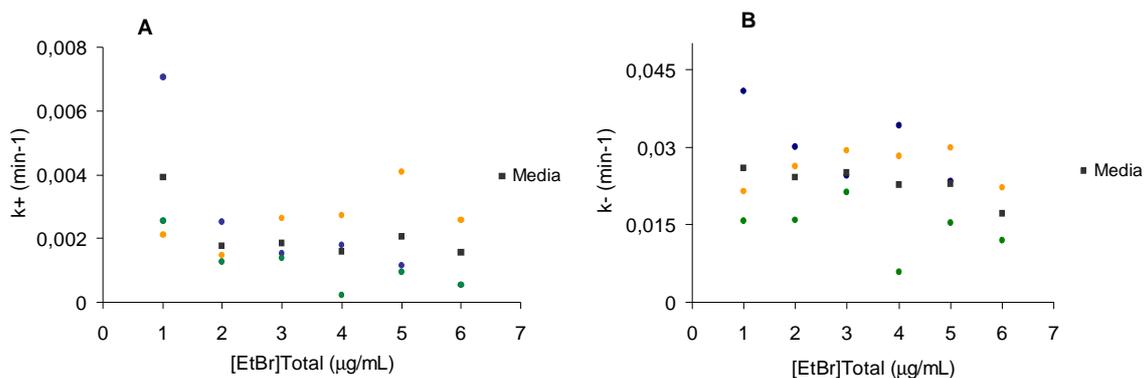


Figura 3.2.22. – Valores das taxas de **A.** entrada e de **B.** efluxo para AG100_{TET} no período após 50 minutos, dados pelo modelo, para os três ensaios efectuados e respectiva média.

Dos resultados anteriores verifica-se que as taxas de influxo e efluxo apresentam um comportamento praticamente constante na gama de concentrações utilizada. Novamente indicando que a entrada ocorre por difusão e estando as BE implicadas no efluxo de EtBr saturadas, tal como sucedia na estirpe selvagem.

A taxa de influxo $k_{AG100TET}^+ = 0,0021 \pm 0,0014 \text{ min}^{-1}$ é praticamente idêntica (valor $P = 0,28$) à da estirpe padrão ($k_{AG100}^+ = 0,0019 \pm 0,0009 \text{ min}^{-1}$) como seria de esperar dado estas estirpes apenas diferirem, à partida, na actividade de efluxo. A taxa de efluxo na estirpe mutante, $k_{AG100TET}^- = 0,0230 \pm 0,0090 \text{ min}^{-1}$ é significativamente superior (valor $P = 0,0045$) à da estirpe padrão ($k_{AG100}^- = 0,0173 \pm 0,0057 \text{ min}^{-1}$). Este resultado está de acordo com o esperado pois traduz a maior actividade do sistema AcrAB-ToIC, que nesta estirpe se encontra super expresso, sendo responsável pela expulsão mais eficaz do fluorocromo com o conseqüente decréscimo de fluorescência observado neste período. A diferença nas constantes de efluxo expressa bem o facto de se atingir um estado estacionário inferior em AG100_{TET} face a AG100.

Estes resultados permitem sugerir a hipótese inicialmente formulada para o comportamento de AG100_{TET}. A primeira fase corresponde a um período de “latência” onde ocorre maioritariamente o influxo por difusão passiva de EtBr não havendo actividade de efluxo no sentido oposto. Este período corresponderá a uma fase de indução que será responsável pela menor actividade de efluxo nos primeiros 50 minutos. O facto desta estirpe possuir um número superior de BE AcrAB poderá implicar a necessidade de recrutamento de mais energia para activar este sistema. Adicionalmente podem estar implicadas outras BE que tenham o EtBr como substrato e que necessitam de ser induzidas. A superior actividade de efluxo desta estirpe face a AG100, após os 50 minutos, será responsável pelo decréscimo de fluorescência observado (Figuras 3.2.14.B. e 3.2.16.).

Assim, o modelo desenvolvido permitiu descrever a actividade de efluxo tal como a havíamos interpretado teoricamente, discriminando a actividade de AcrAB-ToIC entre estirpes que diferem no seu grau de actividade de efluxo. Tem-se agora um instrumento de medida que nos permite descrever de uma forma precisa, sensível e reprodutível a biocinética do transporte de EtBr em *E. coli*.

4. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste trabalho foi nosso objectivo desenvolver um método simples, rápido, sensível e reprodutível que permita demonstrar e quantificar a actividade de efluxo de substratos em bactérias ao mesmo tempo que possibilite a detecção da actividade intrínseca das BE em estirpes susceptíveis a antibióticos bem como com fenótipo de MDR obviando, assim, as fragilidades dos métodos e procedimentos anteriores. Para o efeito seleccionou-se uma nova tecnologia: fluorimetria em termociclador de tempo real Rotor-Gene 3000TM da Corbett Research (Sydney, Austrália) e um substrato de eleição, o EtBr, tido como um substrato universal de BE (Piddock *et al.*, 1999 e Martins *et al.*, 2006).

Assim, desenvolveu-se um método automático para a monitorização do transporte de EtBr em *E. coli* recorrendo à fluorimetria em termociclador de tempo real. Este método baseia-se nas diferenças de fluorescência entre o EtBr livre em solução e no interior das células. Esta abordagem permite representar o comportamento médio de um amplo número de BE de diferentes famílias capazes de bombear o substrato do interior das células. Trata-se de uma enorme vantagem dado o reconhecimento da pouca especificidade das BE, em particular das pertencentes à família RND. O protocolo desenhado a par do modelo matemático mecanicista desenvolvidos associados a esta tecnologia representam um método inovador que permitiu a monitorização *in vivo* e *on-line* do sinal de fluorescência aplicado ao estudo da actividade das BE constituindo o principal aspecto inovador deste protocolo. Pela primeira vez é possível avaliar de um modo contínuo e em tempo real a actividade destes sistemas, o que tradicionalmente era efectuado por medições discretas de fluorescência. A aplicação simultânea de ciclos térmicos, por períodos de tempo específicos, ao acompanhamento das leituras fluorimétricas é outro dos aspectos inovadores que possibilita o estudo da influência da temperatura na actividade dos sistemas de efluxo. O desenho óptico e térmico do aparelho contribuem para a precisão e reproductibilidade do novo método. O Rotor-Gene 3000TM utiliza fotomultiplicadores capazes de detectar um único fóton de luz, o que contribui para a elevada sensibilidade do aparelho (Operator Manual, 2004 e <http://www.corbettlifescience.com>. Acedido em Agosto, 2007). A possibilidade de efectuar leituras de vários corantes em diversos canais em simultâneo contribui para a obtenção de uma diversidade de resultados num curto espaço de tempo e pode ser usada no futuro para a identificação de novos substratos de BE. A possibilidade de integração de robots para a preparação automática das amostras permitirá eliminar os erros de manipulação associados ao operador e contribuirá para a maior reprodutibilidade da técnica.

Os rotores facilmente permutáveis e com capacidades elevadas (36 ou 72 amostras) permitem uma boa flexibilidade no número de amostras a analisar ao mesmo tempo que possibilitam a execução de diversos ensaios em simultâneo contribuindo para a rapidez na obtenção de resultados e para uma reduzida razão trabalho/tempo. O novo protocolo permite obviar o trabalho moroso dos métodos anteriores, que implicavam a dedicação exclusiva de um operador para efectuar as medições de fluorescência. A monitorização da fluorescência pode ser levada a cabo sem que os microtubos sejam abertos o que elimina o risco de disseminação de material infeccioso e tóxico no laboratório.

Os microtubos feitos de plástico evitam quebras do material e contribuem, igualmente, para a segurança do método. Esta é uma característica que contribui para o enorme potencial deste protocolo ao estudo de estirpes clínicas. A programação e definição dos ciclos de temperatura, do tempo de ensaio, bem como do intervalo de tempo entre aquisições de dados é feita através da programação prévia por recurso a um *software* de fácil utilização. É um método operacionalmente barato pois não requer reagentes especiais e instrumentação especializada, com excepção do investimento inicial no aparelho Rotor-Gene 3000™.

Este método utilizou duas abordagens experimentais distintas – o protocolo de acumulação e o protocolo de efluxo. O protocolo de acumulação difere do anteriormente desenhado (Paixão, 2006), na medida em que permite a monitorização da fluorescência desde o instante inicial de adição de EtBr tendo-se eliminado a passo de equilíbrio após adição do fluorocromo. Enquanto o protocolo de efluxo permite “eliminar” a componente da difusão e isolar o efeito da actividade de efluxo, uma vez que se demonstrou não haver *leaking out* de EtBr, permitindo uma observação mais directa deste processo de transporte. O protocolo de efluxo à semelhança do anterior (acumulação) permitiu demonstrar que o efluxo é um transporte activo (dependente da glucose e temperatura) mediado por BE. E permitiu identificar o EtBr como substrato do sistema AcrAB-TolC, de *E. coli*. Esta abordagem metodológica permitiu ainda inferir que o EtBr se ligará, de um modo transiente, a outros componentes celulares que não somente ao ds-DNA, situação esta que se crê só ocorrer para elevadas concentrações de EtBr, a partir das quais ocorre perda da viabilidade celular.

Esta estratégia (protocolo de efluxo) permite verificar o efeito de diversos compostos na inibição da actividade de efluxo, podendo constituir uma boa metodologia de escrutínio e teste de novos inibidores e seleccionar a concentração mínima que provoca total retenção de EtBr nas células. Tem, no entanto, que se atender à obrigatoriedade da determinação da viabilidade celular, uma vez que se tem de operar sempre em condições que não interfiram com a viabilidade celular. Adicionalmente, permitirá verificar se determinado inibidor actua ao nível da regulação ou ao nível fisiológico. Não obstante, trata-se de um protocolo trabalhoso que depende do tempo que medeia a lavagem das células e as leituras fluorimétricas no Rotor-Gene 3000™ implicando a posterior manipulação dos resultados.

Independemente da abordagem seguida (acumulação ou efluxo), poder-se-á estabelecer uma rotina de laboratório para o diagnóstico rápido de estirpes multiresistentes por comparação (qualitativa) do seu comportamento por exemplo na presença de 1 µg/mL de EtBr, com a estirpe padrão. A caracterização precoce do efluxo em estirpes clinicamente susceptíveis é importante na medida em que permite ajustar a terapêutica em pacientes sob tratamento e minimizar o desenvolvimento de novas variantes resistentes.

Numa segunda fase procurou-se quantificar a actividade de efluxo em particular do sistema AcrAB-TolC em *E. coli* tendo-se para tal utilizado diferentes estirpes que diferem entre si no grau de actividade deste sistema de efluxo. *E. coli* AG100A que possui este sistema inactivo por inserção do gene *Kan* do transposição Tn903 (Okuso *et al.*, 1996) e *E. coli* AG100 adaptada a 12 µg/mL de

tetraciclina (AG100_{TET}) que apresenta a super expressão de AcrAB-TolC (Viveiros *et al.*, 2005), por comparação com a estirpe padrão *E. coli* AG100 na qual o sistemas AcrAB-TolC se encontra activo e funcional.

Para tal, desenvolveu-se um modelo matemático mecanicista e uma estratégia de dosear o EtBr intracelular.

O modelo desenvolvido resultou de um balanço ao EtBr intracelular e corresponde a um modelo simples e abrangente que não restringe à partida, o tipo de transporte associado ao influxo e efluxo de EtBr, sendo esta uma vantagem. O estudo da dependência da cinética de transporte de EtBr com a concentração de substrato permitiu demonstrar que o influxo de EtBr ocorre por difusão passiva, tal como havíamos postulado inicialmente e que as BE implicadas no transporte activo de EtBr estão saturadas para as concentrações de substrato utilizadas, uma vez que demonstrámos não haver *leaking out* de EtBr. Este comportamento foi consistente para as três estirpes testadas. O modelo descreve bem o comportamento da cinética de transporte de EtBr em *E. coli* ajustando-se bem aos dados experimentais ($R = 0,99$).

A determinação das taxas de influxo permitiu verificar que, apesar das estirpes diferirem, à partida, apenas na actividade de efluxo, pode haver alteração da permeabilidade da membrana o que se traduziu em taxas de influxo diferentes entre AG100A e AG100. De facto, tem sido sugerido a existência de uma ligação entre a permeabilidade (traduzida na expressão das porinas) e actividade de efluxo. Sendo interessante, no futuro, efectuar outro tipo de análise (abordagem genética) no sentido de avaliar a permeabilidade da membrana. Assim, este método e o modelo que o descreve serão no futuro instrumentos úteis na descrição dos fenómenos de transferência ao nível da parede bacteriana.

O modelo desenvolvido permitiu descrever quantitativamente a actividade de efluxo (através da determinação da taxa de efluxo, K), tal como a havíamos interpretado teoricamente, discriminando a actividade de AcrAB-TolC entre estirpes que diferem no seu grau de actividade. Assim, AG100A apresenta uma menor taxa de efluxo face a AG100, evidenciando a inactivação de AcrAB na estirpe mutante. Enquanto AG100_{TET} apresenta uma taxa de efluxo superior à de AG100 (no período após 50 minutos) traduzindo a super expressão deste sistema na estirpe mutante. Para AG100_{TET} o modelo permitiu ainda evidenciar a existência de uma fase *lag* (primeiros 50 minutos), em que praticamente não há actividade de efluxo sendo este, presumivelmente, um período necessário para a indução dos sistemas de efluxo AcrAB ou de outros que tenham o EtBr como substrato e que estão sobre expressos nesta bactéria (Viveiros *et al.*, 2005 e Viveiros *et al.*, 2007). O facto desta estirpe possuir um maior número de BE AcrAB, poderá implicar a necessidade de um período inicial de “latência” (50 minutos) correspondente ao recrutamento energético de modo a induzir estes sistemas de efluxo.

O estudo do nível de expressão de outras BE em AG100_{TET}, será interessante para responder à questão se de facto existem outros transportadores implicados na remoção de EtBr e que nesta fase se encontram super expressos. Adicionalmente, o estudo da eventual existência de mecanismos de degradação de fluorocromo no interior da célula, resultantes da adaptação a concentrações elevadas de EtBr, poderá ser alvo de trabalho futuro.

Um aspecto importante, para o trabalho futuro, será a optimização das condições da estratégia para o doseamento do EtBr intracelular. Um aspecto a melhorar refere-se ao passo de filtração através do estudo de novos filtros que permitam uma maior eficiência na permeação de EtBr e redução dos custos associados a este passo do protocolo. Será ainda interessante efectuar estudos de interacção do fluorocromo com a matriz do filtro no sentido de avaliar a alteração desta molécula.

Durante este período de estágio testaram-se outros filtros (PVDF com 0,22 µm de diâmetro de poro da Roth Rotilabo® (Karlsruhe, Alemanha)) e verificou-se que se comportam, em termos de quantidade de EtBr retida (25 %) do mesmo modo que os filtros utilizados, no entanto custam 1/3 do preço dos anteriores, permitindo a redução de custos.

Em alternativa poder-se-á utilizar uma versão mais sofisticada do Rotor-Gene (Rotor-Gene 6000™) que permite a monitorização da fluorescência, na gama dos UV e visível, no comprimento de onda associado ao EtBr livre, e por conseguinte monitorizar em simultâneo, com canais diferentes, a fluorescência associada ao EtBr ligado a componentes celulares (e.g. ds-DNA) e EtBr livre em solução. Esta abordagem obvia a necessidade de centrifugação e filtração para o doseamento do EtBr intracelular ao mesmo tempo que representa uma abordagem mais directa do processo de transporte.

O desenvolvimento de um modelo mais complexo que contabilize o EtBr no espaço periplasmático e no citoplasma poderá descrever com maior detalhe o fenómeno de efluxo.

A metodologia e o modelo biocinético desenvolvidos neste trabalho irão servir de base para o estabelecimento de um método quantitativo de diagnóstico da resistência mediada por bombas de efluxo em estirpes clínicas com fenótipos de MDR, baseado na comparação das constantes de efluxo destas estirpes com as taxas de efluxo determinadas para as correspondentes estirpes ATCC. Esta abordagem irá permitir a elaboração de uma base dados relativa às taxas de efluxo para as estirpes clínicas e correspondentes estirpes selvagens ATCC e funcionar como um “antibiograma” dirigido para a resistência mediada por BE. A obtenção de um maior conjunto de dados para as ATCC permitirá uma asserção mais robusta acerca dos valores que as constantes tomam. Igualmente espera-se que esta metodologia permita a descoberta de novos substratos e BE e seja a base experimental para a identificação de inibidores de bombas de efluxo de modo a potenciar a actividade dos antibióticos existentes neutralizando a resistência mediada por bombas de efluxo e aumentando a concentração intracelular do antibiótico em organismos resistentes. O potencial terapêutico e microbiológico e a capacidade de restaurar a actividade de uma série de valiosos agentes antimicrobianos considerados de grande valor clínico e cuja actividade se encontra actualmente comprometida devido à resistência mediada pelo efluxo será uma inestimável contribuição para a luta contra as doenças infecciosas microbianas.

5. BIBLIOGRAFIA

- Amaral L.**, Martins, M. e Viveiros, M. (2007). Enhanced killing of intracellular bacteria by compounds that inhibit Mdr efflux pumps: a review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*: **59**: 1237-1246.
- Bailey**, A.M., Webber, M.A. e Piddock, L.J.V. (2006). Medium plays a role in determining expression of *acrB*, *marA*, and *soxS* in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **50**(3): 1071-1074.
- Bambeke**, F. V., Balzi, E. e Tulkens, P.M. (2000). Antibiotic efflux pumps. *Biochemical Pharmacology*. **60**: 476-470.
- Bambeke**, F.V., Pagès, J-M. e Lee, V.J. (2006). Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*. **1**: 157-175.
- Bohnert**, J.A. e Kern, W.V. (2005). Selected arylpiperazines are capable of reversing multidrug resistance in *Escherichia coli* overexpressing RND efflux pumps. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49**(2): 849-852
- Borges-Walmsley**, M. I., Mckeeghan K. S. e Walmsley, A. R. (2003). Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochemical Journal*. **376**: 313-338.
- Caron**, G. N-v., Stephens, P. e Badley, R.A.. (1998). Assessment of bacterial viability status by flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Applied Microbiology*. **84**: 988-998.
- Chaudhuri**, S., Phillips, G.O., Power, D.M. e Davies, J.V. (1975). Interaction of ethidium bromide with heparin. *International Journal of Radiation Biology*. **28**(4): 345-352.
- Cloete**, T.E. (2003). Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*. **51**: 277-282.
- Cooper**, G.M. 2000. The cell – A molecular approach. 2nd edition, ASM Press. Washington, D.C..
- Cristóbal**, R.E., Vincent, P.A. e Salomón, R.A. (2006). Multidrug resistance pump AcrAB-TolC is required for high-level, Tet(A)-mediated tetracycline resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **58**(1): 31-36.

- Davin-Regli, A. e Pagès, J.M.** (2007). Regulation of efflux pumps in Enterobacteriaceae: genetic and chemical effectors em *Antimicrobial Resistance in Bacteria*. Zmabiles-Cuevos editor, C.F., Horizon Bioscience.
- Doglia, S. Graslund, A. e Ehrenberg, A.** (1983). Binding of ethidium bromide to self-complementary deoxydinucleotides. *European Journal of Biochemistry*. **133**: 179-184.
- Edgar, R. e Bibi, E.** (1997). MdfA, an *Escherichia coli* multidrug resistance protein with an extraordinary broad spectrum of drug recognition. *Journal of Bacteriology*. **179**(7): 2274-2280.
- Ghoul, M., Pommepuy, M., Moillo-Batt, A. e Cormier, M.** (1989). Effect of carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone on *Escherichia coli* halotolerance. *Applied and Environmental Microbiology*. **55**(4): 1040-1043.
- Gootz, T.D.** (2006). The forgotten Gram-negative bacilli: what genetic determinants are telling us about the spread of antibiotic resistance. *Biochemical Pharmacology*. **71**: 1073-1084.
- Gugliera, P., Pasca, M.R., Rossi, E., Buroni, S., Arrigo, P., Manina, G. e Riccardi, G.** (2006). Efflux pump genes of the resistance-nodulation-division family in *Burkholderia cenocepacia* genome. *BMC Microbiology*. **6**: 66.
- Hancock, R.E.W.** (1997). The bacterial outer membrane as a drug barrier. *TRENDS in Microbiology*. **5**(1): 37-42.
- Herrera, G., Martinez, A., Blanco, M. e O'Connor, J-E.** (2002). Assessment of *Escherichia coli* B with enhanced permeability to fluorochromes for flow cytometric assays of bacterial cell function. *Cytometry*. **46**:62-69.
- Hirata, T., Saito, A., Nishino, K., Tamura, N. e Yamaguchi, A.** (2004). Effects of efflux transporter genes on susceptibility of *Escherichia coli* to tigecycline. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **48**(6): 2179-2184.
- Hogan, D. e Kolter, R.** (2002). Why are bacteria refractory to antimicrobials? *Current Opinion in Microbiology*. **5**: 472-477.
- Hooper, D. C.** (2005). Efflux Pumps and nosocomial antibiotic resistance: a primer for hospital epidemiologists. *Clinical Infectious Diseases*. **40**: 1811-1817.

- Hsiegh**, P., Siegel, S.A., Rogers, B., Davis, D. e Lewis, K. (1998). Bacteria lacking a multidrug pump: a sensitive tool for drug discovery. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA. **95**: 6602-6606.
- Ihmels**, H. e Otto, D. (2005). Intercalation of organic dye molecules into double-stranded DNA – general principles and recent developments. *Topics in Current Chemistry*. **258**: 161-201.
- Jernaes**, M. W. e Steen, H. B. (1994). Staining of *Escherichia coli* for flow cytometry: influx and efflux of ethidium bromide. *Cytometry*. **17**: 302-309.
- Jones**, I.F. e Mifgley, M. (1985). Expression of a plasmid borne ethidium resistance determinant from *Staphylococcus* in *E. coli*: evidence for an efflux system. *FEBS Microbiology Letters*. **28**: 355-358.
- Jones**, H.E., Holland, I.B., Jacqs,A., Wall, T., e Campbell, A.K. (2003). *Escherichia coli* lacking the AcrAB multidrug efflux pump also lacks nonproteinaceous, PHB–polyphosphate Ca²⁺ channels in the membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1612**: 90– 97.
- Joux**, F. e Lebaron, P. (2000). Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes and Infection*. **2**: 1523–1535.
- Kaatz**, G.W., Seo, S.M., O’Brien, L., .Wahiduzzaman, M. e Foster, T.J. (2000). Evidence for the existence of a multidrug efflux transporter distinct from NorA in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **44**(5): 1404-1406.
- Kaatz**, G. W., Moudgal, V.V., Seo, S. M. e Kristiansen J. E. (2003). Phenothiazines and Thioxanthenes inhibit multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **42**(2): 719-726.
- Kholer**, T., Pechère,J-C. e Plésiat, P. (1999). Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*. **56**: 771-778.
- Kitajima-Ihara**, T. e Yagi, T. (1998). Rotenone-insensitive internal NADH-quinone oxidoreductase of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria: the enzyme expressed in *Escherichia coli* acts as a member of the respiratory chain in the host cells. *FEBS Letters*. **421**: 47-40.
- Kiyachko**, K.A., Schuldiner, S. e Neyfakh, A.A. (1997). Mutations affecting substrate specificity of the *Bacillus subtilis* multidrug transporter Bmr. *Journal of Bacteriology*. **179**(7): 2189-2193.
- Kumar**, A. e Schweizer, H.P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **57**: 1486-1513.

- Kyriacou**, S.V., Brownlow, W.J. e Xu, X-H. N. (2004). Using nanoparticle optics assay for direct observation of the function of antimicrobial agents in single live bacterial cells. *Biochemistry*. **43**: 140-147.
- Lambert**, B. e Pecq, Jean-Bernard. (1984). Effect of mutation, electric membrane potential, and metabolic inhibitors on the accessibility of nucleic acids to ethidium bromide in *Escherichia coli* cells. *Biochemistry*. **23**: 166-176.
- Langton**, K.P., Hendersen, P.J.F. e Herbert, R. (2005). Antibiotic resistance: multidrug efflux proteins, a common transport mechanism? *Natural Products Reports*. **22**: 439-451.
- Lehninger**, A.L., Nelson, D.L. e Cox, M.M. (1993). Principles of Biochemistry. 2nd ed., Worth Publishers. Estados Unidos da América.
- Lewinson**, O., Adler, J., Poelarends, G.J., Mazurkiewicz, P., Driessen, A.J.M. e Bibi, E. (2003). The *Escherichia coli* multidrug transporter MdfA catalyses both electrogenic and electroneutral transport reactions. *Biochemistry*. **100**(4): 1667-1672.
- Liu**, X. e Ferenci, T. (2001). Analysis of multifactorial influences on the transcriptional control of ompF and ompC porin expression under nutrient limitation. *Microbiology*. **147**: 2981-2989.
- Lomovskaya**, O. e Watkins, W.J. (2001a). Efflux pumps: their role in antibacterial drug discovery. *Current Medicinal Chemistry*. **8**:1699-1711.
- Lomovskaya**, O. e Watkins, W.J. (2001b). Inhibition of efflux pumps as a novel approach to combat drug resistance in bacteria. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. **3**(2): 225-236.
- Lomovskaya**, O. e Bostian, K.A. (2006). Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic – a vision for applied use. *Biochemical Pharmacology*. **71**: 910-918.
- Lorch**, M., Leher, I., Basting, D., Pflieger, N., Manolikas, T. e Glaubitz, C. (2005). NMR and fluorescence spectroscopy approaches to secondary and primary active multidrug efflux pumps. *Biochemical Society Transactions*. 33 parte4: 873-877.
- Low**, D.E., Kellner, J.D. e Wright, G.D. (1999). Superbugs: how they evolve and minimize the cost of resistance. *Current Infectious Disease Reports*. **1**: 464-469.
- Lynch**, A.S. (2006). Efflux systems in bacterial pathogens: an opportunity for therapeutic intervention? An industry view. *Biochemical Pharmacology*. **71**: 949-956.

- Markham**, P.N., Esthaus, E., Klyachko, K., Johnson, M.E. e Neyfakh, A.A. (1999). Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **43**(10): 2404-2408.
- Marquez**, B. (2005). Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie*. **87**:1137-1147.
- Martins**, M., Santos, B., Viveiros, M., Pagès, J.M., Molnar, J., Fanning, S. Cruz, A. e Amaral, L. (2006). An instrument-free method for precise demonstration of efflux pump activity of bacteria. *In vivo*. **20**: 657-664.
- Masterton**, R. (2003). *Antibiotic resistance to nosocomial infections. A Quick Guide to Antibiotic Resistance*. Ayrshire and Arran Acute Hospitals NHS Trust, Irvine, Ayrshire, UK. Acedido em Junho, 2006, em: http://www.infectionacademy.org/downloads/AIM_quick_guide_to_antibiotic_resistance_Feb10a.pdf#search=%22quick%20guide%20to%20antibiotic%20resistance%22.
- McDonnell**, G. e Russel, A.D. (1999). Antiseptics and Disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. **12**(1): 147-179.
- Mckeegan**, K. S., Borges-Walmsley, M. I. e Walmsley, A.R. (2002). Microbial and viral drug resistance mechanisms. *Microbiology*. **10**(10): S8-S14.
- Mckeegan**, K. S., Borges-Walmsley, M. I. e Walmsley, A.R. (2003). The structure and function of drug pumps: an update. *TRENDS in Microbiology*. **11**(1): 21-29.
- Mckeegan**, K. S., Borges-Walmsley, M. I. e Walmsley, A.R. (2004). *Current Opinion in Pharmacology*. **4**: 479-486.
- Midgley**, M. (1986). The Phosphonium ion efflux system of *Escherichia coli*: relationship to the ethidium efflux system and energetic studies. *Journal of General Microbiology*. **132**: 3187-3193.
- Midgley**, M. (1987). An efflux system for cationic dyes and related compounds in *E. coli*. *Microbiology Science*. **4**: 125-128.
- Miles**, B. (2003). *Inhibitors & Uncouplers*. Em: <http://www.tamu.edu/classes/bich/bmiles/lectures/uncoupler.pdf#search=%22Inhibitors%20%26%20Uncouplers%22>. Acedido em Setembro, 2006.

- Molloy**, M.P., Herbert, B.R., Slade, M.B., Rabilloud, T., Nouwens, A., Williams, K.L. e Gooley, A.A. (2000). Proteomic analysis of *Escherichia coli* outer membrane. *European Journal of Biochemistry*. **267**: 2871-2881.
- Murakami**, S. Nakashima R., Yamashita, E. e Yamaguchi, A. (2002). Crystal structure of bacterial multidrug transporter AcrB. *Nature*. **419**: 585-593.
- Neyfakh**, A.A., Bibdenko, V.E. e L.B. Chen (1991). Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. **88**: 4781-4785.
- Nikaido**, H. (1994). Preventing drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science*. **264**: 382-387.
- Nikaido**, H. (1998). The role of outer membrane and efflux pumps in the resistance of gram-negative bacteria. Can we improve drug access? *Drug resistance uptakes*. **1**: 93-98.
- Nikaido**, H. (2001). Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Cell & Developmental Biology*. **12**: 215-223.
- Nikaido**, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **67**(4): 593-656.
- Nordmeier**, E. (1992). Absorption spectrometry and dynamic and static light-scattering studies of ethidium bromide binding to calf thymus DNA: implications for outside binding and intercalation. *Journal of Physical Chemistry*. **96**: 6045-6055.
- Ocakatan**, A. Yoneyama, H. e Nakaes, T. (1997). Use of fluorescence probes to monitor function of the subunit proteins of the MexA-MexB-OprM drug extrusion machinery in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Biochemical Chemistry*. **272**(35): 21964-21969.
- Okuso**, H., Ma, D. e Nikaido, H. (1996). AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *Journal of Bacteriology*. **178**: 306-308.
- Operator Manual** Rotor-GeneTM3000 Real time thermal cycler. (2004). Copyright, Corbett Research.
- Ordway**, D., Viveiros, M., Leandro, C., Bettencourt, R., Almeida, J., Martins, M., Kristiansen, J. E., Molnar, J. e Amaral, L. (2003). Clinical concentrations of thioridazine kill intracellular

- multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **47(3)**: 917-922.
- Pagès**, J-M, Masi, M. e Barbe, J. (2005). Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. *TRENDS in Microbiology*. **11(8)**: 382-389.
- Paixão**, L. (2006). *Estudo do efluxo de compostos através da parede de Escherichia coli por quantificação de substâncias fluorescentes*. Tese de estágio curricular em Engenharia Biológica. Instituto Superior Técnico - Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa.
- Pallasch**, T.J. (2003). Antibiotic resistance. *The dental Clinics of North America*. **47**: 623-639.
- Palmer**, M. (2003). Efflux of cytoplasmically acting antibiotics from Gram-negative bacteria: periplasmic substrate capture by multicomponent efflux pumps inferred from their cooperative action with single-component transporters. *Journal of Bacteriology*. **185(17)**: 5287-5289.
- Paterson**, D.L. (2006). Resistance in Gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *The American Journal of Medicine*. **119(6S)**: S20-S28.
- Paulsen**, I. T., Brown, M. H. e Skurray, R. A. (1996). Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiological Reviews*. **60(4)**: 575-608.
- Paulsen**, I. T. (2003). Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Current Opinion in Microbiology*. **6**: 446-451.
- Pena**, O.A.S., Mattos, L. e Restrepo, A. (2002). Resistencia bacteriana. *Revista Universitas Médica*. **43(1)**. Em: http://www.imbiomed.com/1/1/articulos.php?id_revista=97&id_ejemplar=4486, acedido em Agosto, 2007.
- Piddock**, L.J.V., Jin, Y.-F., Ricci, V. e Asuquo, A.E. (1999). Quinolone accumulation by *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **43**: 61-70.
- Piddock**, L. J. V. (2006a). Clinically relevant bacterial chromosomally encoded multi-drug resistance efflux pumps. *Clinical Microbiology Reviews*. **19(2)**: 382-402.
- Piddock**, L.J.V. (2006b). Multidrug-resistance efflux pumps – not just for resistance. *Nature reviews. Microbiology*. **4**: 629-636.
- Plésiat**, P. (2006). Role of the efflux pumps in antimicrobial resistance in *E. coli*. Teaching Hospital Jean Minjot, Besançon, France. Acedido em Setembro, 2006 em:

http://www.unil.ch/webdav/site/cnfmi/shared/abstracts_and_lectures/R14.pdf#search=%22role%20of%20the%20efflux%20pumps%20in%20antimicrobial%20resistance%20in%20e.%20coli%22.

- Poole, K.** (2002). Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. **92**: 55S-64S.
- Poole, K.** (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **56**: 20-51.
- Poole, K. E Lomovskaya, O.** (2006). Can efflux inhibitors really counter resistance? *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*. **3**(2): 145-152.
- Poole, K.** (2007). Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of Medicine*. **39**: 162-176.
- Powell, W.J.** (2000). Molecular mechanisms of antimicrobial resistance. Agri-food Risk Management and Communications Project. Technical Report 14. Acedido em Junho, 2006, em: <http://www.foodsafetynetwork.ca/animal/ab-res-ppr-wjp.htm>.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. e Klein, D.A.** (1999). Microbiology. Edição Internacional. 4th ed., McGraw-Hill. Estados Unidos da América.
- Raherison, S., Gonzalez, P., Renaudin, H., Charron, A., Bébéar, C. e Bébéar, C.M.** (2002). Evidence of active efflux in resistance to ciprofloxacin and to ethidium bromide by *Mycoplasma hominis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **46**(3): 672-679.
- Rice, L. B.** (2006). Unmet medical needs in antibacterial therapy. *Biochemical Pharmacology*. **71**: 991-995.
- Riondet, C., Cachon, R., Waché, Y., Alcaraz, G. e Diviés, C.** (1999). Changes in the proton-motive force in *Escherichia coli* in response to external oxidoreduction potential. *European Journal of Biochemistry*. **262**: 595-599.
- Saier, M.H.J., Paulsen, I.T., Sliwinski, M. K., Pao, S.S., Skurray, R.A. e Nikaido, H.** (1998). Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. *The FASEB Journal*. **12**: 265-274.
- Schumacher, A., Steinke, P., Bohnert, J.A., Akova, M. Jonas, D. e Kern, W.V.** (2006). Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug

- susceptibility in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* than *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **57**: 344-348.
- Silva**, T.L., Reis, A., Hewitt, C. e Roseiro, J.C. (2004). Citometria de fluxo – funcionalidade celular *online* em bioprocessos. *Boletim de Biotecnologia*. **77**: 32-40.
- Stahl**, C., Kubetzko S. , Kaps, I. Seber, S. Engelhardt, H. e Niederweis, M. (2001). MspA provides the main hydrophilic pathway through the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Molecular Microbiology*. **40**:451-462
- Stephan**, J., Mailaender, C., Etienne, G., Dafflé, M. e Niederweis, M. (2004). Multidrug resistance of a porin deletion mutant of *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **48**(11): 4163-4170.
- Stewart**, P.S. e Costerton, J.W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*. **358**: 135-138.
- Stratton**, C. (2002). Emphasis on efflux CME. 42nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Diego, California, 27 – 30 Setembro. Acedido em Agosto, 2006, em: <http://www.medscape.com/viewarticle/443387>
- Tenover**, F. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*. **119**(6A): S3-S10.
- Thorrold**, C.A., Letsoalo, M.E., Dusé, A.G. e Marais, E., (2007). Efflux pump activity in fluoroquinolone and tetracycline resistant *Salmonella* and *E. coli* implicated in reduced susceptibility to household antimicrobial cleaning agents. *International Journal of Food Microbiology*. **113**(3): 315-320.
- Turner**, R.J., Taylor, D.E. e Weiner, J.H. (1997). Expression of *Escherichia coli* TehA gives resistance to antiseptics and disinfectants similar to that conferred by multidrug resistance efflux pumps. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **41**(2): 440-444.
- Vardevanyan**, P.O., Antonyan, A.P., Parsadaniyan, M.A., Davtyan, H.G. e Karapetyan, A.T. (2003). The binding of ethidium bromide with DNA: interaction with single- and double- stranded structures. *Experimental and Molecular Medicine*. **35**(6): 527-533.
- Viveiros**, M., Jesus, A., Brito, M., Leandro, C., Martins, M., Ordway, D., Molnar, A.M., Molnar, J. e Amaral, L. (2005). Inducement and reversal of tetracycline resistance in *Escherichia coli* K-12

- and expression of proton gradient-dependent multidrug efflux pump genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49**(8): 3578-3582.
- Viveiros**, M., Dupont, M., Rodrigues, L., Couto, I., Davin-Regli, A., Pagès, J.-M. e Amaral, L. (2007). Antibiotic Stress, Genetic Response and Altered Permeability of *E. coli*. *PLoS ONE* **2**(4): e365. doi:10.1371/journal.pone.0000365.
- Vordwier**, S., Wagner, D. e Kern, W.V. (2005). Increased accumulation of EtBr in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium smegmatis* by flupentixol and thioridazine: effects on efflux pumps. 45th Interscience Conference for Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington, 16-19 Dezembro.
- Walsh**, C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*. **406**: 775-781.
- Webber**, M.A. e Piddock, L.J.V. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **51**: 9-11.
- Xu**, X.-H., N.X., Wan, Q., Kyriacou, S.V., Brownlow, W.J. e Nowak, M.E. (2003a). Direct observation of substrate induction of resistance mechanism in *Pseudomonas aeruginosa* using single live cell imaging. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **305**: 941-949.
- Xu**, X.-H., Brownlow, W., Huang, S. e Chen, J. (2003b). Single-molecule detection of efflux pump machinery in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical and Biophysical Communications*. **305**: 79-86.
- Xu**, X.-H., N.X., Brownlow, W.J., Kyriacou, S.V., Wan, Q. e Viola, J.J. (2004). Real-time probing of membrane transport in living microbial cells using single nanoparticle optics and living cell imaging. *Biochemistry*. **43**: 10400-10413.
- Yerushalmi**, H., Lebediker, M. e Schuldiner, S. (1995). Emr, an *Escherichia coli* 12-KDa multidrug transporter, exchanges toxic cations and H⁺ and is soluble in organic solvents. *Journal of Biological Chemistry*. **270**: 6856-6863.
- Yu**, E. W., Aires, J. R., e Nikaido, H. (2003). AcrB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*: composite substrate-binding cavity of exceptional flexibility generates its extremely wide substrate specificity. *Journal of Bacteriology*. **185**(19): 5657-5664.

Sites Consultados

<http://www.universityofcalifornia.edu/everyday/agriculture/ecoli.html>. Acedido em Setembro, 2007.

<http://www.canariculturacolor.com/imagenes/enfermedades/colibacilosis-canarios.jpg>. Acedido em Setembro, 2007

<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4a.html>. Acedido em Agosto, 2007.

http://www.corbettlifescience.com/shared/rotor-gene%203000/product%20info/RotorGene_brochure.pdf, Acedido em Agosto, 2007.

<http://www.madsci.org/posts/archives/feb99/919869466.Mb.1.jpg> Acedido em Agosto, 2007.