

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS
Centro de Biotecnologia do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**RELAÇÃO ENTRE O MECANISMO DE EFLUXO E A RESISTÊNCIA AOS
ANTIMICOBACTERIANOS EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Mycobacterium
tuberculosis***

Tese de Doutorado
Tatiane Silveira Coelho

Porto Alegre
Maio/2015

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS
Centro de Biotecnologia do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**RELAÇÃO ENTRE O MECANISMO DE EFLUXO E A RESISTÊNCIA AOS
ANTIMICOBACTERIANOS EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Mycobacterium
tuberculosis***

Tatiane Silveira Coelho

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Maria Lucia Rosa Rossetti

Co-orientador: Dr. Pedro Eduardo Almeida da Silva (FURG)

Porto Alegre

Maio/2015

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi realizado em três Instituições:

- 1) Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT) - Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS).
- 2) Laboratório de Micobacteriologia, Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica (NUPEMM), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), (Brasil)
- 3) Grupo de Micobactérias, Unidade de Microbiologia Médica - no Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Universidade Nova de Lisboa (UNL), Lisboa-Portugal proveniente da bolsa de Doutorado Sanduíche (CAPES).

Fontes Financiadoras:

- 1) FAPERGS (Brasil)
- 2) IHMT (Portugal)
- 3) CAPES (Brasil) - (Bolsa de Doutorado).
- 4) Parcialmente apoiado pelo projeto PTDC/BIA-CMI/121859/2010 intitulado "NADH-menaquinona desidrogenase do tipo II (NDH-2) e a cadeia respiratória de *Mycobacterium tuberculosis*: novos alvos terapêuticos no combate à tuberculose" da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) de Portugal.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dr^a Maria Lucia Rossetti, pela oportunidade em me aceitar como sua aluna e poder desenvolver este trabalho inserida no conceituado Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular. Agradeço o carinho e a atenção que teve por mim.

Ao meu co-orientador, Dr. Pedro Almeida da Silva, minha eterna gratidão pelo seu apoio, ensinamentos, orientação, incentivo e paciência. Obrigada por ter contribuído ativamente na minha formação e no meu conhecimento.

Ao meu co-orientador no exterior, Dr. Miguel Viveiros, pela parceria e generosidade em me receber em seu laboratório e proporcionar suporte para o desenvolvimento desta tese.

Aos professores da comissão de acompanhamento, Arnaldo Zaha e Marilene Vainstein, pela colaboração neste trabalho.

Aos secretários do PPGBCM, Luciano e Silvia, que sempre estavam dispostos a me ajudar e a responder todas as minhas dúvidas. Muito obrigada!

À professora Dr^a Andrea von Groll pela sua atenção e disponibilidade sempre quando entrava em sua sala cheia de dúvidas e vontade de discutir resultados. Obrigada!

Aos meus queridos colegas de laboratório do CDCT, Regina, Fernanda Spies, Leonardo, Raquel, Maiara, Taiane, Laura e Cíntia, pela ajuda e pelos momentos de descontração. E as amigas de todos os momentos, Karen e Mariana, que participaram de toda minha trajetória com o conforto da amizade e do incentivo.

Às incríveis amigas e colegas do laboratório da FURG, Ivy, Daniela, Clarice, Fernanda, Júlia, Priscila, Jéssica, Jaciara, Lisiane e Ana. Obrigada pelo companheirismo e pela amizade de vocês.

Às minhas queridas amigas Susan, Maíra e Larissa simplesmente admiráveis. Agradeço o apoio nos momentos difíceis que tive que superar.

Ao meu namorado, pela atenção e paciência nos momentos que estive ausente.

À minha família maravilhosa que são os alicerces da minha vida, por todo amor, pelas palavras de apoio, incentivo e por estarem distantes mas ao mesmo tempo muito pertos quando eu viajei para realizar o Doutorado Sanduíche. Muito obrigada, eu não teria forças sem vocês ao meu lado!

A todos que de alguma forma fizeram parte da minha vida e me ajudaram para a realização desta tese.

MUITO OBRIGADA.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	7
Lista de Figuras	9
Lista de Tabelas	11
Resumo.....	12
Abstract.....	13
1) INTRODUÇÃO	14
1.1) O agente etiológico da tuberculose	14
1.2) Patogênese da tuberculose.....	16
1.3) Situação atual da tuberculose	18
1.4) Tratamento	21
1.5) Resistência aos fármacos.....	24
1.5.1) Fármacos do esquema básico: mecanismos de ação e de resistência.....	26
1.5.1.1) Isoniazida	26
1.5.1.2) Rifampicina.....	28
1.5.1.3) Pirazinamida	29
1.5.1.4) Etambutol.....	30
1.5.2) Fármacos do esquema de multirresistência: mecanismo de ação e de resistência	31
1.5.2.1) Aminoglicosídeos e peptídeos cíclicos	31
1.5.2.2) Fluoroquinolonas	32
1.5.2.3) PAS.....	34
1.5.2.4) Etionamida.....	35
1.5.2.5) Cicloserina	35
1.5.2.6) Linezolida	35
1.5.2.7) Clofazimina.....	36
1.6) Novos fármacos.....	37
1.6.1) Bedaquilina (TMC207).....	37
1.6.2) Delamanida	39
1.6.3) PA-824	39
1.6.4) SQ-109	40
1.7) Sistema de efluxo como mecanismo envolvido na resistência	41

1.7.1) Inibidores de bombas de efluxo (EPIs)	44
1.7.2) Abordagens para métodos utilizados na detecção do efluxo.....	46
1.8) Ensaios de combinação antimicrobiana <i>in vitro</i>	47
1.8.1) Ensaio de <i>Cheackerboard</i>	48
1.9) Métodos utilizados para testes de sensibilidade aos fármacos	49
1.9.1) Métodos clássicos	50
1.9.2) Métodos semi-automatizados.....	51
1.9.2.1) Sistema BACTEC 460 TB.....	51
1.9.2.2) BACTEC™ MGIT™	51
2. OBJETIVOS	52
2.1. Geral	52
2.2. Específicos	53
3. RESULTADOS: CAPÍTULO I.....	53
Enhancement of antibiotic activity by efflux inhibitors against multidrug resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> clinical isolates from Brazil.....	54
4. RESULTADOS: CAPÍTULO II.....	67
Synergy among efflux and canonic mutations to determine drug resistance in <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	67
5. DISCUSSÃO GERAL	86
6. CONCLUSÕES.....	92
7. PERSPECTIVAS.....	93
8. REFERÊNCIAS.....	93
CURRICULUM VITAE RESUMIDO	118

Lista de Abreviaturas

ABC-ATP	<i>ATP binding cassette</i>
AMK	Amicacina
BAAR	Bacilo álcool-ácido-resistente
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BrEt	Brometo de etídio
CAP	Capreomicina
CIP	Ciprofloxacina
CMI	Concentração mínima inibitória
DST	<i>Drug sensibility test</i>
EMB	Etambutol
EPI	<i>Efflux pump inhibitor</i>
ETH	Etionamida
FICI	<i>Fractional inhibitory concentration index</i>
FQ	Fluoroquinolonas
GAT	Gatifloxacina
GU	<i>Growth units</i>
HIV/AIDS	Vírus da imunodeficiência humana/síndrome da imunodeficiência adquirida
INH	Isoniazida
KAN	Canamicina
LEV	Levofloxacina
LJ	<i>Lowenstein Jensen</i>
LNZ	Linezolida
MATE	<i>Multidrug toxic compound extrusion</i>
MDR	Multidroga-resistente
MFS	<i>Major facilitator superfamily</i>
MGIT	<i>Mycobacterial growth indicator tube</i>
MOTT	Micobactérias outras que não o <i>M. tuberculosis</i>
MOX	Moxifloxacina
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleotideo reduzida
NADP	Fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleotideo

CMI	Concentração mínima inibitória
OFX	Ofloxacina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAS	Ácido para-amino-salicílico
PNCT	Programa Nacional de Controle da Tuberculose
PPD	<i>Purified protein derivative</i>
PZA	Pirazinamida
QRDR	<i>Quinolone resistance-determining region</i>
RIF	Rifampicina
RND	<i>Resistance nodulation-cell division</i>
SMR	<i>Small multidrug resistance</i>
STR	Estreptomicina
TB	Tuberculose
TB-MDR	Tuberculose multidroga resistente
TB-XDR	Tuberculose extensivamente resistente
TDO	Tratamento diretamente observado
TTD	<i>Time to detection</i>

Lista de Figuras

Introdução

Figura 1: Clássico granuloma tuberculoso com um centro caseoso que pode ser encontrado em pacientes infectados ativa ou latentemente. O bacilo pode ser encontrado dentro ou fora do macrófago.	18
Figura 2: Taxa da incidência de TB em 2013 (WHO, 2014).	19
Figura 3: Percentual de novos casos de TB com TB-MDR (WHO, 2014).	19
Figura 4: Países com notificações de pelo menos um caso de TB-XDR em 2012 (WHO, 2013).	20
Figura 5: Estrutura esquemática da parede celular micobacteriana	24
Figura 6: Estrutura molecular da INH	27
Figura 7: Estrutura molecular da RIF	29
Figura 8: Estrutura molecular da PZA.....	30
Figura 9: Estrutura molecular do EMB	30
Figura 10: Estrutura molecular dos aminoglicosídeos (STR, AMK e KAN) e peptídeos cíclicos (CAP e Viomicina).....	31
Figura 11: Fluoroquinolonas ativas contra <i>M. tuberculosis</i>	34
Figura 12: Estrutura molecular do ácido para-aminosalicílico.....	34
Figura 13: Estrutura da etionamida	35
Figura 14: Estrutura da cicloserina.....	35
Figura 15: Estrutura molecular da Linezolida	36
Figura 16: Estrutura da clofazimina	37
Figura 17: Estrutura da bedaquilina.....	38
Figura 18: Estrutura da delamanida.....	39
Figura 19: Estrutura do PA-824.....	40
Figura 20: Estrutura do SQ-109.....	40
Figura 21: Estrutura dos compostos com atividade de inibidor de efluxo em micobactérias.	46
Figura 22: Ensaio de <i>checkerboard</i> . A ilustração é a combinação de dois agentes antimicrobianos em diluição seriada. À esquerda os isobogramas de efeito indiferente, sinérgico e antagônico. A área escura à direita indica o crescimento bacteriano.....	49

Resultados

Capítulo I

Enhancement of antibiotic activity by efflux inhibitors against multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil

Figure 1: Synergic effect of the combination of amikacin, rifampicin, isoniazid, ofloxacin and ethidium bromide, plus verapamil.....61

Figure 2: Effect of the efflux inhibitors on the accumulation (A) and efflux (B) of ethidium bromide at 0.5 µg/mL by *M. tuberculosis* FURG-5.....62

Figure 3: Quantification of the mRNA transcriptional levels (n-fold) for the efflux pump genes in strain FURG-1.....63

Capítulo II

Synergy among efflux and canonic mutations to determine drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*

Figure 1: Illustration of the criteria used for interpretation of results of susceptibility in the presence of EPIs determined using MGIT 960 instrumentation equipped with the EpiCenter TB eXiST software.....75

1	Lista de Tabelas	
2		
3	Introdução	
4		
5	Tabela 1: Grupo de fármacos disponíveis para o tratamento da TB.....	23
6	Tabela 2: Fármacos do esquema básico e de multirresistência com respectivos CMIs para	
7	linhagens sensíveis, genes alvos e seus produtos.....	26
8	Tabela 3: Fármacos em desenvolvimento pré-clínico e clínico para o tratamento da TB..	37
9		
10	Resultados	
11	Capítulo I	
12	Enhancement of antibiotic activity by efflux inhibitors against multidrug resistant	
13	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> clinical isolates from Brazil	
14		
15	Table 1: Phenotypic and genotypic characterization of the <i>M. tuberculosis</i> strains.....	57
16	Table 2: Primers used in this study.....	59
17	Table 3: Minimum inhibitory concentrations of the antibiotics, efflux inhibitors, and	
18	ethidium bromide for the <i>M. tuberculosis</i> strains.....	60
19	Table 4: Minimum inhibitory concentration, fractional inhibitory concentration, and	
20	modulation factor of antibiotics and ethidium bromide in the presence of efflux	
21	inhibitors for the <i>M. tuberculosis</i> strains.....	60
22	Table 5: Relative final fluorescence (RFF) based on accumulation of EtBr.....	62
23	Table 6: Relative quantification of efflux pump gene mRNA quantity in the <i>M.</i>	
24	<i>tuberculosis</i> strains exposed to antibiotics.....	63
25		
26	Capítulo II	
27	Synergy among efflux and canonic mutations to determine drug resistance in	
28	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
29		
30	Table 1: Antibiotic concentrations (µg/mL) used for DST in BACTEC MGIT.....	72
31	Table 2: MICs values obtained by BACTEC MGIT system in <i>M. tuberculosis</i> resistants	
32	clinical isolates and reference strain H ₃₇ Rv.....	74
33	Table 3: Antibiotic sub inhibitory concentrations used to evaluate EPIs synergism.....	74
34	Table 4: Susceptibility profile of the strains in presence of drug plus inhibitor.....	76

1 **Resumo**

2
3 O tratamento com antimicrobianos é a principal estratégia de controle da tuberculose (TB).
4 Entretanto, o aumento do número de casos de TB com cepas de *Mycobacterium*
5 *tuberculosis* resistente aos antimicrobianos cria um cenário que dificulta a cura do paciente
6 e o controle da doença. Embora várias mutações em *loci* específicos tenham sido
7 identificadas como base de resistência, outros mecanismos, como o sistema de efluxo,
8 podem contribuir para a resistência e o estabelecimento dessas mutações. O objetivo deste
9 estudo foi avaliar a contribuição do mecanismo de efluxo em isolados clínicos de *M.*
10 *tuberculosis* resistentes aos principais antimicrobianos do esquema básico (isoniazida,
11 INH; e rifampicina, RIF) e de multirresistência (ofloxacina, OFX; e amicacina, AMK).
12 Três clássicos inibidores de bombas de efluxo - EPI - (verapamil, VP; tioridazina, TZ; e
13 clorpromazina, CPZ) foram selecionados para detectar o efluxo. Primeiramente, foram
14 analisadas três cepas MDR, duas pré-XDR e a cepa sensível de referência H37Rv. Foi
15 utilizada a metodologia de *checkerboard* combinada com o *tetrazolium microplate-based*
16 *assay* para analisar a interação entre os EPIs com os fármacos. Foi observado que os EPIs
17 diminuem efetivamente a resistência aos antibióticos utilizados, com reduções de 4 a 64
18 vezes. Para avaliar a atividade do efluxo em tempo real foi utilizado o método
19 fluorimétrico com o brometo de etídio (BrEt), em presença dos EPIs. Foi demonstrado que
20 todas as cepas apresentaram efluxo intrínseco, porém a acumulação e o efluxo do BrEt foi
21 mais evidente na cepa pré-XDR com resistência adicional a AMK. A quantificação
22 transcricional do RNAm dos genes de bombas de efluxo (*mmp17*, *mmr*, Rv1258, *p55*, *efpA*,
23 Rv2459) e do regulador transcricional *whib7*, quando as cepas foram expostas às
24 concentrações subinibitórias dos antibióticos, foi analisada por RT-qPCR. Houve um
25 aumento do nível transcricional de todos os genes em uma cepa MDR e na cepa Pré-XDR
26 com resistência adicional a OFX, quando expostas a pelo menos um dos fármacos
27 envolvidos na resistência. Porém, não houve correlação entre a redução dos níveis de
28 resistência dos antibióticos com os EPIs e a expressão de genes que codificam as bombas.
29 Finalmente, para demonstrar o tempo de detecção do crescimento bacteriano em ambiente
30 com antimicrobiano em presença e ausência de EPI foi utilizado o sistema BACTEC™
31 MGIT™ 960 e o Epicenter V5.53A equipado com o *software* TB eXiST. Foram utilizadas
32 as cepas MDR, a cepa Pré-XDR com resistência adicional a AMK e uma cepa
33 monorresistente a OFX. Em geral, as cepas cresceram mais lentamente em presença de VP,
34 TZ e/ou CPZ quando combinados com INH ou RIF. Isto sugere que o efluxo é importante
35 para a cepa crescer mais rápido na presença de determinados antimicrobianos. Além disso,
36 o efluxo pode atuar sinergicamente com a presença de mutações, a fim de reduzir o custo
37 biológico da bactéria e promover o crescimento em altas concentrações dos antibióticos.
38 Em conclusão, os resultados descritos demonstraram que o efluxo apresenta um importante
39 papel na resistência aos antimicrobianos utilizados no tratamento da TB e que o uso de
40 inibidores de efluxo pode potencializar a atividade antimicrobiana.

41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

1 **Abstract**

2
3 Treatment with antimicrobials is the main TB control strategy. However, the increase in
4 the number of TB cases with *Mycobacterium tuberculosis* strains resistant to antimicrobial
5 creates a scenario that hinders patient's healing and disease control. Although several
6 genetic mutations in specific loci involved in drug resistance have been identified as base
7 of resistance, other mechanisms such as efflux system may contribute to resistance and to
8 the establishment of these mutations. The main goal of this study was to assess the overall
9 contribution of efflux mechanism in *M. tuberculosis* clinical isolates resistant to the main
10 first line drugs (isoniazid, INH; and rifampicin, RIF) and second line (ofloxacin, OFX; and
11 amikacin, AMK). Three classical inhibitors of efflux pumps -EPI- (verapamil, VP;
12 thioridazine, TZ; and chlorpromazine, CPZ) were selected to detect the efflux. Firstly, we
13 analyzed three MDR strains, two Pre-XDR and an H37Rv reference susceptible strain. We
14 used the checkerboard method combined with the tetrazolium microplate-based assay to
15 analyze the interaction between EPIs and drugs. It was observed that EPIs effectively
16 reduce the MIC of antibiotics, with four-fold to 64-fold reduction. Efflux activity was
17 evaluated in real-time by fluorimetric method with ethidium bromide (EtBr), in the
18 presence of EPIs. All strains showed intrinsic efflux, however the accumulation and efflux
19 of EtBr was evident most in the pre-XDR strain with additional resistance to AMK. The
20 quantification of mRNA transcriptional level of efflux pump genes (*mmp17*, *mmr*, Rv1258,
21 *p55*, *effA*, Rv2459) and the transcriptional regulator, *whib7*, when strains were exposed to
22 antibiotics subinibitory concentrations was examined by RT-qPCR. There was an increase
23 in the transcriptional level of all genes in a MDR strain and pre-XDR strain with additional
24 OFX resistance, when exposed to at least one of the drugs involved in resistance, INH, RIF
25 or OFX. However, there was no correlation between the reduction of antibiotic resistance
26 levels with the EPI and the expression of genes encoding the pumps. Finally, in order to
27 demonstrate the time to detection (TTD) of the bacterial growth in the antimicrobial
28 environment in presence and absence of EPI, were applied BACTEC™ MGIT™ system
29 960 and Epicenter V5.53A equipped with software TB eXiST. Were used the MDR strains,
30 a pre-XDR strain with additional resistance to AMK, and a monoresistant to OFX strain.
31 In general, strains have showed a slower grew in the presence of VP, TZ and/or CPZ when
32 combined with INH or RIF. This suggests that efflux is essential for the strain to grow
33 faster in the presence of certain antibiotics. In addition, the efflux can act synergistically
34 with the presence of mutations in order to reduce the biological cost of the bacteria and
35 promoting growth at high drug concentrations. In conclusion, the described results
36 demonstrated that the efflux system plays an important role in resistance to antibiotics used
37 in the treatment of TB, and that the use of efflux inhibitors may potentiate the
38 antimicrobial activity.

1) INTRODUÇÃO

1.1) O agente etiológico da tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença antiga e está entre as infecções microbianas mais mortais da humanidade (DANIEL, 2006). O agente etiológico da TB, *Mycobacterium tuberculosis*, é um patógeno de humanos e em alguns casos de animais. A histórica associação da TB com o homem é apoiada por evidências morfológicas em fósseis humanos. Embora a infecção pelo bacilo seja mais comum nos pulmões, pode ocorrer em praticamente qualquer parte do corpo. No caso de infecção da coluna vertebral, há destruição dos discos intervertebrais e, que, nos casos mais graves, leva ao colapso vertebral. Tais alterações anatômicas investigadas mais intensivamente em múmias egípcias fornecem a hipótese de uma possível TB, evidenciando a milenar existência do bacilo. Estima-se que até 25% dos egípcios mumificados possam ter desenvolvido a doença (GALAGAN, 2014).

A baixa taxa de mutação do *M. tuberculosis* em conjunto com as inovadoras técnicas de genética molecular tem auxiliado uma estimativa mais rigorosa da origem do bacilo. Acredita-se que as micobactérias são melhor preservadas devido à resistente parede celular e a alta estabilidade do DNA, consequência das elevadas proporções de guanina e citosina (60 a 70%) (LEÃO & PORTAELS, 2007). Além disso, o sequenciamento do genoma do *M. tuberculosis* foi um avanço para posteriores técnicas de biologia molecular na identificação do DNA micobacteriano (NERLICH & LOSCH, 2009).

Provavelmente, o ancestral inicial de *M. tuberculosis* tenha co-evoluído com os primeiros hominídeos da África Ocidental, há cerca de 3 milhões de anos (DANIEL, 2006; GUTIERREZ, 2005). No entanto, sugere-se que os representantes mais modernos do complexo *M. tuberculosis* (incluindo *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii* e *M. bovis*) tiveram um ancestral comum africano há cerca de 70.000 anos e provavelmente tenha se espalhado com a migração humana para fora da África (BROSCH *et al.*, 2002; GUTIERREZ, 2005; COMAS *et al.*, 2013).

M. tuberculosis foi identificado e isolado pela primeira vez em 1882 por Robert Koch (KAUFMANN & SCHAIBLE, 2005). Em 1890, no 10º Congresso Internacional de Medicina (Berlim), Koch anunciou a descoberta de um composto capaz de inibir o crescimento do *M. tuberculosis* em cobaias, denominado tuberculina. O produto final era obtido através de um preparado de extrato de glicerol e cultura líquida do bacilo, que

1 prontamente foi avaliado como uma vacina terapêutica. No entanto, posteriormente, Koch
2 descreveu que a tuberculina não agia diretamente no bacilo, mas estimulava as células do
3 hospedeiro. Então, em 1891, Koch descreveu a preparação e a purificação parcial da
4 tuberculina, servindo como a primeira descrição da produção do derivado de proteína
5 purificada (PPD), teste utilizado como método diagnóstico para identificar pacientes com
6 infecção latente (KAUFMANN & SCHAIBLE, 2005).

7 *M. tuberculosis* pertence a família Mycobacteriaceae, ordem Actinomycetales e ao filo
8 Actinobacteria (STACKEBRANDT *et al.*, 1997). Cerca de 130 espécies descritas no
9 gênero são saprófitas ambientais, entretanto algumas micobactérias evoluíram para serem
10 patógenos importantes na área clínica (BOTTAI *et al.*, 2014). *M. tuberculosis* é membro
11 do complexo *M. tuberculosis*, que inclui *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M.*
12 *canetti*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. mungi* e *M. caprae* (ALEXANDER *et al.* 2010). São
13 caracterizadas por 99,9% de identidade a nível de DNA e possuem sequências idênticas de
14 rRNA 16S, mas apresentam diferenças com relação ao tropismo para diferentes
15 hospedeiros, a resistência antibiótica, o fenótipo e a patogenicidade (BODDINGHAUS *et*
16 *al.*, 1990; SREEVATSAN *et al.*, 1997; BROSCHE, *et al.* 2002). A análise de genoma do *M.*
17 *tuberculosis* H₃₇Rv - linhagem originalmente isolada de um paciente com TB pulmonar em
18 1905 - identificou que esta micobactéria apresenta um genoma de 4,4 Mb o qual codifica
19 cerca de 4000 proteínas e 50 moléculas de RNA (MANCA *et al.*, 1999; BOTTAI *et al.*,
20 2014). Além disso, o alto conteúdo de guanina e citosina confirmou uma posição
21 filogenética relacionada com as bactérias Gram positivas (BOTTAI *et al.*, 2014). No
22 entanto, em contraste com as bactérias Gram-positivas agrupadas dentro do filo Firmicutes,
23 as micobactérias apresentam uma arquitetura diferente no envelope celular, destacando
24 uma membrana interna e uma externa (micomembrana), que, organizacionalmente,
25 apresenta maior semelhança com o envelope das bactérias Gram-negativas do que das
26 Gram-positivas (HOFFMANN *et al.*, 2008; ZUBER *et al.*, 2008; KAUR *et al.*, 2009;
27 BOTTAI *et al.*, 2014).

28 Os membros do complexo *M. tuberculosis* apresentam uma multiplicação lenta com um
29 tempo de geração (em animais infectados ou em meios sintéticos) em torno de 20 horas, e
30 requerem de 3 a 4 semanas para formar colônias visíveis em meios de cultura sólidos
31 (COLE, 2002; MURRAY *et al.*, 2007). A parede celular rica em lipídios, em particular
32 ácidos graxos de cadeia longa, denominados ácidos micólicos, apresenta-se como uma
33 importante barreira para antimicrobianos e biocidas. Em parte, a elevada impermeabilidade
34 da parede celular pode explicar a lenta taxa de crescimento, devido a limitada captação de

1 nutrientes (BARRERA, 2007). Em função deste complexo envoltório, as micobactérias
2 apresentam a capacidade de reter o corante fuscina na presença de álcool ácido e por essa
3 razão são conhecidas como bacilos álcool ácido resistentes (BAAR) (BRENNAN &
4 NIKAIDO, 1995; COLE, *et.al.*, 1998; GLICKMAN & JACOBS, 2001). *M. tuberculosis*
5 não forma esporos, mas tem a capacidade de permanecer em um estado de dormência no
6 hospedeiro, desencadeando um estado não-replicativo caracterizado pela sua baixa
7 atividade metabólica (GENGENBACHER & KAUFMANN, 2012). Além disso, cerca de
8 8% do genoma micobacteriano codifica proteínas envolvidas no metabolismo lipídico,
9 destacando a importância dessas moléculas na sobrevivência intracelular do bacilo (KAUR
10 *et al.*, 2009; CHOPRA & GOKHALE 2009).

11

12 **1.2) Patogênese da tuberculose**

13

14 A patogênese da TB pode ser dividida em duas fases: TB primária e TB pós-primária.
15 Após a infecção inicial com *M. tuberculosis*, alguns indivíduos manifestam a doença ativa
16 (TB primária) enquanto outros ficam infectados de forma assintomática com o bacilo (TB
17 latente), porém a doença pode evoluir com risco de 5 a 10% para a sua forma ativa após
18 anos de infecção (TB pós-primária) (O’GARRA *et al.*, 2013). O estado latente é mantido
19 pela ação da atividade do sistema imunológico do hospedeiro que embora não elimine o
20 bacilo, impede o desenvolvimento da doença (GOMEZ & MCKINNEY, 2004).

21 A transmissão de *M. tuberculosis* ocorre por aerossóis expelidos por um paciente
22 bacilífero. Os principais determinantes para a infecção são: a concentração de bacilos
23 contida nos aerossóis, a taxa de ventilação do ambiente, o tempo de exposição do
24 hospedeiro e seu estado imunológico (BLOOM & MURRAY, 1992; YOUNG *et al.*, 2008).
25 No entanto, existem evidências de que algumas cepas são mais virulentas que outras, por
26 exemplo, cepas da linhagem W-Beijing tem sido fortemente associadas com alta
27 capacidade de propagação, maior virulência e resistência aos fármacos (Drobniewski *et al.*,
28 2005; Kubica *et al.*, 2005). Por ser um microrganismo aeróbio, *M. tuberculosis* coloniza
29 preferencialmente o parênquima pulmonar, o local mais comum da infecção. Por outro
30 lado, a TB extrapulmonar pode afetar diversas partes do corpo como a pleura, nódulos
31 linfáticos, abdômen, trato genitourinário, meninges, articulações e ossos (GOLDEN &
32 VIKRAM, 2005).

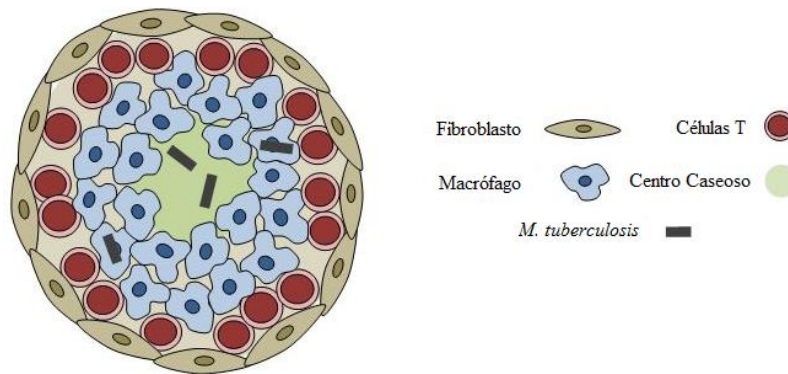
33 Após inalados, os bacilos atingem os pulmões do hospedeiro, são fagocitados por
34 macrófagos alveolares e residem no interior de fagossomos a um pH em torno de 6,2. O

1 reconhecimento do bacilo ocorre através de receptores que reconhecem padrões
2 moleculares associados ao patógeno (PAMPs), como por exemplo, glicolípídeos presentes
3 na parede celular de *M. tuberculosis* (BRENNAN & NIKAIDO, 1995; ERNST, 1998;
4 CAMBI *et al.*, 2005; ROHD *et al.*, 2007). No fagossomo, o bacilo se depara com um
5 ambiente extremamente hostil, com baixo pH, escassez de nutrientes, baixa tensão de
6 oxigênio, espécies reativas de nitrogênio (RNS) e de oxigênio (ROS) (GUTIERREZ *et al.*,
7 2004).

8 Após ativação do sistema imune, os macrófagos são estimulados pelo IFN- γ para
9 aumentar sua eficiência contra os bacilos, promover a maturação do fagossomo e posterior
10 fusão com o lisossomo. Porém, *M. tuberculosis* dificulta essa etapa da formação do
11 fagolisossomo e pode dar início a sua replicação exponencial no interior dos macrófagos,
12 que pode difundir para células epiteliais e endoteliais, atingindo uma elevada carga
13 bacteriana (TB ativa) (WOLF *et al.*, 2008). Para isso, *M. tuberculosis* precisa se adaptar as
14 condições adversas deste novo ambiente e reorganizar seu metabolismo para sua
15 sobrevivência (SCHNAPPINGER *et al.*, 2003). Um mecanismo de sobrevivência e de
16 virulência desenvolvido pelo bacilo é sobreexpressar genes envolvidos no metabolismo
17 lipídico como fonte de carbono. Em 2008, um estudo feito por PANDEY & SASSETTI
18 demonstrou que o *M. tuberculosis* pode metabolizar o colesterol derivado do hospedeiro.
19 Além disso, uma serina protease associada à membrana, codificada pelo gene Rv3671c,
20 auxilia o bacilo a resistir a acidificação do meio (VANDAL *et al.*, 2008).

21 Com a evolução da infecção, outras células de defesa como neutrófilos e linfócitos são
22 recrutados para o local da infecção formando um infiltrado celular que posteriormente
23 assume a estrutura de granuloma (Figura 1) (OTTENHOFF & KAUFMANN, 2012).
24 Alguns indivíduos podem controlar o patógeno nesse estágio, mas continuam latentemente
25 infectados, e, assim, pode ocorrer a reativação da TB ao longo da vida (TB pós-primária)
26 (REECE & KAUFMANN, 2011). *M. tuberculosis* é o exemplo mais notável de patógeno
27 intracelular que persiste por longos períodos dentro do hospedeiro, desencadeando uma
28 infecção assintomática crônica. A integridade do sistema imune do hospedeiro regula a
29 progressão da infecção, podendo eliminar imediatamente o bacilo, condicioná-lo num
30 estado de latência, ou ainda falhar e desencadear a doença ativa (DUCATI *et al.*, 2006).
31 Menos de 10% dos indivíduos infectados latentemente desenvolvem TB ativa durante sua
32 vida. Porém, este risco aumenta em indivíduos imunocomprometidos, como por exemplo,
33 durante a terapia de fator de necrose antitumoral como doenças inflamatórias crônica,

1 diabetes ou co-infecção com o HIV, além de alcoolismo e subnutrição
2 (GENGENBACHER & KAUFMANN, 2012).



3
4 Fonte: Sarathy *et al.*, 2012.

5 **Figura 1:** Clássico granuloma tuberculoso com um centro caseoso que pode ser
6 encontrado em pacientes infectados ativa ou latentemente. O bacilo pode ser encontrado
7 dentro ou fora do macrófago.

8

9 1.3) Situação atual da tuberculose

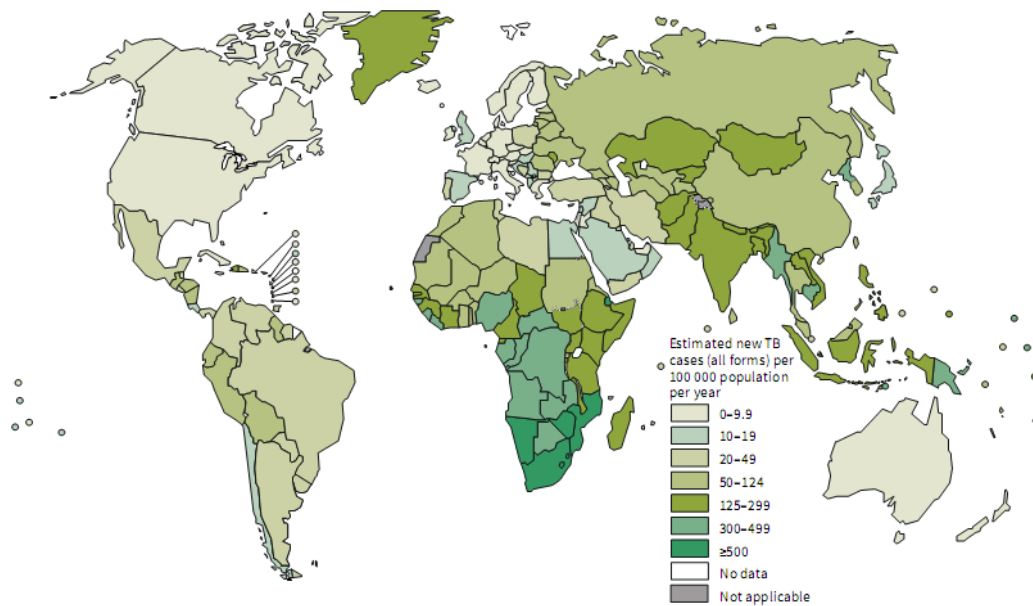
10

11 A implementação de uma quimioterapia efetiva para a TB, exames de raios X,
12 imunização com a vacina BCG e melhorias nas condições socioeconômicas contribuíram
13 para uma considerável redução dos casos de TB em países economicamente desenvolvidos.
14 Porém, no final do século XX, houve um aumento mundial no número de casos da doença,
15 sendo a TB considerada uma emergência global em 1993 pela Organização Mundial da
16 Saúde (OMS) (TAYLOR *et al.*, 2003). Os principais fatores para esse acontecimento
17 foram: o aumento do número de casos de TB com cepas resistentes aos antimicrobianos, a
18 epidemia do vírus da imunodeficiência humana/síndrome da imunodeficiência adquirida
19 (HIV/AIDS), o aumento no número de usuários de drogas, o aumento dos movimentos
20 migratórios, transmissão ativa e descontrolada do bacilo em ambientes com aglomeração
21 humana (como prisões, hospitais, abrigos) e a degradação dos sistemas de saúde (DUCATI
22 *et al.*, 2006).

23 A TB é uma doença infecciosa responsável por uma grande mortalidade em nível
24 mundial. A carga global de TB permanece elevada e o número de casos de TB incidente
25 (taxa de incidência) varia amplamente entre os países (Figura 2). Em 2013, foi estimado 9
26 milhões de casos de TB e 1.5 milhões de mortes, dos quais 360 000 eram HIV-positivo. No
27 caso da infecção com *M. tuberculosis* multidroga resistente (MDR), ou seja, resistente a

1 pelo menos isoniazida e rifampicina, foi estimado 480.000 pessoas infectadas e 210.000
2 mortes (WHO, 2014) (Figura 3).

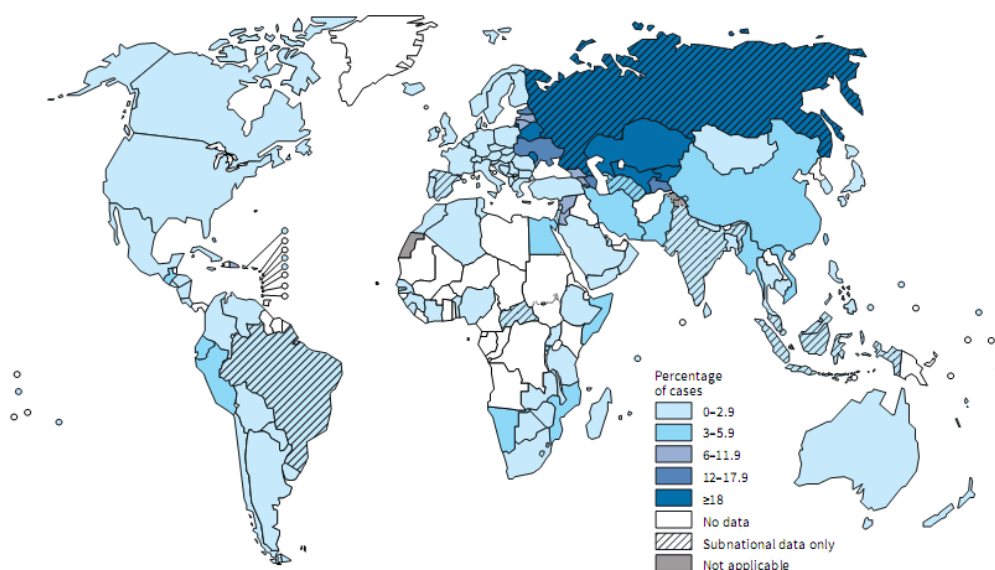
3 As regiões que representaram 56% dos casos de TB no mundo em 2013 foram o
4 sudeste Asiático e Pacífico Ocidental. Além disso, foi estimado em regiões da África
5 aproximadamente $\frac{1}{4}$ dos casos mundiais de TB (29%) e os maiores índices de casos e
6 óbitos na população (uma média de 280 casos incidentes por 100.000 habitantes). Índia e
7 China apresentaram os maiores números de casos, com 24% e 11% do total mundial,
8 respectivamente. Na região das Américas este índice é de 3% (WHO, 2014).



9

10 **Figura 2:** Taxa da incidência de TB em 2013 (WHO, 2014).

11



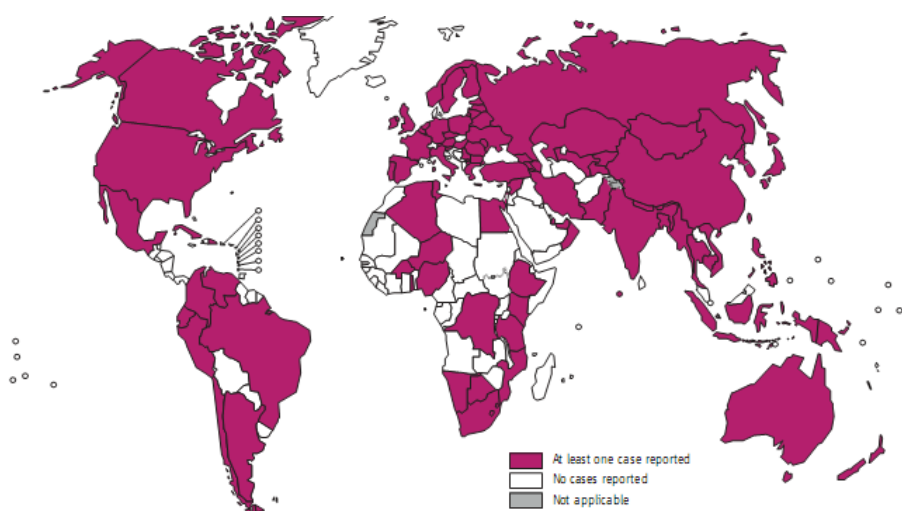
12

13 **Figura 3:** Percentual de novos casos de TB com TB-MDR (WHO, 2014).

1 O Brasil está no ranking dos 22 países que concentram cerca de 80% dos casos de TB,
2 ocupando a 16ª posição em número absoluto de casos. Em 2013, foi diagnosticado no
3 Brasil 71.123 casos novos de TB, representando um coeficiente de incidência de
4 35,4/100.000 habitantes. Quando analisadas as regiões brasileiras em 2013, verificou-se
5 que o Norte, o Sudeste e o Nordeste possuem os mais altos coeficientes de incidência: 45,
6 37 e 34,7/100.000 hab., respectivamente. A cidade de Porto Alegre é a capital com a maior
7 taxa de incidência de TB (99,3/100.000) (BRASIL, 2014).

8 Do total de casos novos diagnosticados em 2013, 85,7% apresentaram a forma clínica
9 pulmonar e, destes, 65,2% eram bacilíferos. Esses casos são os principais responsáveis pela
10 manutenção da cadeia de transmissão da doença quando não tratados adequadamente até a
11 cura (BRASIL, 2014).

12 A presença de cepas resistentes tem conduzido pesquisadores a estudar novos alvos de
13 ação para o desenvolvimento de fármacos, além de compreender o mecanismo de
14 resistência do bacilo aos fármacos. Uma das formas mais graves da resistência, a TB
15 extensivamente resistente às drogas (XDR-TB), causada por cepas que além de ser MDR,
16 são também resistentes a qualquer fluoroquinolona e a pelo menos um dos três fármacos
17 injetáveis do esquema de multirresistência: canamicina (KAN), capreomicina ou amicacina
18 (AMK), foi registrada em 100 países até final de 2013. Dos casos de TB-MDR, cerca de
19 9% dos pacientes desenvolvem a TB-XDR. Esse dado é similar ao percentual estimado em
20 2012 (9.6%). Na última estimativa, um total de 75 países relataram dados representativos
21 sobre a proporção de casos MDR-TB que tiveram XDR-TB (Figura 4) (WHO 2013, WHO
22 2014).



23
24 **Figura 4:** Países com notificações de pelo menos um caso de TB-XDR em 2012 (WHO,
25 2013).

1.4) Tratamento

Em 1900, Albert Calmette e Camille Guérin deram início ao desenvolvimento da vacina BCG (Bacilo Camille and Guérin) a partir de uma cepa de *M. bovis*, atenuada após 230 passagens em meio artificial (OETTINGER *et al.*, 1999). Primeiro administrada em 1921, foi usada intensivamente na Europa após os primeiros indícios de sua eficácia. Durante a Segunda Guerra Mundial (1939 a 1945) a TB destacou-se como uma das grandes preocupações, e o uso desta vacina foi incentivado principalmente pela UNICEF e Organização Mundial da Saúde (OMS) (LUCA & MIHAESCU, 2013). A vacinação com BCG é eficaz contra as formas disseminadas de TB em crianças (80%), como TB miliar e a meningite (COLDITZ *et al.*, 1995; TRUNZ *et al.*, 2006), e os dados que corroboram esta proteção são derivados principalmente de estudos observacionais e de caso-controle (TRAN *et al.*, 2014). Em países com taxas de TB em declínio, a vacinação com BCG ou nunca foi usada ou foi descontinuada nas últimas décadas. Em muitos países a vacinação com BCG é aplicada para todos os indivíduos ou apenas em comunidades de alto risco, as quais podem ser divididas em três grupos: a aplicação da vacina somente no momento do nascimento; aplicação somente na infância; ou aplicação de reforço (TRAN *et al.*, 2014).

A BCG, embora importante para a redução de casos disseminados em crianças, tem a sua eficácia em adultos muito reduzida, sendo ineficaz para proteger contra a doença e portanto pouco útil no controle da TB (TRAN *et al.*, 2014). O desenvolvimento da quimioterapia antibiótica conduziu para uma nova era de tratamento e de controle da TB, alterando mundialmente o perfil epidemiológico da doença (GRZYBOWSKI & ALLEN, 1999). Em 1944, a estreptomicina (STR), obtida da bactéria *Streptomyces griseus*, foi o primeiro antibiótico introduzido no tratamento da TB, seguida pela adição do ácido paramino salicílico (PAS) devido ao surgimento de isolados resistentes à STR. Em 1952, um terceiro antibiótico, a isoniazida (INH), foi incorporada à combinação terapêutica proporcionando uma maior eficácia no tratamento, porém com uma duração de 18-24 meses (ZHANG, 2005 A). Estudos com a pirazinamida (PZA), em 1952, constataram a eficácia deste antibiótico para inibir bacilo semidormente residindo em ambientes ácidos e a sua introdução na terapia da TB (MITCHISON, 1985). A descoberta do etambutol (EMB) na década de 60 substituiu o PAS. Porém, o maior avanço ocorreu com a descoberta da RIF também na década de 60 que reduziu a terapia para um regime de 9 meses: 2 meses de INH, RIF e EMB seguidos de 7 meses de INH e RIF (SILVA & AÍNSA, 2007; ZUMLA *et.al.*, 2014; COHEN *et al.*, 2014).

1 Atualmente, há diferentes regimes de tratamento descritos na literatura. Muitos são
2 recomendados dependendo de inúmeros fatores como: a localização da doença, a
3 gravidade, a co-infecção com o HIV, a resistência aos fármacos, tratamento anterior e o
4 tipo de infecção (SILVA & AÍNSA, 2007). O principal fator negativo do tratamento da
5 doença é o longo tempo – pelo menos 6 meses. Bacilos em estágio de dormência são
6 tolerantes a muitos fármacos anti-TB, uma das razões pela qual o longo tratamento é
7 necessário (ZUMLA *et.al*, 2014).

8 Em 2009, os resultados preliminares do inquérito sobre resistência aos medicamentos
9 anti-TB realizados no Brasil, evidenciaram o aumento da resistência primária à INH (de
10 4,4% para 6%). A partir disso, o Brasil incorporou o EMB no esquema básico de
11 tratamento da TB, qualificou profissionais da saúde e iniciou a oferta dos medicamentos
12 em dose fixa combinada (BRASIL, 2014). O atual regime utilizado para tratar pacientes
13 infectados com cepas suscetíveis aos fármacos consiste numa fase intensiva de 2 meses
14 com INH, RIF, PZA e EMB seguido de 4 meses com INH e RIF. Devido ao alto nível de
15 eficácia e aceitável grau de toxicidade esses fármacos fazem parte do esquema básico de
16 tratamento. A maioria dos pacientes tem grande chance de cura se utilizado
17 adequadamente este esquema (BRASIL, 2011).

18 Entretanto, um tratamento inadequado, como a monoterapia, a não aderência e fatores
19 como a variabilidade farmacocinética de cada indivíduo, podem favorecer o
20 desenvolvimento de cepas resistentes aos fármacos. Com isso, em pacientes infectados
21 com cepas resistentes ao esquema básico são administrados fármacos do esquema de
22 multirresistência (KAN, AMK, capreomicina (CAP), cicloserina, PAS, etionamida e
23 fluoroquinolonas) (WHO, 2011). O tratamento da MDR-TB envolve alto custo, maior
24 toxicidade e longo tempo (18-24 meses), além de os fármacos empregados serem menos
25 efetivos do que aqueles usados no esquema básico. Reações adversas influenciam na
26 adesão do paciente ao tratamento e por consequência na taxa de cura, podendo favorecer a
27 aquisição de novos genes de resistência bem como a disseminação de linhagens resistentes
28 (HAMMA, 2013). Apesar do custo dos fármacos para o tratamento do paciente com MDR-
29 TB ser 50 a 200 vezes maior do que para o tratamento de um doente com *M. tuberculosis*
30 sensível, e os custos globais de cuidados ser 10 vezes superior ou mais, o tratamento de
31 MDR-TB tem sido demonstrado ser uma intervenção custo-efetiva (WHO, 2010). Sendo
32 assim, os fármacos são escolhidos por um processo de seleção de acordo com cada caso,
33 sendo distribuídas em cinco grupos com base na eficácia e segurança (Tabela 1) (WHO,
34 2011).

1 **Tabela 1:** Grupo de fármacos disponíveis para o tratamento da TB.

Grupo de fármacos para tratamento da TB	
Grupo 1: esquema básico (uso oral)	
INH	
RIF	
EMB	
PZA	
Grupo 2: Esquema de multirresistência (Fluoroquinolonas)	
OFX	
LEV	
MOX	
Grupo 3: Esquema de multirresistência (Fármacos injetáveis)	
STR	
KAN	
AMK	
CAP	
Grupo 4: Esquema de multirresistência (Fármacos menos efetivos)	
Etionamida/Protionamida	
Cicloserina/Terizidona	
PAS	
Grupo 5: Esquema de multirresistência (Fármacos menos efetivos ou com poucos dados clínicos)	
Clofazimina	
Amoxiciclina com clavulanato	
Linezolid	
Imipenem	
Claritromicina	
Tiacetazona	

2 Fonte: WHO, 2011.

3
 4 Estratégias de adesão ao tratamento foram implantadas para contribuir na cura e no
 5 controle da doença. O tratamento diretamente observado (TDO), reconhecido
 6 mundialmente e recomendado pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose
 7 (PNCT), consiste na observação diária da ingestão dos medicamentos por um profissional
 8 de saúde, e, excepcionalmente, por uma pessoa que tenha vínculo com o usuário. Nesses
 9 casos, o profissional de saúde deve acompanhar semanalmente o tratamento do paciente.
 10 Com isso, a realização do TDO tem aumentado no país, passando de 37,2% em 2009, para
 11 46,8% em 2012 (BRASIL, 2014).

12 Embora a TB latente seja assintomática e não contagiosa, muitos países tem adotado o
 13 uso profilático do tratamento a fim de evitar a progressão para a TB ativa e a disseminação
 14 na população. Regimes aprovados para o tratamento da TB latente incluem INH, RIF e
 15 rifapentina (CDC, 2015). No entanto, seis a nove meses de tratamento apenas com INH
 16 tem sido sugerido como uma abordagem eficaz e seguro (SIA & WIELAND, 2011). Tanto
 17 nos casos de TB ativa ou latente é indispensável que os pacientes completem todo o
 18 tratamento de forma rígida para controlar a disseminação da doença e o desenvolvimento
 19 de linhagens resistentes (CDC, 2015).

1.5) Resistência aos fármacos

O bacilo de Koch é naturalmente resistente a muitos antibióticos. Um dos principais determinantes da resistência intrínseca de *M. tuberculosis* é a parede celular, que se apresenta como uma barreira efetiva devido à complexa organização lipídica (BRENNAN & NIKAIDO, 1995). Consequência da sua elevada impermeabilidade, camadas de peptidoglicanos e arabinogalactanos limitam a entrada de moléculas hidrofóbicas, enquanto que a camada de ácido micólico limita o acesso de moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas (Figura 5) (JARLIER & NIKAIDO, 1994; KLEINNIJENHUIS *et al.*, 2011). No entanto, a parede celular apenas diminui o influxo dos fármacos, porém age em sinergia com os mecanismos de sistemas de efluxo para efetivamente reduzir a concentração intracelular dos fármacos (NIKAIDO 2001; LI & NIKAIDO, 2004; PIDDOCK, 2006). Estudos tem demonstrado que fenótipos de resistência podem ser gerados pela contribuição de bombas de efluxo, o qual reduzem a concentração intracelular dos fármacos a níveis subinibitórios impedindo que estes atinjam o alvo celular (VIVEIROS *et al.*, 2003; JIANG *et al.*, 2008; LOUW *et al.*, 2009; SUN *et al.*, 2014).

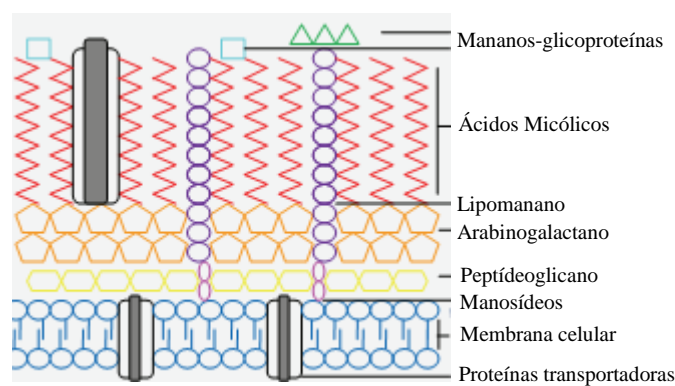


Figura 5: Estrutura esquemática da parede celular micobacteriana

O mecanismo de resistência adquirida envolve a modificação do alvo (gerada por mutações), modificação enzimática do fármaco (como as β -lactamases), alteração da permeabilidade e aumento do efluxo (VIVEIROS *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2011). Mecanismos de resistência mediado por plasmídeos não ocorrem em *M. tuberculosis*. A ocorrência de mutações espontâneas em genes alvos dos fármacos ou em ativadores de pró-fármacos (INH, PZA, etionamida) tem sido considerada a principal causa de resistência aos fármacos administrados no tratamento da TB (SOMOSKÖVI *et al.*, 2001). Isso ocorre devido à taxa natural de mutação do DNA (frequência de 10^6 a 10^8 replicações

1 micobacterianas) como resultado da exposição à sub dosagens dos antibióticos que, por
2 consequência, selecionam mutantes resistentes devido ao tratamento inadequado ou
3 irregular administrado ao paciente (RAMASWAMY & MUSSER, 1998, GILLESPIE *et*
4 *al.*, 2002; LOUW *et al.*, 2009, ZHANG & YEW 2009). Quando os fármacos são utilizadas
5 em combinação, a probabilidade de desenvolver resistência bacteriana é de 10^{-18} a 10^{-20} .
6 Sendo assim, teoricamente, a chance da resistência se estabelecer na população é
7 insignificante quando uma combinação de fármacos é utilizada simultaneamente no
8 tratamento (ZHANG & YEW 2009).

9 Um fator contribuinte para o desenvolvimento da resistência é o tratamento
10 fragmentado, porém a resistência pode se estabelecer mesmo com uma adequada
11 aderência. Fatores como sistemas de efluxo de fármacos, a farmacocinética de cada
12 indivíduo (variabilidade na taxa metabólica e de absorção dos fármacos) e a
13 imunopatologia do pulmão, que resulta uma penetração heterogênea dos fármacos em
14 distintos granulomas, pode comprometer a concentração ideal do fármaco à níveis
15 subinibitórios e provavelmente contribuir para o fenótipo da resistência (DHEDA *et al.*,
16 2014).

17 Em testes de sensibilidade os isolados clínicos de *M.tuberculosis* são classificados
18 como resistentes ou suscetíveis aos fármacos administrados no tratamento, com base na
19 sua capacidade de crescer a uma determinada concentração crítica do fármaco
20 (BÖTTGER, 2011-A). Relacionado a isso, em *M. tuberculosis* são observados três níveis
21 de resistência - alto, baixo e moderado – associados com diferentes mecanismos
22 moleculares de resistência. Baixo nível de resistência é quando o isolado é resistente na
23 concentração crítica do fármaco, mas suscetível a altas concentrações. Por exemplo, para
24 INH, mutações em *katG* podem gerar um fenótipo com alto ou moderado nível de
25 resistência (Concentração Mínima Inibitória - CMI - $>1\mu\text{g/mL}$), enquanto que mutações no
26 gene *inhA*, frequentemente é de baixo nível (CMI $<1\mu\text{g/mL}$) (ELIOPOULOS &
27 MOELLERING, 1996; BÖTTGER, 2011-A). Assim, observa-se uma correlação entre a
28 mutação e a resistência fenotípica. Além de *katG*, mutações em *rpsL* (STR), *rpoB* (RIF)
29 ou RNA 16S ribossomal (KAN, AMK) são associados com altos níveis de resistência,
30 porém mutações em *gidB* (STR), *eis* (KAN) conferem resistência de baixo nível
31 (SOMOSKÖVI *et al.*, 2001; VIVEIROS *et al.*, 2005; WHO, 2008; BÖTTGER, 2011-A).
32 Na tabela 2 são apresentadas a CMI dos fármacos do esquema básico e de multirresistência
33 e os genes envolvidos na resistência.

1 **Tabela 2:** Fármacos do esquema básico e de multirresistência com respectivos CMI
 2 para linhagens sensíveis, genes alvos e seus produtos.

Fármacos	CMI µg/mL	Gene envolvidos na resistência	Produto do gene
INH	0,05-0,2	<i>katG</i> <i>inhA</i> <i>ahpC</i>	Catalase/peroxidase Enoil redutase Acil-hidroperóxido-redutase
RIF	0,5	<i>rpoB</i>	Subunidade β da RNA-polimerase
PZA	20	<i>pncA</i>	pirazinamidase
STR	0,5-1	<i>rpsL</i> <i>gidB</i>	Proteína ribossomal S12 7-metilguanosa metiltransferase
EMB	1-5	<i>embB</i>	Arabinosil transferase
FQs	0,25 - 0,5	<i>gyrA/gyrB</i>	DNA girase
KAN	2-4	<i>rrs</i> <i>eis</i>	RNAr 16S Aminoglicosídeo acetiltransferase
AMK	2-4	<i>rrs</i>	RNAr 16S
CAP	2-4	<i>rrs</i> <i>tylA</i>	RNAr 16S RNAr-metiltransferase
Etionamida	2,5-10	<i>inhA</i>	Enoil-edutase
PAS	0,5	<i>thyA</i>	Timidilato-sintase A

3 Fonte: Böttger, 2011; Jnawali & Ryoo, 2013

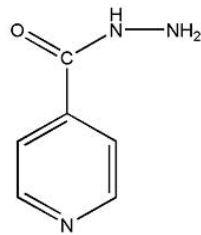
4 1.5.1) Fármacos do esquema básico: mecanismos de ação e de resistência

5 1.5.1.1) Isoniazida

6
 7
 8
 9 A INH ou hidrazida do ácido isonicotínico é o principal fármaco do esquema básico
 10 para o tratamento da TB, possui uma estrutura química simples contendo um anel piridina
 11 e um grupo hidrazida, ambos essenciais para sua atividade (Figura 6). É um pró-fármaco
 12 que requer a ativação pela enzima catalase-peroxidase bacteriana (codificada pelo gene
 13 *katG*) (JOHNSSON & SCHULTZ, 1994). Esta enzima oxida a INH para gerar vários
 14 radicais reativos. O alvo mais conhecido da INH é a via de síntese do ácido micólico,
 15 principal componente da parede celular do bacilo, atuando especialmente na inibição da
 16 proteína enoil-acil redutase NADH- dependente (InhA) codificada pelo gene *inhA*
 17 (VILCHÈZE & JACOBS, 2007). Após a ativação, a INH forma uma ligação com a
 18 nicotimanida adenina dinucleotídeo (NAD) (ROZWARSKI *et al.*, 1998) que então inibe a
 19 proteína InhA (VILCHÈZE *et al.*, 2005). Esta inibição resulta em um acúmulo intracelular

1 de ácidos graxos de cadeia longa, redução na biossíntese de ácidos micólicos e
2 consequente morte da bactéria (COHEN *et al.*, 2014).

3



4

5

Figura 6: Estrutura molecular da INH

6

7 *M. tuberculosis* é altamente suscetível a INH (CMI 0.02–0.2 µg/ml). Além disso, este
8 fármaco é efetivo (bactericida em baixas concentrações) contra bacilos metabolicamente
9 ativos, bacteriostática contra bacilos não replicantes e não apresenta atividade sob
10 condições de anaerobiose (SILVA & AÍNSA, 2007).

11 Dois mecanismos moleculares tem conduzido para a principal causa de resistência a
12 INH: mutações em *katG* e em *inhA* (mais frequentemente na região promotora)
13 (RAMASWAMY *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003; JAGIELSKI *et al.*, 2014). O locus
14 *ahpC*, incluindo o gene estrutural da alquil hidropoxidase redutase (*ahpC*), envolvida na
15 resposta celular ao estresse oxidativo também pode estar envolvida na resistência (ZHANG
16 *et al.*, 2005; HAZBON *et al.*, 2006). Porém, Hazbon *et al.*, 2006 verificaram que mutações
17 na região regulatória do gene *ahpC* (*oxyR-ahpC*) tem sido identificada em cepas sensíveis
18 a INH, indicando que estas mutações geram pouco impacto sob o fenótipo de resistência a
19 INH. Além disso, mutações no gene *kasA* tem sido registradas em cepas sensíveis e
20 resistentes à INH o que induz pesquisadores a concluir que este gene sofre polimorfismos e
21 também não está relacionado à resistência (CARDOSO *et al.*, 2004; HAZBON *et al.*,
22 2006). Outras mutações, como por exemplo nos genes: *ndh*, *nat* e *mshA* ainda não estão
23 totalmente compreendidas quanto ao envolvimento da resistência a este fármaco (LEE *et*
24 *al.*, 2001; COELHO *et al.*, 2011; JAGIELSKI *et al.*, 2014).

25 De fato, a perda total ou redução da atividade catalase/peroxidase devido a mutações
26 em *katG* é a mais comum alteração molecular associada com a resistência a INH (ZHANG
27 *et al.*, 1992; MARTTILA *et al.*, 1998, van SOOLINGEN *et al.*, 2000; JAGIELSKI *et al.*,
28 2014). A mutação mais frequente neste gene é no códon 315, com substituição de uma
29 serina por uma treonina, que resulta numa redução da atividade da INH. Mutações em *katG*
30 alteram a CMI da INH, variando de 0,1 a 256 µg/mL em isolados clínicos resistentes

1 (SILVA & PALOMINO, 2011). Dependendo do tipo de mutação, diferentes fenótipos de
2 resistência podem prevalecer. Isso é observado para os altos níveis de resistência quando
3 ocorre perda da atividade catalase-peroxidase devido a mutações em *katG* (CMIs \geq 1
4 $\mu\text{g/mL}$) e baixos níveis (CMIs $<$ 1 $\mu\text{g/mL}$) em mutação no *inhA* ou no seu promotor (-
5 15C \rightarrow T) (BÖTTGER, 2011 a).

6 Estudos demonstraram que a mutação S315T em *katG* ocorre mais frequentemente em
7 cepas MDR do que em cepas monorresistentes a INH, sugerindo que esta mutação não
8 determina um considerável custo biológico (fitness) para a bactéria, ao contrário da
9 sobreexpressão do gene *inhA* (HAZBON *et al.*, 2006; van DOORN *et al.*, 2006). Isso pode
10 ser explicado pelo fato de que a mutação S315T é por si só pouco custosa, pois apesar de
11 causar uma redução na ativação da INH, permanece com sua atividade detoxificante (PYM
12 *et al.*, 2002). Por outro lado, mutações compensatórias que suprimem uma eventual
13 redução da atividade detoxificante da catalase-peroxidase, como por exemplo, uma
14 superexpressão na região regulatória do gene *ahpC* podem acontecer (RINDER *et al.*,
15 1998; RAMASWAMY *et al.*, 2003; CLEMENTE *et al.*, 2008).

16

17 1.5.1.2) Rifampicina

18

19 Juntamente com a INH, a RIF (Figura 7) é um potente fármaco contra o *M.*
20 *tuberculosis*, introduzido no esquema terapêutico em 1972. Pertence a família das
21 rifamicinas e sua atuação está relacionada a inibição da transcrição gênica bacteriana, pois
22 liga-se à subunidade β da RNA polimerase (codificada pelo gene *rpoB*) (TELENTI *et al.*,
23 1993). A RIF é bactericida contra micobactérias em estado replicativo, porém com alguma
24 atividade frente a bacilos não-replicantes. Além disso, a RIF também é ativa contra uma
25 ampla variedade de microrganismos, incluindo *Staphylococcus* sp., *Neisseria* spp.
26 *Haemophilus influenzae* e *Legionella* spp (SILVA & AÍNSA, 2007).

27 A maioria das mutações (96%) observadas nos isolados resistentes a RIF, ocorrem em
28 uma região bem definida de 81 pb do *rpoB* (regiões “hot spot”) (RAMASWAMY &
29 MUSSER, 1998). As mutações nas posições 531 e 526 estão entre as mutações mais
30 frequentes entre os isolados resistentes e estão, frequentemente, relacionadas com alto
31 nível de resistência (ZHANG & YEW, 2009; SILVA & PALOMINO, 2011). A
32 monorresistência a RIF é rara e a maioria das cepas de *M. tuberculosis* resistente a RIF são
33 também resistentes a INH (SOMOSKÖVI *et al.*, 2001; VIVEIROS *et al.*, 2005; WHO,
34 2008).

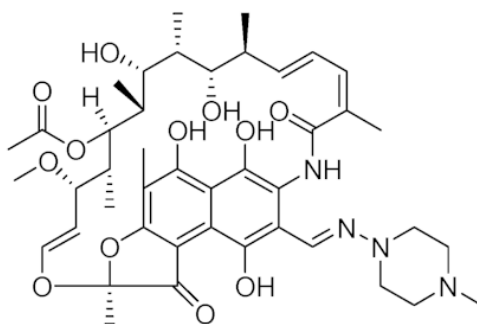


Figura 7: Estrutura molecular da RIF

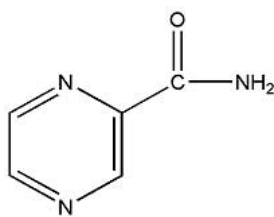
1.5.1.3) Pirazinamida

A PZA (Figura 8), assim como a INH, é um pró-fármaco e é convertida em ácido pirazóico pela pirazinamidase (PZase) bacteriana, codificada pelo gene *pncA* (KONNO *et al.*, 1967; SCORPIO & ZHANG, 1996). Este fármaco é bactericida e ativo somente frente ao *M. tuberculosis*, não demonstrando atividade *in vitro* contra nenhuma outra micobactéria ou microrganismo (SILVA & AÍNSA, 2007). Ao contrário dos antibióticos convencionais, a PZA atua em bacilo não replicante e apresenta atividade somente em pH ácido (por volta de 5,5) (ZHANG *et al.*, 2002). Isso gera limitações para estudos *in vitro* da atividade antituberculosa deste fármaco.

O mecanismo de ação do ácido pirazóico é na inibição do transporte de substâncias e no rompimento do potencial energético da membrana micobacteriana (ZHANG *et al.*, 2003). Além disso, foi identificado um novo alvo da PZA previamente desconhecido, a proteína ribossomal S1 (RpsA), uma proteína vital envolvida na tradução de proteínas (SHI *et al.*, 2011).

PZA entra na célula micobacteriana por difusão passiva, porém é excretada por uma proteína transportadora. Devido a ineficiente atividade desta proteína e as condições ácidas do meio, o ácido pirazinóico protonado (HPOA) retorna ao interior da micobactéria, causando dano celular (ZHANG *et al.*, 2003; ZIMHONY *et al.*, 2007).

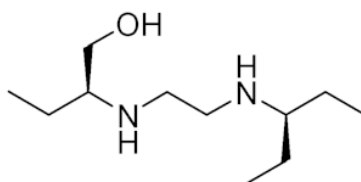
A principal causa de resistência a PZA é a mutação no gene *pncA*, mais frequentemente na região de 561 pb do gene ou de 82 pb do promotor (SCORPIO *et al.*, 1997; JURÉEN *et al.*, 2008), porém, mais recentente, o efluxo do ácido pirazinóico tem sido envolvido na resistência a este fármaco (ZIMIC *et al.*, 2012). Por outro lado, mutações em RpsA também conferem resistência a PZA (SHI *et al.*, 2011).



1
2 **Figura 8:** Estrutura molecular da PZA

3
4 1.5.1.4) Etambutol

5
6 O EMB é também um importante fármaco do esquema básico de tratamento da TB
7 (Figura 9). É bacteriostático e atua no bacilo em estado replicativo. O alvo do EMB é a
8 enzima arabinosil transferase, codificada pelo gene *embB* e envolvida na síntese do
9 arabinogalactano, essencial polissacarídeo da parede celular micobacteriana (TAKAYAMA
10 & KILBURN, 1989). O dano causado na parede celular do bacilo favorece a atividade dos
11 outros fármacos, o que contribui para o aumento da suscetibilidade bacteriana (SILVA &
12 AÍNSA, 2007). Utilizada também para o tratamento de outras infecções causadas por
13 micobactérias outras que não o *M. tuberculosis* (MOTT), como por exemplo, o *M. kansasii*
14 (SILVA & AÍNSA, 2007).



15
16 **Figura 9:** Estrutura molecular do EMB

17
18
19 Em *M. tuberculosis*, *embB* está organizado em um operon juntamente com *embA* e
20 *embC* (*embCAB*). Mutações no gene *embB*, particularmente no códon 306, confere um
21 aumento moderado nos níveis de resistência ao EMB em isolados clínicos de *M.*
22 *tuberculosis* (PLINKE *et al.*, 2011). Podem ser observadas cinco diferentes mutações neste
23 códon (ATG→ GTG/CTG/ATA, ATC e ATT) resultando em três distintos aminoácidos
24 (Met→ Val, Leu ou Ile) (SREEVATSAN *et al.*, 1997B). Embora a resistência tem sido
25 associada com a mutação no gene *embB*, cerca de 75% dos isolados clínicos resistente não
26 apresentam mutações neste gene, inferindo que mutação desconhecidas ou outros
27 mecanismos de resistência podem estar envolvidos (TESSEMA *et al.*, 2012).

28

1.5.2) Fármacos do esquema de multirresistência: mecanismo de ação e de resistência

1.5.2.1) Aminoglicosídeos e peptídeos cíclicos

Por serem antibióticos de difícil absorção do trato gastrointestinal, os aminoglicosídeos (AMK, KAN e STR) e os peptídios cíclicos (CAP e viomicina) devem ser administrados por injeção intramuscular para o tratamento da TB com cepas resistentes (JNAWALI & RYOO, 2013) (Figura 10).

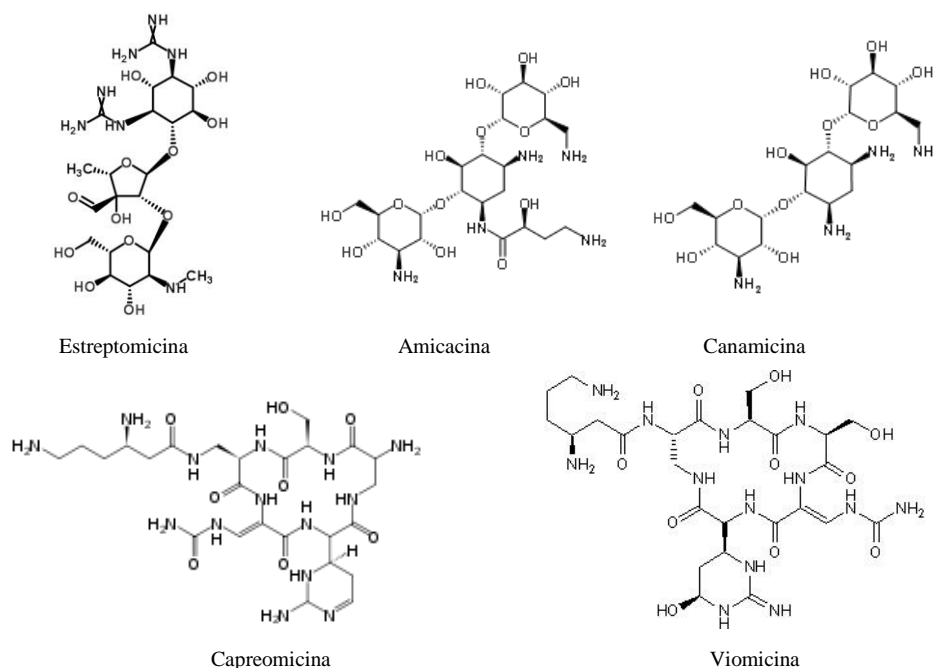


Figura 10: Estrutura molecular dos aminoglicosídeos (STR, AMK e KAN) e peptídeos cíclicos (CAP e Viomicina).

Os aminoglicosídeos são bactericidas somente frente a bactérias em estado replicativo, com pouca ou nenhuma atividade em bacilo não replicante (HEIFETS & LINDHOLM-LEVY, 1989). Por outro lado, a CAP tem atividade bacteriostática contra bacilos replicantes e não replicantes (HEIFETS *et al.*, 2005).

Embora pertençam a diferentes famílias, estes fármacos apresentam o mesmo mecanismo de ação de inibir a síntese de proteínas (GALE *et al.*, 1981). O local de ação da STR é na subunidade ribossomal 30S, especificamente na proteína ribossomal S12 (codificada pelo gene *rpsL*) e no RNA ribossomal (rRNA) 16S (codificado pelo gene *rrs*) (FINKEN *et al.*, 1993). Os outros aminoglicosídeos atuam mais especificamente no rRNA

1 16S (ZHANG, 2005). A CAP bloqueia a síntese protéica através da ligação da interface
2 entre a hélice 44 do rRNA 16S e da hélice 68 de 23S rRNA (HEIFETS *et al.*, 2005).

3 Mutações nos genes *rpsL* e *rrs* estão associadas com a resistência a STR em cepas
4 clínicas de *M. tuberculosis*. As mutações mais frequentes no gene *rpsL* ocorrem nas
5 posições 43 (Lis43Arg) e 88 (Lys88Thr), associadas com alto nível de resistência a STR
6 (TUDÓ *et al.*, 2010). As mutações no gene *rrs* ocorrem nas regiões dos nucleotídeos 530 e
7 912 (FINKEN *et al.*, 1993; SREEVATSAN *et al.*, 1997C). Entretanto, esses dois genes
8 juntos explicam apenas 70% dos casos de resistência fenotípica, indicando que outros
9 mecanismos possam estar envolvidos (SREEVATSAN *et al.*, 1997 C; RISKKA *et al.*, 2000).
10 Tem sido observado que mutações no gene *gidB*, que codifica uma 7-metilguanosina
11 metiltransferase específica para o 16S rRNA, estão associadas com a resistência de baixo
12 nível a STR em *M. tuberculosis*. As mutações nesse gene têm sido observada em alta
13 frequência em isolados clínicos de *M. tuberculosis* (OKAMOTO *et al.*, 2007, SPIES *et al.*,
14 2008).

15 Por outro lado, mutações no gene *rrs* que ocorre particularmente nas posições 1401,
16 1402, 1484 estão associados com resistência a KAN e AMK (FEUERRIEGEL *et al.*, 2009;
17 SILVA & PALOMINO, 2011). Baixo nível de resistência a KAN tem sido correlacionado
18 a mutações na região promotora do gene *eis* que codifica um aminoglicosídeo
19 acetiltransferase (ZAUNBRECHER *et al.*, 2009). Altos níveis de resistência cruzada tem
20 sido observada entre AMK e KAN (MAUS *et al.*, 2005; JUGHELI *et al.*, 2009).

21 Tem sido sugerido que mutações no gene *tlyA* (codifica uma rRNA metiltransferase
22 que modifica os nucleotídeos C1409 na hélice 44 do rRNA 16S e o nucleotídeo C1920 na
23 hélice 69 do rRNA 23S) são responsáveis pela resistência a CAP e viomicina. Mais
24 recentemente, em um estudo feito por DU *et al.*, 2014, foi constatado também a influência
25 de mutações no gene *ppnK* na resistência a CAP, cujo produto catalisa a formação de
26 fosfato dinucleotídeo adenina nicotinamida (NADP) na presença de um doador fosforil
27 (KAWAI *et al.*, 2000).

28

29 1.5.2.2) Fluoroquinolonas

30

31 As fluoroquinolonas (FQ) são potentes fármacos bactericidas recomendados para
32 tratar a MDR-TB (Figura 11) (SULOCHANA *et al.*, 2005; RUSTOMJEE *et al.*, 2008;
33 DORMAN *et al.*, 2009). Além disso, apresentam um amplo espectro de atividade, sendo
34 utilizadas também para o tratamento de infecção respiratórias, gastrointestinais e urinárias,

1 causadas por bactérias, além de doenças sexualmente transmissíveis (SILVA & AÍNSA,
2 2007).

3 Fazem parte desta família a OFX, a ciprofloxacina (CIP) e a levofloxacina (LEV).
4 Quinolonas de nova geração, como a gatifloxacina (GAT) e a moxifloxacina (MOX) estão
5 em fase III de estudos clínicos sendo avaliadas sua segurança e eficácia para substituir
6 fármacos do esquema básico a fim de reduzir o longo tratamento da TB (RUSTOMJEE *et*
7 *al.*, 2008; LIENHARDT *et al.*, 2012; PALOMINO & MARTIN, 2013; MERLE *et al.*,
8 2014; ZUMLA *et al.*, 2014). Estudos tem sugerido que a utilização da MOX durante a fase
9 intensiva do tratamento pode substituir a INH devido a sua semelhante eficácia, sugerindo
10 que esta pode ser uma alternativa para pacientes que são intolerantes ou infectados com
11 cepas resistentes à INH (DORMAN *et al.*, 2009).

12 As FQs ligam-se na enzima DNA girase (topoisomerase II), responsável pelo
13 superenrolamento do DNA, resultando em uma ineficiente síntese de DNA. Além disso,
14 as FQs podem gerar o acúmulo de radicais hidroxil tóxicos no interior da célula
15 (KOHANSKI *et al.*, 2007). Em cepas de *M. tuberculosis*, a CMI para OFX e CIP varia
16 entre 0,5 a 2,5µg/mL, enquanto que para LEV, MOX e GAT varia entre 0,25 e 1 µg/mL
17 (LUBASCH *et al.*, 2000).

18 A DNA girase é composta por duas subunidades A e duas subunidades B, codificadas
19 pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respectivamente. Altos níveis de resistência são constatados em
20 mutações nas regiões que determinam a resistência às quinolonas (QRDR), mais
21 frequentemente no gene *gyrA* (MOKROUSOV *et al.*, 2008; GINSBURG *et al.*, 2003).
22 Dentre as mutações em *gyrB* encontradas em isolados clínicos de *M. tuberculosis*, somente
23 a mutação N510D tem sido demonstrada como envolvida na resistência às FQs (AUBRY,
24 *et al.*, 2006; PANTEL *et al.*, 2011). As mutações mais comuns no gene *gyrA* são nos
25 códons 89 (Asp89Asn), 90 (Ala90Val) e 94 (Asp94Tyr, Asp94Ala, Asp94Asn e
26 Asp94His) (von Groll *et al.*, 2009). A mutação na posição 95 do gene *gyrA* é considerada
27 um polimorfismo natural que não está envolvido com a resistência a FQ, pelo fato de ser
28 encontrada em cepas suscetíveis às FQs (MUSSER, 1995).

29 Devido ao amplo uso das FQs em outras infecções e da disponibilidade sem prescrição
30 médica em muitos países, a resistência cruzada é registrada em muitas FQs (VON GROLL
31 *et al.*, 2009).

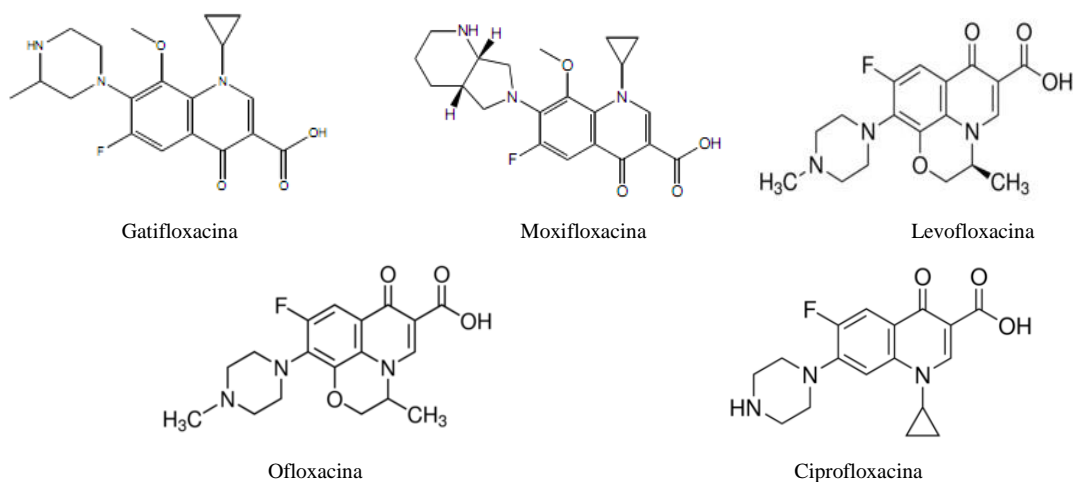


Figura 11: Fluoroquinolonas ativas contra *M. tuberculosis*

7
8

1.5.2.3) PAS

9 Embora tenha sido um dos fármacos do esquema básico, o PAS agora é utilizado no
10 esquema de multirresistência (Figura 12). É um antibiótico bacteriostático e pode ser
11 administrado oralmente. Foi um dos primeiros fármacos que mostrou atividade contra *M.*
12 *tuberculosis*, sendo utilizado juntamente com INH e STR (LEHMANN, 1946). Entretanto,
13 o mecanismo de ação nunca foi claramente compreendido.

14 Mutações no gene *thyA* que codifica a enzima timidilato sintase têm sido associadas
15 com resistência ao PAS em *M. tuberculosis*, sugerindo sua interferência com a via do
16 folato por meio de um mecanismo desconhecido. Essa via gera tetrahydrofolato em
17 procariotos e eucariotos, um transportador de carbono envolvido na biossíntese de purinas,
18 timidinas, glicina, metionina e pantotenato, além de ser necessária para a síntese de tRNA
19 formilmetionil (MATHYS *et al.*, 2009). Um recente estudo realizado por ZHENG *et al.*,
20 2013, sugere que PAS é um pró-fármaco e que atua como um precursor metabólico que,
21 quando incorporado por enzimas na via do folato, inibe a atividade da diidrofolato redutase
22 e interfere na síntese do folato.

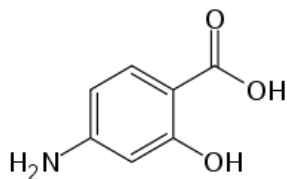


Figura 12: Estrutura molecular do ácido para-aminosalicílico

1.5.2.4) Etionamida

É um antibiótico bactericida similar a INH e tem sido usado desde 1956 (Figura 13). É também um pró-fármaco e requer ativação pela via mono-oxigenase codificada pelo gene *ethA* para formar uma ligação com o NAD e inibir o mesmo alvo da INH, a enoil-ACP redutase dependente de NADH (*inhA*) (WANG *et al.*, 2007).

A resistência a etionamida é conferida por mutações em *ethA* e *inhA* (HAZBON *et al.*, 2006). Além disso, mutações que modificam o alvo InhA ou causam sua sobreexpressão, além de mutações em *ndh* que aumentam a concentração intracelular de NADH, podem favorecer a resistência cruzada entre INH e ETH (VILCHÈZE *et al.*, 2005; VILCHÈZE *et al.*, 2006).

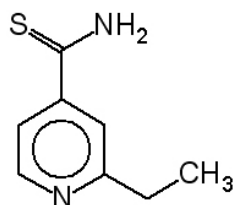


Figura 13: Estrutura da etionamida

1.5.2.5) Cicloserina

É um antibiótico bacteriostático (Figura 14) de amplo espectro que inibe o crescimento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Nocardia* spp., *Chlamydia*, e *M. tuberculosis* (SILVA & AÍNSA, 2007). Atua na inibição da síntese de peptidoglicano da parede celular, porém em *M. tuberculosis* o alvo ainda é desconhecido (SILVA & PALOMINO, 2011). Estudos clínicos na década de 50 mostraram reduzida eficácia da cicloserina quando comparado com a PAS e grave toxicidade neuropsiquiátrica relacionada com a dose administrada (STOREY, 1960).

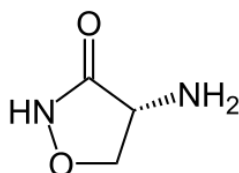


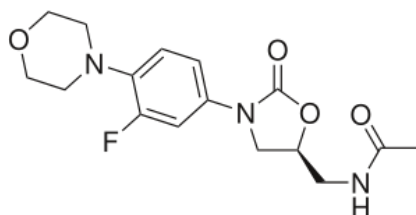
Figura 14: Estrutura da cicloserina

1.5.2.6) Linezolida

1 Pertence às oxazolidinonas e foi o primeiro composto dessa família a ser aprovado para
2 o uso clínico (Figura 15). Utilizada principalmente para tratar infecções causadas por
3 bactérias Gram positivas (CYNAMON *et al.*, 1999).

4 Atua inibindo a etapa inicial da síntese de proteínas por se ligar na subunidade
5 ribossomal 50S (ZHANG, 2005). Mutações em rRNA 23S e em duas proteínas
6 ribossomais L3 e L4 ter sido demonstrado para conferir resistência a linezolida (LNZ) em
7 vários organismos patogênicos (LONG & VESTER, 2012; BECKERT *et al.*, 2012). Para
8 *M. tuberculosis* várias mutações em rRNA 23S e em *rplC* T460C (proteína ribossomal L3)
9 foram identificados em isolados clínicos resistentes à LNZ (LEE *et al.*, 2012; BECKERT
10 *et al.*, 2012).

11 Um recente estudo feito por ZHANG e colaboradores (2014A) avaliou o efeito da
12 linezolida em ensaios *in vitro* e *in vivo* e observou que esse fármaco foi efetivo frente a
13 bacilos em estado de latência em camundongos infectados, além de apresentar atividade
14 em combinação com a RIF. Em outro estudo foi demonstrado que a linezolida tem eficácia
15 em pacientes com TB-XDR pulmonar (ZHANG *et al.*, 2014B). Linezolida é bem
16 absorvida, com elevada biodisponibilidade e boa penetração nos tecidos (PALOMINO &
17 MARTIN, 2012).



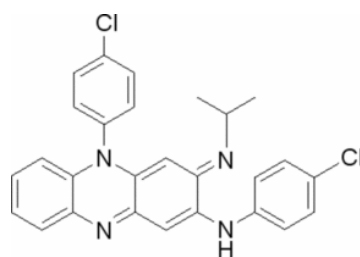
18
19 **Figura 15:** Estrutura molecular da Linezolida

20 21 1.5.2.7) Clofazimina

22
23 É uma riminofenazina lipofílica (Figura 16), cuja atividade antiinflamatória e
24 antimicobacteriana foi registrada muito antigamente (BARRY *et al.*, 1957; IMKAMP,
25 1981; ANDERSON, 1983). A aplicação clínica primária deste antibiótico é o tratamento da
26 lepra, doença causada pelo *M. leprae* (Palomino & Martin, 2014). Apesar de não estar
27 inserida oficialmente no tratamento da TB, este fármaco é recomendado pela OMS para
28 tratar pacientes infectados com cepas XDR-TB (WHO, 2011).

29 O exato mecanismo de ação antimicrobiana permanece desconhecido. Contudo, é
30 possível que a membrana externa seja o principal alvo desse fármaco, mais
31 especificamente a cadeia respiratória e o transporte de íons (CHOLO *et al.*, 2012). Apesar

1 da resistência à clofazimina ainda não ser completamente caracterizada, foi descrito que
 2 mutações no regulador transcricional, Rv0678, na cepa de referência H₃₇Rv, gera uma
 3 super regulação de MmpL5, uma proteína transportadora (HARTKOORN *et al.*, 2014).



4
 5 **Figura 16:** Estrutura da clofazimina

6
 7 **1.6) Novos fármacos**

8
 9 Devido ao interesse das diversas áreas de pesquisa em TB relacionadas à busca de
 10 moléculas mais ativas que os fármacos atuais e que atuem em alvos diferentes daqueles já
 11 descritos envolvidos na resistência, há várias outros fármacos anti-TB em estudo (Tabela
 12 3). Alguns já estão sendo avaliados em ensaios clínicos e em novas combinações a fim de
 13 reduzir o tempo de tratamento e substituir fármacos cuja atividade foi prejudicada. Abaixo
 14 são descritas as mais estudadas.

15
 16 **Tabela 3:** Fármacos em desenvolvimento pré-clínico e clínico para o tratamento da TB.

Desenvolvimento pré-clínico	Desenvolvimento clínico		
	Fase I	Fase II	Fase III
	Nenhum		
CPZEN 45	registrado atualmente	AZD-584	Gatifloxacina
DC 159 ^a		Linezolida	Moxifloxacina
Q203		Sutezolida	Rifapentina
SQ609		SQ109	Bedaquilina
SQ641		PA-824	Delamanida
TBI-166		Rifapentina	
BTZ-043			
PBTZ-169			
TBA-354			

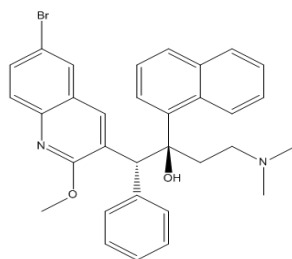
17 Fonte: Palomino & Martin, 2013

18 **1.6.1) Bedaquilina (TMC207)**

19

1 É uma diarilquinolona (Figura 17), anteriormente conhecida como TMC207, com
2 atividade específica frente ao *M. tuberculosis*, porém com atividade *in vitro* também frente
3 a outras micobactérias (HUITRIC *et al.*, 2007). Em 2012, este fármaco recebeu aprovação
4 pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) para ser incluído na terapia combinada
5 para o tratamento de adultos com tuberculose pulmonar MDR, quando um regime de
6 tratamento eficaz não pode ser fornecido (COHEN *et al.*, 2014). Foi demonstrado que a
7 bedaquilina reduziu o tempo de conversão para uma cultura negativa quando adicionado à
8 terapia padrão para MDR-TB, além de reduzir a contagem média de unidades formadora
9 de colônias (CFU) na expectoração mais rapidamente no grupo tratado com esse fármaco
10 do que no controle (DIACON *et al.*, 2009).

11 Atualmente, está inserida na fase III de ensaios clínicos. Novas combinações de
12 regimes terapêuticos com a bedaquilina estão sendo avaliados a fim de reduzir o longo
13 tratamento da TB (DIACON *et al.*, 2012). Contudo, a bedaquilina apresenta efeitos
14 adversos importantes que limitam o seu uso, como a hepatotoxicidade, cardiotoxicidade,
15 além de interações farmacológicas com os fármacos do esquema básico. Por isso, baseado
16 nessas evidências, pacientes em tratamento com esse fármaco devem ser monitorados, bem
17 como deve ser realizada uma avaliação prévia de disfunção hepática e cardíaca (KOUL *et*
18 *al.*, 2008; FOX & MENZIES, 2013).



19

20

Figura 17: Estrutura da bedaquilina

21

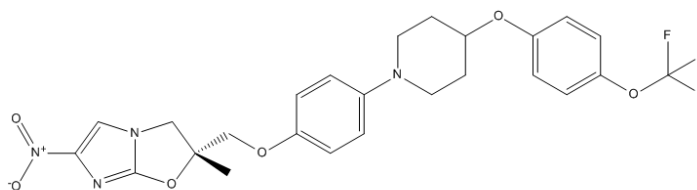
22 O mecanismo de ação da bedaquilina é inibir a ATP sintetase, o que a torna importante
23 por apresentar exclusividade no alvo. Entretanto, o sequenciamento do genoma de cepas de
24 *M. tuberculosis* e *M. smegmatis* mutantes resistentes a bedaquilina indicou uma mutação
25 no gene *atpE*, a qual codifica a parte “c” da subunidade F0 da ATP sintetase (ANDRIES *et*
26 *al.*, 2005). Além disso, foi demonstrado resistência cruzada a clofazimina, devido a
27 mutações em Rv0678, identificada em pacientes tratados com bedaquilina com
28 consequente redução da atividade bactericida (ANDRIES *et al.*, 2014).

1 O efluxo da bedaquilina foi identificado por Gupta e colaboradores (2014), em ensaios
2 utilizando o inibidor de efluxo verapamil. Foi demonstrado que a presença deste inibidor
3 em combinação com a bedaquilina reduz de 6 a 16 vezes a CMI deste fármaco em isolados
4 sensíveis e resistentes. Este dado sugere que o efluxo pode emergir como um importante
5 mecanismo de resistência a bedaquilina (GUPTA *et al.*, 2014).

6 7 **1.6.2) Delamanida** 8

9 Inicialmente conhecida como OPC-67683 (Figura18), é um derivado nitro-dihidro-
10 imidazooxazol em fase III de desenvolvimento clínico. Atua na inibição da biosíntese de
11 ácidos micólicos (PALOMINO & MARTIN, 2013). Apresenta atividade *in vitro* e *in vivo*
12 frente a cepas de *M. tuberculosis* suscetíveis e resistentes, bem como atividade bactericida
13 semelhante à da RIF (MATSUMOTO *et al.*, 2006; DIACON *et al.*, 2011). A CMI
14 determinada para este fármaco varia de 0.006 a 0.024 µg/mL *in vitro* com efetiva atividade
15 terapêutica *in vivo* (MATSUMOTO *et al.*, 2006). Recentemente, uma avaliação clínica
16 demonstrou eficácia do seu uso em TB-MDR (GLER *et al.*, 2012).

17 A delamanida também requer a ativação redutora pelo *M. tuberculosis* para exercer a
18 sua atividade. Em micobactérias resistentes a delamanida geradas experimentalmente, uma
19 mutação foi encontrada no gene Rv3547 sugerindo seu papel na ativação do fármaco
20 (MATSUMOTO *et al.*, 2006).



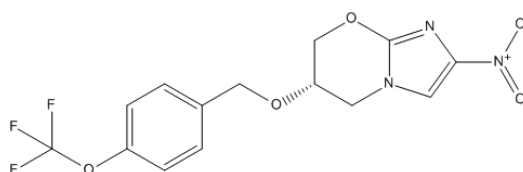
22
23 **Figura 18:** Estrutura da delamanida
24

25 **1.6.3) PA-824** 26

27 É um pró-fármaco da classe dos nitroimidazóis (Figura 19) que requer uma ativação
28 biorredutiva de um grupo nitro aromático para exercer o efeito antimicobacteriano inibindo
29 a síntese de proteínas e de lipídeos presentes na parede celular (STOVER *et al.*, 2000;
30 MANJUNATHA *et al.*, 2006). Apresenta CMI em torno de 0.015 a 0.25 µg/mL frente a
31 cepas pan-suscetíveis e resistentes, além de ser ativa também frente a bacilos em estágio

1 não replicante em culturas anaeróbias (STOVER *et al.*, 2000; PALOMINO & MARTIN,
2 2013). Em avaliação na fase II, PA-824 foi analisado em diferentes combinações com
3 bedaquilina, MOX e PZA (DIACON *et al.*, 2012). Os resultados mostraram que uma nova
4 combinação de PA-824 com MOX e PZA pode ser adequado para tratar pacientes
5 infectados com linhagens suscetíveis e MDR, com potencial para reduzir o tempo de
6 tratamento.

7 O mecanismo de resistência a PA-824 tem sido associada com a perda de uma
8 específica desidrogenase glucose-6-fosfato (FGD1) ou de seu cofator F420, que juntos
9 fornecem elétrons para a ativação redutora desta classe de moléculas (MANJUNATHA *et*
10 *al.*, 2006).

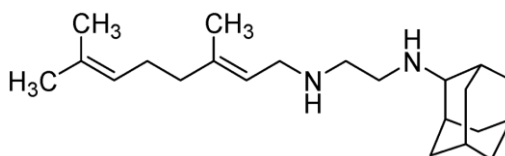


11
12 **Figura 19:** Estrutura do PA-824

13 14 **1.6.4) SQ-109**

15
16 É um derivado sintético análogo do EMB (Figura 20) com atividade frente a cepas
17 suscetíveis e resistentes de *M. tuberculosis* (PROTOPOPOVA *et al.*, 2005). Em ensaios de
18 interação, SQ-109 apresentou atividade sinérgica *in vitro* quando combinado com a
19 bedaquilina (REDDY *et al.*, 2010). Atualmente, está sendo avaliado na fase II de ensaio
20 clínico (PALOMINO & MARTIN, 2013).

21 Atua interferindo a síntese de ácidos micólicos. Entretanto, estudos transcricionais
22 demonstram que similar a outros fármacos que também inibem componentes da parede
23 celular, como a INH e o EMB, SQ-109 induz a transcrição do operon *iniBAC* necessário
24 para o funcionamento de proteínas transportadoras (BOSHOF *et al.*, 2004). Verificou-se
25 que em cepas resistentes ao SQ109, existe uma super-regulação de *ahpC*, sugerindo um
26 possível papel no desenvolvimento de resistência a este fármaco (JIA *et al.*, 2005).



27
28
29 **Figura 20:** Estrutura do SQ-109

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

1.7) Sistema de efluxo como mecanismo envolvido na resistência

O transporte de substâncias através da membrana é vital para a fisiologia celular, seja carreando nutrientes essenciais, excretando substâncias tóxicas ou mantendo a homeostase intracelular, sendo encontrados em células eucarióticas e procarióticas (PAULSEN *et al.*, 1996). Algumas proteínas de membrana (bombas de efluxo) são capazes de transportar um único tipo de molécula, enquanto outras transportam várias moléculas de mesma ou de diferentes classes químicas. Estas proteínas transportam outras moléculas de forma casual em função das semelhanças de propriedades físico-químicas entre os fármacos e os seus substratos comuns (NEYFAKH, 2002; PIDDOCK, 2006).

As bombas de efluxo podem ser classificadas em cinco famílias (LI & NIKAIDO, 2004) com base em suas características estruturais e bioenergéticas: ABC-ATP (ATP binding cassette) e MFS (Major Facilitator Superfamily), ambas filogeneticamente muito antigas; e famílias menores, como a SMR (Small Multidrug Resistance), RND (Resistance Nodulation-cell Division) e MATE (Multidrug Toxic Compound Extrusion). As famílias MFS, SMR, RND e MATE são transportadores secundários, ativados pela energia armazenada em um gradiente eletroquímico gerados por prótons que são transportados e distribuídos para a superfície da célula, também conhecido como a força motriz de prótons (H^+ ou Na^+); enquanto que os membros da família ABC hidrolizam ATP como fonte de energia, sendo considerados transportadores primários (PUTMAN *et al.*, 2000).

O efluxo geralmente tem sido associado com baixo nível de resistência intrínseca a fármacos como aminoglicosídeos, INH, RIF e FQs (LEE *et al.* 2000; PIDDOCK, 2006). No entanto, devido a exposição prolongada a concentrações subinibitórias dos antibióticos, o efluxo pode conferir uma vantagem de sobrevivência durante o tratamento, o que aumentará a probabilidade do acúmulo de mutações relevantes. Genes mutados que codificam proteínas alvos se estabelecerão na população e gerarão um aumento do nível de resistência (SRIVASTAVA *et al.*, 2010). No entanto, foi demonstrado que uma proporção substancial de isolados clínicos resistentes a alguns fármacos não apresentam as clássicas mutações em genes associados à resistência, permitindo supor que o sistema de efluxo seja um dos prováveis mecanismos de resistência (LOUW *et al.*, 2009).

A sobreexpressão de bombas de efluxo pode significativamente reduzir a concentração intracelular de muitos antibióticos e comprometer a eficácia clínica (SINGH *et al.*, 2011). Vários estudos registraram o aumento da expressão de genes que codificam bombas de

1 efluxo em *M. tuberculosis* em presença de concentrações subinibitórias de antibióticos
2 (SIDDIQI *et al.*, 2004; GUPTA *et al.*, 2006; JIANG *et al.*, 2008; GUPTA *et al.*, 2010;
3 HAO *et al.*, 2011). Esse fato indica que os antibióticos podem atuar como indutores,
4 regulando a expressão de genes que codificam bombas de efluxo (ROBERTS, 1996;
5 GRKOVIC *et al.*, 2001; STAVRI *et al.*, 2006).

6 A identificação da bomba de efluxo Rv1258c (família MFS) em *M. tuberculosis*,
7 homóloga da bomba Tap em *M. fortuitum*, foi a primeira bomba funcional descrita em *M.*
8 *tuberculosis* (AÍNSA *et al.*, 1998). Estudos demonstraram que o gene Rv1258 foi induzido
9 na presença de INH, RIF e OFX em isolados clínicos de *M. tuberculosis* MDR que
10 apresentavam mutações em genes associados à resistência a estes fármacos. Foi então
11 sugerido que os altos níveis de resistência poderiam ser reflexo da sobreexpressão adicional
12 do gene Rv1258c (SIDDIQI *et al.*, 2004; GUPTA *et al.*, 2006; JIANG *et al.*, 2008). Além
13 disso, bombas da família ABC (*DrrAB*, *pstB*, Rv1747 e Rv2686c-2687c-2688c) também
14 estão envolvidas com a resistência em *M. tuberculosis* a vários fármacos utilizados na
15 terapia da TB, como a INH, RIF, EMB, CIP e FQs (BRAIBANT *et al.*, 2000; BHATT *et*
16 *al.*, 2000; PASCA *et al.*, 2004)

17 Em 1999, Wilson e colaboradores detectaram o aumento da expressão do gene *efpA*
18 (família MFS), na presença de INH, o qual foi sugerido que a proteína codificada por este
19 gene poderia estar relacionada com o transporte de moléculas envolvidas na síntese de
20 ácidos micólicos. Em outro estudo, utilizando a cepa não-patogênica *M. smegmatis*, a
21 eliminação do homólogo *efpA* resultou em um aumento de duas vezes na sensibilidade ao
22 brometo de etídio (BrEt), à gentamicina e a FQs (LI *et al.*, 2004). Além disso, a bomba de
23 efluxo denominada P55 (outro membro da família MFS), codificada pelo gene *p55*, tem
24 sido bem caracterizada em muitos estudos que demonstraram a sua associação com baixos
25 níveis de resistência a vários fármacos, incluindo tetraciclina, aminoglicosídeos e RIF
26 (SILVA *et al.*, 2001; RAMÓN-GARCIA *et al.*, 2009). Além de estar envolvida na extrusão
27 e consequente resistência a fármacos, foi demonstrado que a *p55* apresenta um papel
28 importante na resposta ao estresse oxidativo e na manutenção do crescimento bacteriano *in*
29 *vitro* (RAMÓN-GARCIA *et al.*, 2009).

30 O genoma de *M. tuberculosis* contém vários genes que codificam para proteínas da
31 família RND. Estas proteínas foram designadas como grandes proteínas de membrana de
32 micobactérias (MmpL), e acredita-se que estão envolvidas no transporte de ácidos graxos
33 (TEKAIA *et al.*, 1999). Em *M. tuberculosis*, as proteínas MmpL1, MmpL4, MmpL7 e
34 MmpL8 desempenham um papel importante na manutenção da virulência em experimentos

1 *in vivo*. Esta contribuição para virulência pode estar associada à ampla gama de substratos
2 destas proteínas, incluindo lipídeos e ácidos micólicos que se reúnem na parede celular
3 micobacteriana, e que podem ser liberados para o interior do fagossomo em macrófagos
4 infectados (DOMENECH *et al.*, 2005). Em ensaios de expressão do gene *mmpL7* em *M.*
5 *smegmatis*, o nível de resistência à INH foi 16 vezes mais elevado (CMI > 512 µg/mL) na
6 cepa que expressava o gene do que na cepa selvagem (CMI = 32 µg/mL) (PASCA *et al.*,
7 2005). Isso indica que a proteína MmpL7 pode utilizar INH como um substrato de bomba,
8 fato que posteriormente foi demonstrado em *M. tuberculosis* com a sobreexpressão do gene
9 *mmpL7* após exposição a INH (MACHADO *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*; 2012).
10 Além disso, também foi identificado que diferenças quantitativas na expressão gênica em
11 isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a INH (mutação em *katG*) também está
12 associada com a sobreexpressão do gene Rv2459 (MFS) (PASCA *et al.*, 2005; VIVEIROS
13 *et al.*, 2012).

14 Mmr é a única proteína da família SMR que foi descrita em *M. tuberculosis* (DE
15 ROSSI *et al.*, 1998). O gene *mmr* quando inserido em um plasmídeo reduz a
16 susceptibilidade de *M. smegmatis* a tetrafenilfosfônio, brometo de etídio, eritromicina,
17 acriflavina, safranina O e pironina Y (DE ROSSI *et al.*, 1998). Outros estudos têm
18 mostrado que o *mmr* foi sobreexpresso após a exposição à INH ou na combinação entre
19 INH e EMB (GUPTA *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*; 2012).

20 A expressão de genes que codificam bombas de efluxo está sujeita a regulação por
21 vários reguladores transcricionais locais e globais, principalmente durante condições de
22 estresse, patogênese e virulência bacteriana (Sun *et al.*, 2014). Com isso, a expressão
23 diferencial destes reguladores controla a expressão de um conjunto de genes que
24 respondem a diferentes estímulos ambientais, servindo como um importante mecanismo
25 para a sobrevivência bacteriana (GEIMAM *et al.*, 2006). No genoma de *M. tuberculosis* há
26 sete genes “*whiB-like*” (*whiB1* a *whiB7*) que atuam como reguladores transcricionais
27 (COLE *et al.*, 1998; MULDER *et al.*, 1999). Estudos indicam que o gene *whiB7* é regulado
28 em resposta a uma variedade de antibióticos, incluindo macrolídeos, aminoglicosídeos e
29 ofloxacina e coordena os genes envolvidos na resistência intrínseca (MORRIS *et al.*, 2005;
30 GEIMAM *et al.*, 2006; BURIAN *et al.*, 2012). A análise de expressão gênica mostrou que
31 a transcrição de *whiB7* determina a resistência a certos antibióticos através da ativação da
32 expressão de genes como Rv1258c e Rv1473 (MORRIS *et al.*, 2005; GEIMAM *et al.*,
33 2006). Assim, determinar as condições em que o gene *whiB7* é induzido ou reprimido é um
34 passo importante na compreensão de sua possível função e papel na regulação da

1 expressão gênica em *M. tuberculosis* em presença de diferentes antibióticos (GEIMAM *et*
2 *al.*, 2006).

3 **1.7.1) Inibidores de bombas de efluxo (EPIs)**

4
5 A partir das evidências apresentadas, o mecanismo de efluxo desempenha um papel
6 significativo na aquisição de resistência em *M. tuberculosis*. Isto torna-se um fato
7 particularmente relevante no caso de terapias de longo prazo, tais como a utilizada no
8 tratamento da TB e facilmente potencializada pela falta de aderência do paciente ao regime
9 terapêutico (DE STEENWINKEL *et al.*, 2010; SRIVASTAVA *et al.*, 2010;
10 PASIPANODYA & GUMBO, 2011). Uma forma de prevenir que estes eventos ocorram
11 seria a inibição de bombas de efluxo utilizando inibidores de efluxo para aumentar a
12 atividade dos antibióticos que são substratos de bombas e diminuir a frequência de seleção
13 de mutantes resistentes aos medicamentos.

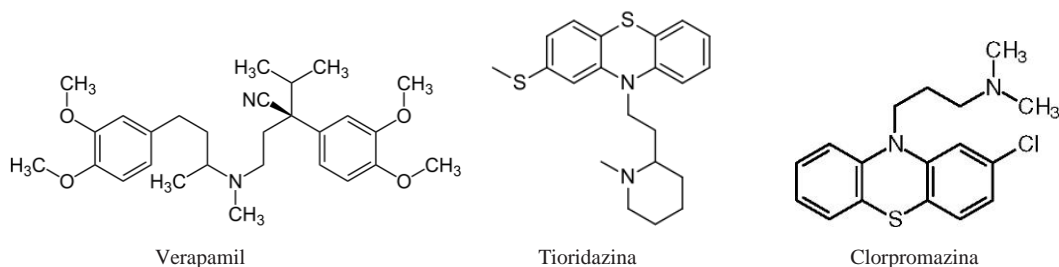
14 Demonstrada a contribuição de sistemas de efluxo no desenvolvimento de resistência
15 aos antibióticos, várias compostos, como o verapamil, reserpina, fenotiazinas (tioridazina e
16 clorpromazina), o haloperidol, o flupentixol e o farnezol (Figura 21), são capazes de inibir
17 o mecanismo de efluxo em micobactérias, e, conseqüentemente, contribuir para o
18 reestabelecimento da atividade dos fármacos (KAATZ, 2005; MARQUEZ, 2005;
19 RODRIGUES *et al.*, 2011). Em geral, o mecanismo pelos quais esses agentes atuam ainda
20 é pouco conhecido. Alguns modelos propõem que ocorra 1) uma ligação direta dessas
21 moléculas às bombas de efluxo, bloqueando o transporte; 2) o rompimento dos gradientes
22 transmembrana utilizados pelos transportadores secundários; 3) e a competição pelo efluxo
23 (MARQUEZ, 2005; PIDDOCK, 2006; MARTINS *et al.*, 2008; PAGES & AMARAL
24 2009).

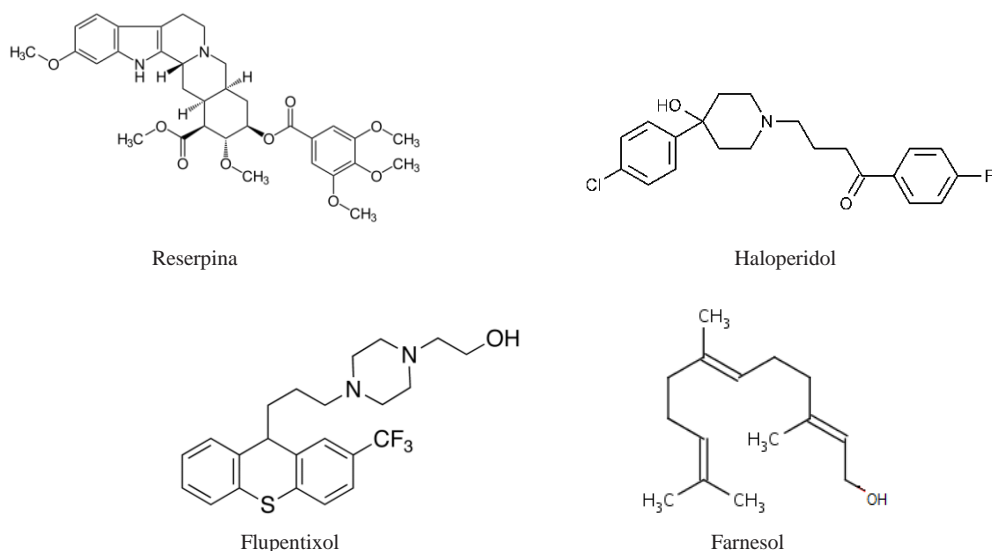
25 Estes inibidores envolvidos no bloqueio do transporte de moléculas são de grande
26 importância e têm sido estudados nos últimos anos. A busca de novas moléculas ou
27 combinações de compostos adjuvantes para tratar infecções por micobactérias MDR tem
28 se tornado um dos principais objetivos no tratamento da TB (VIVEIROS *et al.*, 2012).
29 Além da atividade inibitória do efluxo em micobactéria, os inibidores também apresentam
30 atividade antimicrobiana, embora não sejam usados como tal na prática clínica, como é o
31 caso dos antipsicóticos (tioridazina, clorpromazina, bromoperidol) e anti hipertensivos
32 (verapamil e reserpina) (VIVEIROS *et al.*, 2012).

1 Bloquear a atividade dos sistemas de efluxo significa reduzir a CMI dos antibióticos e
2 consequentemente, restaurar e/ou aumentar a potencialidade antimicrobiana (VIVEIROS *et*
3 *al.*, 2012). Vários estudos que utilizam inibidores de efluxo para detectar uma possível
4 redução na CMI dos fármacos e identificar indiretamente o envolvimento do efluxo na
5 resistência, evidenciaram que estas moléculas são eficientes em reduzir níveis
6 significativos de resistência (GUPTA *et al.*, 2006; GUPTA *et al.*, 2010, MACHADO *et al.*
7 2012; RODRIGUES *et al.*, 2012). No estudo de Machado e colaboradores em 2012, a CMI
8 da INH em *M. tuberculosis* resistente a este antibiótico foi reduzida na presença de
9 tioridazina, clorpromazina e verapamil a níveis iguais ou abaixo da concentração crítica de
10 INH utilizada para testes de sensibilidade.

11 O verapamil é um bloqueador dos canais de cálcio, utilizado também para arritmias
12 cardíacas (McTAVISH & SORKIN, 1989). Estudos tem demonstrado que esse inibidor é o
13 mais ativo dentre os EPIs em destaque (RODRIGUES *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*,
14 2009; RODRIGUES *et al.*, 2012). Com atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo*, as
15 fenotiazinas inibem o transporte de cálcio impedindo a ligação de enzimas dependentes de
16 cálcio (ORDWAY *et al.*, 2003; LÓPEZ-MUÑOZ *et al.*, 2005). Também foi demonstrada a
17 capacidade da tioridazina e da clorpromazina inibir o efluxo de brometo de etídio em *M.*
18 *smegmatis* e *M. avium* complex, porém menos evidente em *M. tuberculosis* (RODRIGUES
19 *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2012).

20 A reserpina é um alcalóide extraído da raiz de *Rauwolfia* sp, utilizado durante décadas
21 como um agente anti-hipertensivo (LEMIEUX *et al.*, 1956). Descrita também como um
22 bloqueador dos canais de cálcio (BALZER *et al.*, 1968), é um inibidor efetivo do efluxo de
23 PZA, aumentando a suscetibilidade do *M. tuberculosis* (ZHANG *et al.*, 1999), e da INH
24 frente ao *M. tuberculosis* e *M. bovis* BCG (VIVEIROS *et al.*, 2002). Estudo recente
25 demonstra que o farnezol é efetivo em bloquear o efluxo do BrEt em *M. smegmatis* (JIN *et*
26 *al.*, 2010).





5 **Figura 21:** Estrutura dos compostos com atividade de inibidor de efluxo em micobactérias.

6

7 **1.7.2) Abordagens para métodos utilizados na detecção do efluxo**

8

9 Técnicas de fluorimetria tem sido usada como uma ferramenta para o monitoramento

10 do transporte de substratos fluorescentes através da parede celular bacteriana, sendo

11 possível detectar e quantificar o efluxo com precisão e reprodutibilidade (HENDRIKSE *et*

12 *al.*, 2000; GREULICH, 2004; SCHUMACHER *et al.*, 2007; SHAPIRO, 2008). Várias

13 estratégias e métodos laboratoriais para esse propósito utilizam a medição de substratos

14 radiomarcados ou fluorescentes (MORTIMER & PIDDOCK, 1991; HENDRIKSE, 2000;

15 GREULICH, 2004; MARTINS *et al.*, 2006; SCHUMACHER *et al.*, 2007).

16 A utilização de ensaios funcionais baseia-se na capacidade dos sistemas de efluxo em

17 mover moléculas contra um gradiente de concentração, utilizando corantes fluorescentes

18 que atuam como substratos de bombas. Na presença de EPIs, estes substratos acumulam na

19 célula e aumentam a intensidade de fluorescência a ser detectada. Destacam-se dois tipos

20 de ensaios utilizando corantes fluorescentes comumente empregados: i) o ensaio de

21 acumulação que mede a absorção do substrato na presença ou ausência de EPIs conhecidos

22 e ii) o ensaio de retenção onde as células são marcadas com o substrato na ausência de

23 qualquer EPI. Ambos ensaios oferecem um maior rendimento, aumento da intensidade de

24 fluorescência e podem ser automatizados (KOURTESI *et al.*, 2013).

25 A fim de permitir a avaliação de EPIs frente a várias linhagens bacterianas, algumas

26 variações nos ensaios tem sido desenvolvidas. Dentre eles, o método de agar-base

27 empregando brometo de etídio (BrEt) em diferentes concentrações que pode avaliar até

28 doze linhagens bacterianas (MARTINS *et al.*, 2011) e o método em tempo real que avalia a

1 acumulação e o efluxo do BrEt em diferentes condições biológicas (temperatura, pH,
2 presença e ausência da fonte de energia), além da presença de EPIs (VIVEIROS *et al.*,
3 2010).

4 O BrEt tem sido um substrato amplamente utilizado em ensaios de efluxo, pois além de
5 ser considerado um substrato universal emite fraca fluorescência em soluções aquosas
6 (meio extracelular) e torna-se fortemente fluorescente em ambientes não-polares e
7 hidrofóbicos, quando excitado com luz ultravioleta (JERNAES & STEEN, 1994). O
8 princípio desses ensaios fluorométricos é a passagem de BrEt através da membrana
9 citoplasmática e da sua subsequente acumulação intracelular no interior da célula
10 bacteriana (AMARAL *et al.*, 2011). Assim, a intensidade de fluorescência do BrEt em
11 função do tempo, tem sido utilizado para o acompanhamento em tempo real da acumulação
12 via difusão passiva e do efluxo de substratos em suspensões bacterianas (JERNAES &
13 STEEN, 1994; JOUX & LEBARON, 2000).

14 Além disso, este método pode distinguir a acumulação, o que reflete o equilíbrio entre
15 o influxo e de efluxo, e o efluxo em si, além de ser indicado para o estudo da cinética do
16 transporte de EtBr (VIVEIROS *et al.*, 2008 a; PAIXÃO *et al.*, 2009). O efluxo ocorrerá
17 caso a concentração de BrEt no meio não superar a capacidade de atividade das bombas de
18 efluxo (VIVEIROS *et al.*, 2008A; VIVEIROS *et al.*, 2008B).

19

20 **1.8) Ensaios de combinação antimicrobiana *in vitro***

21

22 Para estabelecer a interação de diferentes compostos são utilizados métodos
23 quantitativos e reprodutivos a fim de estimar a atividade quando dois ou mais compostos
24 são combinados (BHUSAL *et al.*, 2005). O efeito da combinação pode restaurar a
25 atividade antimicrobiana de um ou mais compostos, devido ao sinergismo da interação. Os
26 métodos de combinação *in vitro* mais utilizados são os ensaios de *checkerboard* e/ou
27 tempo de morte (BHUSAL *et al.*, 2005; RODRIGUEZ-DÍAZ *et al.*, 2003; REY JURADO,
28 *et al.*, 2012).

29 Algumas definições básicas que resultam da interação de diferentes compostos são a
30 atividade sinérgica, indiferente e antagônica. O sinergismo é uma interação positiva
31 observada quando a combinação de dois ou mais compostos exerce um efeito
32 significativamente maior quando comparado com o efeito individual. Entretanto, o
33 antagonismo é uma interação negativa no qual o efeito combinado é menor que do que os
34 compostos testados separadamente (ELIOPOULOS & MOELLERING, 1996; ODDS,

1 2003). Caso não ocorra interação na combinação, o efeito é definido como indiferente
2 (GRECO *et al.*,1995).

3 4 **1.8.1) Ensaio de *Cheackerboard***

5
6 Ensaios fenotípicos para a detecção do efluxo são essencialmente baseados na inibição
7 do crescimento. São utilizados a fim de identificar se potenciais EPIs aumentam a eficácia
8 dos antimicrobianos através da redução da CMI. O ensaio de *cheackerboard* é o mais
9 comum e requer ambos compostos (antibióticos e EPIs) para serem diluídos em uma
10 variedade de concentrações e avaliar a viabilidade celular na interação (KOURTESI *et al.*,
11 2013).

12 O *cheackerboard* refere-se a um ensaio bidimensional de concentrações seriadas de
13 dois ou mais compostos frente ao microrganismo a ser testado (ODDS, 2003; CUENCA-
14 ESTRELLA, 2004). Realizado em uma microplaca de 96 poços, nas colunas cada poço
15 contém a mesma concentração de um composto A seguido de uma diluição ao longo do
16 “eixo x” e nas linhas cada poço contém a mesma concentração de um composto B diluído
17 no “eixo y” (Figura 22). O resultado é que cada poço contém a combinação dos dois
18 compostos (ELIOPOULOS & MOELLERING, 1996).

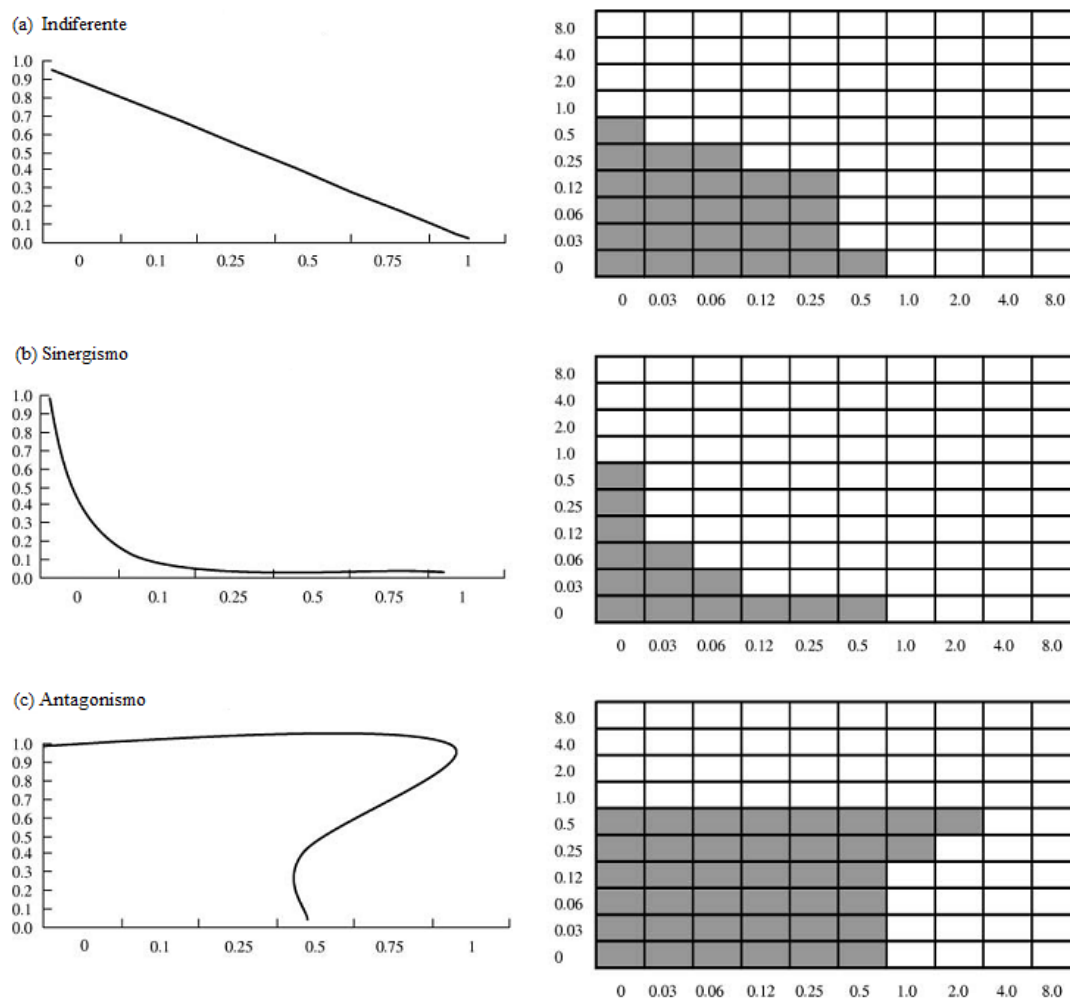
19 A vantagem deste método é a variedade de concentrações combinadas que podem ser
20 analisadas simultaneamente. Além disso, o método permite o cálculo do fator de
21 modulação (FM) que reflete a redução da CMI de um antibiotico em presença de EPI e
22 Índice de Concentração Inibitória Fracional (FICI) que distingue se dois compostos
23 combinados apresentam atividade sinérgicas, antagônicas ou indiferentes (ELIOPOULOS
24 & MOELLERING, 1991; KAMICKER *et al.*, 2008).

25 Os resultados das diluições utilizadas no *checkerboard* são interpretados num
26 isobograma, que mostra os FICIs numa escala aritmética (CUENCA-ESTRELLA, 2004).
27 O FICI é calculado conforme a seguinte fórmula:

$$28$$
$$29$$
$$30 \quad \text{FICI} = \text{FIC(A)} + \text{FIC (B)} = \frac{\text{CMI (A)combinação}}{\text{CMI (A)individual}} + \frac{\text{CMI (B)combinação}}{\text{CMI (B)individual}}$$
$$31$$

32 onde o FIC (A) e FIC (B) são as concentrações inibitórias fracionais dos fármacos A e
33 B, respectivamente (ELIOPOULOS & MOELLERING, 1996).

1 Seguindo a descrição de ELIOPOULOS & MOELLERING (1996), a redução de duas
 2 diluições sobre o CMI individual é interpretada como sinergismo se os valores de FICI são
 3 $\leq 0,5$; valores entre 0,5 a 1 são indiferentes e um FICI >1 é considerado como atividade
 4 antagônica. Esta interpretação está relacionada à combinação de compostos, onde há uma
 5 redução do CMI combinado em relação ao CMI individual. O estudo do efeito combinado
 6 de diferentes compostos em diferentes concentrações pode auxiliar no desenvolvimento de
 7 novas alternativas para o tratamento da TB.



8
 9 **Figura 22:** Ensaio de *checkerboard*. A ilustração é a combinação de dois agentes
 10 antimicrobianos em diluição seriada. À esquerda os isobogramas de efeito indiferente,
 11 sinérgico e antagônico. A área escura à direita indica o crescimento bacteriano.

12 1.9) Métodos utilizados para testes de sensibilidade aos fármacos

13

14 Em bacteriologia, o "padrão ouro" para o teste de sensibilidade aos fármacos é o ensaio
 15 da CMI. Este procedimento é definido por dois fatores: (1) a concentração do antibiótico,
 16 ou seja, uma série de diluições avaliadas para titular a quantidade mínima de fármaco

1 necessária para inibir o crescimento bacteriano *in vitro*; (2) o inóculo e as condições de
2 teste são escolhidas de modo que uma única célula resistente na população testada (1 em
3 10^5 bactérias) é suficiente para dar um resultado positivo para a resistência (BÖTTGER,
4 2011- B).

6 **1.9.1) Métodos clássicos**

7
8 O uso de testes *in vitro* de determinação de sensibilidade do *M. tuberculosis* aos
9 antibióticos é fundamental para detectar cepas resistente. A sensibilidade do *M.*
10 *tuberculosis* aos fármacos pode ser avaliada pelo método das concentrações absolutas,
11 método da razão de resistência e o método das proporções. Estes métodos são de baixo
12 custo, realizados em meio sólido a base de ovo ou ágar e padronizados para a realização de
13 testes de sensibilidade a múltiplos fármacos. Entretanto, apresentam uma desvantagem em
14 exigir até oito semanas para produzir uma confirmação de crescimento micobacteriano
15 (BRASIL, 2008).

16 O método das proporções em meio Lowenstein Jensen (LJ) é o mais comum teste de
17 sensibilidade aos antimicrobianos, tendo sido considerado ao longo dos anos o padrão ouro
18 para detectar a resistência aos antibióticos em *M. tuberculosis*. Essa resistência é
19 estabelecida a nível de 1%, isto significa que, se 1% ou mais do total da população de teste
20 bacteriana é resistente a um fármaco, é considerado como resistente para fins clínicos
21 (INDERLIED & NASH, 1996). Esta técnica pode ser realizada diretamente a partir de
22 escarro positivo à baciloscopia (teste direto) ou a partir do isolado bacteriano (teste
23 indireto) (BRASIL, 2008).

24 O método da concentração absoluta consiste em inocular meios, com ou sem
25 antimicrobianos, com um inóculo controlado contendo 2×10^3 a 1×10^4 CFU (CANETTI *et*
26 *al.*, 1963). A resistência é definida como um crescimento maior do que um determinado
27 número de CFU (usualmente 20) a uma determinada concentração de fármaco
28 (INDERLIED & NASH, 1996).

29 O método da razão de resistência é similar ao da concentração absoluta, a diferença é
30 que uma série idêntica de tubos são inoculados com a cepa padrão de *M. tuberculosis*
31 H₃₇Rv. Os resultados são expressos em termos da razão da CMI do fármaco necessária
32 para inibir o crescimento do isolado clínico comparado com a cepa padrão. A vantagem é
33 que pequenas variações entre os lotes dos meios podem ser desconsideradas, pois os
34 resultados são normalizados usando a cepa H₃₇Rv (INDERLIED & NASH, 1996).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

1.9.2) Métodos semi-automatizados

A introdução de sistemas semi-automatizados revolucionou os testes de sensibilidade em laboratórios de micobacteriologia. Os métodos são baseados em meios de cultura líquido e apresentam vantagem por reduzir o tempo de incubação, pela padronização do inóculo e pela obtenção dos resultados através da leitura automatizada. Estes sistemas comerciais seguem o mesmo princípio do método das proporções, utilizando concentrações de fármacos com atividade equivalente, proporções críticas de mutantes resistentes e inóculo padronizado.

1.9.2.1) Sistema BACTEC 460 TB

É um sistema radiométrico semi-automatizado que utiliza meio líquido Middlebrook 7H9 modificado. Foi o primeiro método semi-automatizado a ser utilizado, gerando resultados de teste de sensibilidade aos fármacos em 5 a 12 dias de incubação (TENOVER *et al.*, 1993).

Em 1969, Deland e Wagner desenvolveram esta técnica para a detecção da viabilidade bacteriana mensurando o CO₂ liberado durante o metabolismo celular e a descarboxilação de um substrato marcado com ¹⁴C incorporado no meio de cultivo. Em 1980, esta técnica foi introduzida comercialmente para a realização de testes de sensibilidade e recuperação de micobactérias a partir de amostras clínicas (SIDDIQI & RÜSCH-GERDES, 2006). Este sistema apresenta uma alta eficiência devido ao uso de meio líquido, mas está em descontinuidade pelo uso da radioatividade.

1.9.2.2) BACTEC™ MGIT™

Em laboratórios clínicos, o sistema radiométrico foi substituído pelo sistema MGIT (*Mycobacterium Growth Indicator Tube*). É um sistema semi-automatizado para a detecção do crescimento micobacteriano e realização de testes de sensibilidade. É considerado equivalente ao sistema BACTEC 460 em performance, com a vantagem de

1 não usar radioisótopos e sua compatibilidade com os sistemas informatizados para a
2 interpretação dos resultados (TORTOLI *et al.*, 2002; LUCKE *et al.*, 2012).

3 O tempo de detecção (*Time to detection*, TTD) do crescimento para a positividade da
4 amostra clínica em BACTEC MGIT varia de 5 a 14 dias quando comparado com métodos
5 tradicionais em meio sólido, como por exemplo LJ – 3 a 5 semanas (SIDDIQI & RÜSCH-
6 GERDES, 2006). Os tubos MGIT contêm um composto fluorescente incorporado na base
7 do tubo, o qual é sensível à presença de oxigênio dissolvido no meio. Sendo assim, os
8 microrganismos com metabolismo ativo consomem o oxigênio, o que ocasiona a elevação
9 da emissão da fluorescência e a sua detecção pelo equipamento. Além disso, o instrumento
10 estabelece uma leitura contínua de todos os tubos a cada 60min (MLM, 2014).

11 O teste de sensibilidade aos fármacos consiste em um tubo de controle de crescimento
12 e um tubo para cada fármaco. Uma concentração padronizada de fármaco é adicionada a
13 um tubo MGIT, juntamente com o inóculo, e o crescimento é comparado com o controle
14 sem fármaco. Se o antibiótico é ativo contra o isolado micobacteriano (isolado suscetível),
15 o crescimento será inibido e a fluorescência será suprimida. Enquanto isso, o controle livre
16 de antibiótico apresentará crescimento, e conseqüente, aumento da fluorescência. Se o
17 isolado é resistente, o crescimento e o aumento na fluorescência será evidente em ambos os
18 tubos – com antibiótico e sem antibiótico. Um isolado é definido como resistente se 1% ou
19 mais da população teste cresce na presença de concentrações críticas dos antibióticos
20 (MLM, 2014).

21

22

23

24

25

26

27

28

29 **2. OBJETIVOS**

30

31 **2.1. Geral**

32

33 Avaliar a contribuição do mecanismo de efluxo na resistência em isolados clínicos de
34 *M. tuberculosis* resistentes a isoniazida, rifampicina, ofloxacina e amicacina.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

2.2. Específicos

- Avaliar o efeito sinérgico na interação dos clássicos inibidores de bombas de efluxo (verapamil, tioridazina e clorpromazina) com INH, RIF, OFX, AMK e brometo de etídio em isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes;
- Analisar em tempo real a atividade do efluxo, em presença e ausência dos inibidores em isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes;
- Determinar o nível transcricional de RNAm de cinco genes que codificam bombas de efluxo (*mmp17*, *mmr*, Rv1258, *p55*, *efpA* e Rv2459) e do regulador transcricional do efluxo (*whib7*) nas cepas resistentes em presença e ausência de concentrações subinibitórias dos fármacos;
- Avaliar a contribuição da atividade de efluxo na resistência global a INH, RIF, OFX e AMK através da análise da relação do tempo de detecção (TTD) do crescimento em presença e ausência dos inibidores.

3. RESULTADOS: CAPÍTULO I

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

Enhancement of antibiotic activity by efflux inhibitors against multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil

Artigo publicado na *Frontiers in Microbiology* – Fator de Impacto 3,9

Autores

Tatiane Coelho^{1,2#}, Diana Machado^{3,4#}, Isabel Couto^{3,4}, Raquel Maschmann^{1,2}, Daniela Ramos⁵, Andrea von Groll⁵, Lucia Rossetti^{1,2}, Pedro E. Silva^{5†} and Miguel Viveiros^{3,4}

Enhancement of antibiotic activity by efflux inhibitors against multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Marta Martins,
University College Dublin, Ireland

Reviewed by:

Noton Kumar Dutta,
Johns Hopkins University, USA
Paras Jain,
Albert Einstein College of Medicine,
USA
Giovanna Riccardi,
University of Pavia, Italy

*Correspondence:

Miguel Viveiros,
Grupo de Micobactérias, Unidade de
Microbiologia Médica, Global Health
and Tropical Medicine, Instituto de
Higiene e Medicina Tropical,
Universidade Nova de Lisboa, Rua da
Junqueira 100, 1349-008 Lisboa,
Portugal
mviveiros@ihmt.unl.pt

† These authors have contributed
equally to this work.

‡ These authors share the senior
authorship.

Specialty section:

This article was submitted to
Antimicrobials, Resistance and
Chemotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 11 February 2015

Accepted: 01 April 2015

Published: 28 April 2015

Citation:

Coelho T, Machado D, Couto I,
Maschmann R, Ramos D, von Groll A,
Rossetti ML, Silva PA and Viveiros M
(2015) Enhancement of antibiotic
activity by efflux inhibitors against
multidrug resistant *Mycobacterium
tuberculosis* clinical isolates from
Brazil. *Front. Microbiol.* 6:330.
doi: 10.3389/fmicb.2015.00330

Tatiane Coelho^{1,2†}, Diana Machado^{3†}, Isabel Couto³, Raquel Maschmann^{1,2},
Daniela Ramos⁴, Andrea von Groll⁴, Maria L. Rossetti^{1,2}, Pedro A. Silva^{4‡} and
Miguel Viveiros^{3*‡}

¹Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Porto Alegre, Brazil, ²Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, ³Grupo de Micobactérias, Unidade de Microbiologia Médica, Global Health and Tropical Medicine, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal, ⁴Faculdade de Medicina, Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brazil

Drug resistant tuberculosis continues to increase and new approaches for its treatment are necessary. The identification of *M. tuberculosis* clinical isolates presenting efflux as part of their resistant phenotype has a major impact in tuberculosis treatment. In this work, we used a checkerboard procedure combined with the tetrazolium microplate-based assay (TEMA) to study single combinations between antituberculosis drugs and efflux inhibitors (EIs) against multidrug resistant *M. tuberculosis* clinical isolates using the fully susceptible strain H37Rv as reference. Efflux activity was studied on a real-time basis by a fluorometric method that uses ethidium bromide as efflux substrate. Quantification of efflux pump genes mRNA transcriptional levels were performed by RT-qPCR. The fractional inhibitory concentrations (FIC) indicated synergistic activity for the interactions between isoniazid, rifampicin, amikacin, ofloxacin, and ethidium bromide plus the EIs verapamil, thioridazine and chlorpromazine. The FICs ranged from 0.25, indicating a four-fold reduction on the MICs, to 0.015, 64-fold reduction. The detection of active efflux by real-time fluorometry showed that all strains presented intrinsic efflux activity that contributes to the overall resistance which can be inhibited in the presence of the EIs. The quantification of the mRNA levels of the most important efflux pump genes on these strains shows that they are intrinsically predisposed to expel toxic compounds as the exposure to subinhibitory concentrations of antibiotics were not necessary to increase the pump mRNA levels when compared with the non-exposed counterpart. The results obtained in this study confirm that the intrinsic efflux activity contributes to the overall resistance in multidrug resistant clinical isolates of *M. tuberculosis* and that the inhibition of efflux pumps by the EIs can enhance the clinical effect of antibiotics that are their substrates.

Keywords: tuberculosis, drug resistance, fluorometry, checkerboard, TEMA, fractional inhibitory concentration

Introduction

Tuberculosis (TB) remains a public health issue worldwide (World Health Organization, 2014). According to the World Health Organization (2013) there were an estimated 9.0 million tuberculosis cases and 480,000 people developed multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). Among these there were an estimated 210,000 deaths (World Health Organization, 2014). The TB control is severely complicated by the emergence of multi- and extensively drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. Multidrug resistant *M. tuberculosis* is recognized as *M. tuberculosis* strains resistant to at least isoniazid and rifampicin, and extensively drug resistant (XDR) *M. tuberculosis* as those resistant to isoniazid, rifampicin, a fluoroquinolone and one of the three second line injectables: amikacin, kanamycin, or capreomycin (World Health Organization, 2008). *M. tuberculosis* strains that are resistant to isoniazid and rifampicin and either a fluoroquinolone or an aminoglycoside, but not both, are colloquially termed “pre-XDR-TB” strains.

Despite the known effectiveness of the antituberculosis standard treatment against susceptible strains of *M. tuberculosis*, the first-line drugs isoniazid and rifampicin are ineffective for treating patients infected with multidrug resistant strains. Consequently, second-line drugs have to be employed. These drugs are more toxic, poorly tolerated, and sometimes difficult to obtain (Green and Garneau-Tsodikova, 2013). Furthermore, extensively drug resistant *M. tuberculosis* strains easily emerge during second-line treatment due to poor tolerance and lack of compliance (World Health Organization, 2008). The emergence and spread of resistant phenotypes of *M. tuberculosis* are nowadays a major health problem due to the reduced therapeutic options, high mortality rates and danger to the community if transmission of the bacillus is not readily stopped (World Health Organization, 2013).

Intrinsic resistance of *M. tuberculosis* to antimicrobial agents is mainly attributed to the reduced permeability of the cell wall due to the lipid-rich composition and the presence of mycolic acids that considerably decreases the intracellular access of antibiotics (Brennan and Nikaido, 1995). However, it cannot prevent completely their entrance. Other intrinsic mechanisms of resistance, such as efflux pumps, act synergistically with the permeability barrier to reduce the passage of antimicrobials across the bacterial cell wall (De Rossi et al., 2006; Piddock, 2006; Li and Nikaido, 2009). Efflux pumps usually confer low levels of drug resistance but play an important role in the evolution to high levels of resistance in *M. tuberculosis* (Machado et al., 2012). Prolonged exposure to subinhibitory concentrations of antituberculosis drugs facilitate the progressive acquisition of chromosomal mutations and provide the natural ground for the development of bacteria with high-level resistance phenotypes due to the acquisition of mutations in the antibiotic target. This chain of events is particularly relevant in long-term therapies such as that used in tuberculosis treatment, where a sustained pressure of sub-inhibitory concentrations of antibiotics can result in an increased efflux activity and allow the selection of spontaneous high-level drug resistant mutants (Machado et al., 2012; Schmalstieg et al., 2012).

A possible alternative to prevent the resistance generated by efflux is the chemical inhibition of these systems by molecules that act as inhibitors, the so called efflux inhibitors (EIs) that can act as treatment adjuvants to increase the activity of the antibiotics (Marquez, 2005). Such molecules are expected to reduce the intrinsic resistance of the bacteria by increasing the intracellular concentration of antibiotics even in highly resistant strains and reduce the frequency of emergence of resistant mutant strains (Mahamoud et al., 2007; Viveiros et al., 2010). The net result of blocking the efflux of an antimicrobial compound by the use of an EI is to decrease the threshold concentration (i.e., the minimum inhibitory concentration, MIC) of the antibiotic when the EI is used at concentrations devoid of any antibacterial activity. Many compounds have been reported as having inhibitory activity on mycobacterial efflux systems such as calcium channel blockers like verapamil, thioridazine, chlorpromazine, farnesol, reserpine, or uncouplers of the proton motive force such as carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP) (Viveiros et al., 2012), but none has evolved toward clinical usage.

So far no MDR clinical strain was identified with high-level resistance attributed solely to overexpressed efflux pumps and the contribution of these systems to the overall level of resistance in MDR-TB clinical strains, irrespective of the existing mutations for drug targets in the bacteria, has not been thoroughly explored. In the present study we have explored the contribution of the efflux mechanisms to the overall resistance to isoniazid, rifampicin, amikacin and ofloxacin in five MDR (two of which pre-XDR) *M. tuberculosis* clinical isolates from Brazil by (i) the analysis of the synergistic effect of the EIs verapamil, thioridazine and chlorpromazine on the MICs of the antibiotics and ethidium bromide by a tetrazolium microplate-based assay (TEMA) on checkerboard format; (ii) the analysis of real-time efflux activity, using ethidium bromide as efflux substrate, by a semi-automated fluorometric method in presence and absence of each EI; and (iii) the analysis of mRNA transcriptional levels of selected efflux pump genes in these strains.

Materials and Methods

M. tuberculosis Strains, Its Characterization, and Selection Criteria

The *M. tuberculosis* strains included in this study were selected from the culture collection of the Mycobacteria Laboratory of Interdisciplinary Area of Biomedical Sciences, Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica (NUPEMM), Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande, Brazil, and Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. The strains were previously characterized using the proportion method on Löwenstein-Jensen for isoniazid, rifampicin, amikacin, and ofloxacin, and DNA sequencing to search for mutations associated with resistance (data not shown) (Maschmann et al., 2013). The strains to be studied were chosen based upon their resistance to isoniazid, rifampicin, amikacin and ofloxacin and presence of the most common mutations found in clinical

isolates. The sampling comprises five multidrug resistant strains (three resistant to isoniazid and rifampicin; one resistant to isoniazid, rifampicin and amikacin; one resistant to isoniazid, rifampicin and ofloxacin—the two latest colloquially considered pre-XDR), whose phenotypic and genotypic characterization is shown in Table 1. The *M. tuberculosis* H37Rv ATCC27294 reference strain was used as control.

Antimicrobials, Efflux Inhibitors, and Ethidium Bromide

Isoniazid, rifampicin, ofloxacin, amikacin, chlorpromazine, thioridazine, verapamil, ethidium bromide, glucose, phosphate buffered solution (PBS), and 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Verapamil, chlorpromazine, thioridazine, isoniazid, amikacin, and ethidium bromide were prepared in sterile distilled water; rifampicin was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO), and ofloxacin in 1% hydroxide chloride in water. Stock solutions were stored at -20°C . The work solutions were prepared at the day of the experiments. The 10X MTT stock solution was prepared in ultrapure sterile water and used at 1:1 in 10% Tween 80 (v/v).

Determination of Minimum Inhibitory Concentrations (MIC)

For the determination of the MICs of the antibiotics, EIs, and the efflux substrate ethidium bromide, the strains were grown in Middlebrook 7H9 (DIFCO, Madrid, Spain) plus 10% OADC supplement (oleic acid/albumin/dextrose/catalase) (Becton and Dickinson, Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA) at 37°C until they reached an OD_{600} of 0.8. Afterwards, the inoculum was prepared by diluting the bacterial cultures in 7H9/OADC medium to a final density of approximately 10^5 cells/ml (Eliopoulos and Moellering, 1996). The MICs were determined by a TEMA (Caviedes et al., 2002) with slight modifications. Briefly, aliquots of 0.1 ml of inoculum were transferred to each well of the plate that contained 0.1 ml of each compound at concentrations prepared from two-fold serial dilutions in 7H9/OADC medium. The concentration ranges used are shown in Table S1 of the Supplementary data. Growth controls with no drug and a sterility control were included in each plate assay. Two hundred microliters of sterile deionized water was added to all

outer-perimeter wells of the 96-well plates to reduce evaporation of the medium in the wells during the incubation. The inoculated plates were sealed in plastic bags and incubated at 37°C for 7 days. After this period, MTT was added to each well to a final concentration of 2.5% and the plates incubated overnight. The bacterial viability was registered for each well based on the MTT color change. Here, the amount of color generated is directly proportional to the number of viable cells and a precipitate of cells stained black can be observed in the bottom of the well. The MIC was defined as the lowest concentration of compound that totally inhibited bacterial growth (Gomez-Flores et al., 1995). All assays were carried out in triplicate.

Determination of Fractional Inhibitory Concentration (FIC) and Modulation Factor (MF)

Two-dimensional broth microdilution checkerboard assay (Eliopoulos and Moellering, 1996) combined with TEMA, was performed to assess the effect of the EIs verapamil, thioridazine and chlorpromazine in combination with isoniazid, rifampicin, amikacin and ofloxacin against the *M. tuberculosis* strains. Two hundred microliters of sterile deionized water was added to all outer-perimeter wells of the plates to prevent evaporation of the medium during the incubation. The plates were prepared by dispensing the serially diluted antibiotic in the x-axis and the inhibitors in the y-axis. The concentration range used for each compound is shown in Table S2. Aliquots of 0.1 ml of inoculum were transferred to each well of the 96-well plate and incubated at 37°C . In all assays were included growth and sterility controls. The inoculated plates were sealed in plastic bags and incubated at 37°C for 7 days and the results interpreted as described above. The modulation factor (MF) was used to quantify the effect of the inhibitors on the MIC of antibiotics and ethidium bromide (Formula 1) (Gröblacher et al., 2012). The modulation factor reflects the reduction of MIC values of a given antibiotic in the presence of the efflux inhibitor and was considered to be significant when $\text{MF} \geq 4$ (four-fold reduction). The effect of each efflux inhibitor on the activity of each antibiotic was determined by means of fractional inhibitory concentration (FIC) determination according to Formula 2. The FIC was calculated only for the antibiotic as the concentration of the efflux inhibitor to be used in each combination corresponds to $\leq \frac{1}{4}$ of its MIC, which is considered to be devoid of antibacterial

TABLE 1 | Phenotypic and genotypic characterization of the *M. tuberculosis* strains.

Strain	Phenotype	Genotype				
		<i>katG</i>	<i>inhA</i>	<i>rpoB</i>	<i>gyrA</i>	<i>rrs</i>
FURG-1	MDR	S315T	Wt	S531L	Wt	Wt
FURG-2	MDR	S315T	Wt	S531L	Wt	Wt
FURG-3	MDR	S315T	Wt	S531L	Wt	Wt
FURG-4	MDR	S315T	Wt	D516Y	A90V	Wt
FURG-5	MDR	D735A	Wt	S531L	Wt	A>G 1401
H37Rv	Susceptible	Wt	Wt	Wt	Wt	Wt

MDR, multidrug resistant; R, resistant; Wt, wild-type.

activity. The FIC indexes were interpreted using the criteria established by Pillai et al. (2005). However, since we are only evaluating the individual FIC for the antibiotic and not the sum of the FICs, or FIC index ($\Sigma FIC_{\text{antibiotic}}$), the results were interpreted as follows: $FIC \leq 0.25$, synergism; $FIC > 0.25 < 2$, indifference and $FIC \geq 2$, antagonism. As such, an individual FIC of ≤ 0.25 , indicative of a four-fold reduction, was assumed as synergy. We considered $FIC > 0.25$ as indifferent activity due to the inherent variability of the method (Odds, 2003). The FIC for the combinations was classified as ND (non-determinable) when the MICs of the compounds alone were greater than the highest, less than, or equal to the lowest concentration tested (Moody, 1992). For combinations that showed tendencies for synergy, isobolograms were constructed, by plotting changes in the MIC of antibiotics as a function of the EIs concentration, using GraphPad Prism V5.01 software (La Jolla, USA). Synergy is illustrated by a concave isobol and antagonism, by a convex isobol. All assays were carried out in triplicate.

$$MF = \frac{MIC_{\text{antibiotic}}}{MIC_{\text{combination}}}$$

Formula 1. Modulation factor (MF) determination. $MIC_{\text{antibiotic}}$ corresponds to the MIC of the antibiotic; $MIC_{\text{combination}}$ corresponds to the MIC of the antibiotic in the presence of efflux inhibitor.

$$FIC_{\text{antibiotic}} = \frac{MIC_{\text{combination}}}{MIC_{\text{alone}}}$$

Formula 2. Fractional inhibitory concentration (FIC) determination. $MIC_{\text{combination}}$ corresponds to the MIC determined in the presence of the antibiotic and the inhibitor; MIC_{alone} corresponds to the MIC of the antibiotic alone.

Evaluation of Efflux Activity by Real-time Fluorometry

The assessment of efflux activity on a real-time basis was performed using a semi-automated fluorometric method, as previously described (Viveiros et al., 2010; Machado et al., 2012). The *M. tuberculosis* strains were grown in 10 ml of 7H9/OADC with 0.05% Tween 80 at 37°C until they reach an OD_{600} of 0.8. For the accumulation assays, the cultures were centrifuged at 3500 rpm for 3 min, the supernatant discarded and the pellet washed in PBS. The OD_{600} was adjusted to 0.8 with PBS. In order to determine the concentration of ethidium bromide that establish the equilibrium between efflux and influx, aliquots of 0.05 ml of the bacterial suspension were added to 0.2 ml microtubes containing 0.05 ml different concentrations of ethidium bromide that ranged from 0.625 to 3 µg/ml with and without 0.4% glucose. The assays were conducted at 37°C in a Rotor-Gene 3000™ (Corbett Research, Sydney, Australia), using the 530 nm band-pass and the 585 nm high-pass filters as the excitation and detection wavelengths, respectively. Fluorescence data was acquired every 60 s for 60 min. The selected concentration of ethidium bromide was further used for the evaluation of the capacity of the EIs to retain ethidium bromide inside the cells. The EIs verapamil, thioridazine and

chlorpromazine were tested at ½ MIC with and without 0.4% glucose and ethidium bromide at the equilibrium concentration determined for each strain and the assays performed like described above. The inhibitory activity of the compounds was determined by the calculation the relative final fluorescence (RFF) value according to Formula 3 (Machado et al., 2011):

$$RFF = \frac{RF_{\text{treated}} - RF_{\text{untreated}}}{RF_{\text{untreated}}}$$

Formula 3. Relative final fluorescence (RFF) determination. RF_{treated} corresponds to the relative fluorescence at the last time point of EtBr accumulation curve (minute 60) in the presence of an inhibitor; and the $RF_{\text{untreated}}$ corresponds to the relative fluorescence at the last time point of the EtBr accumulation curve of the untreated control tube. EtBr, ethidium bromide.

For the efflux assays, strains were exposed to conditions that promote maximum accumulation of ethidium bromide, i.e., ethidium bromide equilibrium concentration for each strain, no glucose, presence of the efflux inhibitor that caused maximum accumulation (in all cases verapamil), and incubation at 25°C for 1 h (Viveiros et al., 2010). Before incubation, the cultures were centrifuged at 3500 rpm for 3 min, resuspended in PBS, centrifuged again and OD_{600} adjusted to 0.4. The suspension was incubated with ethidium bromide and verapamil under the conditions described above. Aliquots of 0.05 ml of cells were transferred to 0.2 ml microtubes containing 0.05 ml of each efflux inhibitor at ½ MIC without ethidium bromide. Control tubes with only cells and cells with and without 0.4% glucose were included. Fluorescence was measured in the Rotor-Gene™ 3000 and data was acquired every 30 s for 30 min. Efflux activity was quantified by comparing the fluorescence data obtained under conditions that promote efflux (presence of glucose and absence of efflux inhibitor) with the data from the control in which the mycobacteria are under conditions of no efflux (presence of an inhibitor and no energy source). Thus, the relative fluorescence corresponds to the ratio of fluorescence that remains per unit of time, relatively to the ethidium bromide-loaded cells.

RNA Isolation, RT-qPCR, and Quantification of Efflux Pump mRNA Levels

Total RNA from *M. tuberculosis* cultures was extracted using the RNeasy Mini kit (QIAGEN, GmbH, Hilden, Germany) as previously described (Machado et al., 2012). The concentration and quality of total RNA was measured using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, USA). The primers sequences used for the analysis of the efflux genes *mmpL7*, *mmr*, *Rv1258c*, *p55*, *Rv2469*, *efpA*, and the transcriptional regulator *whiB7* are described in Table 2. The RT-qPCR assay was performed in a Rotor-Gene™ 3000 thermocycler and followed the protocol recommended for use with the QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (QIAGEN) with the following amplification program: reverse transcription for 30 min at 50°C; initial activation step for 15 min at 95°C; 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 52°C for 30 s and extension at 72°C for 30 s; a final extension step at 72°C for 5 min; and an additional step at 50°C for 15 s followed

TABLE 2 | Primers used in this study.

Gene	Primer Sequence (5'-3')	Amplification product (bp)	References
16S_Fw	CAA GGC TAA AAC TCA AAG GA	197	Rodrigues et al., 2012
16S_Rv	GGA CTT AAC CCA ACA TCT CA		
<i>mmpL7</i> _Fw	TAC CCA AGC TGG AAA CAA	214	
<i>mmpL7</i> _Rv	CCG TCA GAA TAG AGG AAC CAG		
<i>p55</i> _Fw	AGT GGG AAA TAA GCC AGT AA	198	
<i>p55</i> _Rv	TGG TTG ATG TCG AGC TGT		
<i>efpA</i> _Fw	ATG GTA ATG CCT GAC ATC C	131	
<i>efpA</i> _Rv	CTA CGG GAA ACC AAC AAA G		
<i>mmr</i> _Fw	AAC CAG CCT GCT CAA AAG	221	
<i>mmr</i> _Rv	CAA CCA CCT TCA TCA CAG A		
<i>Rv1258c</i> _Fw	AGT TAT AGA TCG GCT GGA TG	268	
<i>Rv1258c</i> _Rv	GTG CTG TTC CCG AAA TAC		
<i>Rv2459</i> _Fw	CAT CTT CAT GGT GTT CGT G	232	Machado et al., 2012
<i>Rv2459</i> _Rv	CGG TAG CAC ACA GAC AAT AG		
<i>whiB7</i> _Fw	TCG AGG TAG CCA AGA CAC T	109	Machado, 2014
<i>whiB7</i> _Rv	TCG AAT ATC TCA CCA CCC CA		

Fw, forward; Rv, reverse.

by melt analysis (50–99°C). The quantification of the relative mRNA levels of the genes in the strains exposed and non-exposed to subinhibitory concentrations of the antibiotics was performed using the standard curve method (Bustin, 2000). Standards consisted of known numbers of molecules prepared from cDNA PCR products of the target genes. The PCR products were purified by gel extraction (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN), quantified by spectrophotometry and the molecular weight determined. The number of molecules/ μ l of the standards was calculated according to the following **Formula 4** (Yin et al., 2001):

$$\text{molecules}/\mu\text{l} = \frac{6.023 \times 10^{23} \times C \times OD_{260}}{MW}$$

Formula 4. Quantification of mRNA copy number. In this formula, *C* corresponds to 50 ng/ μ l for DNA and *MW*, to the molecular weight of the target gene.

To generate the standard curve, each RNA sample was successively diluted in nuclease-free water, the *C_t*-values of each dilution measured in triplicate, plotted against the logarithm of their initial template copy numbers and the *R*² obtained to evaluate the performance of the assay. The PCR amplification efficiency was controlled by the slope of the standard curve. To compensate variations in the input RNA and efficiency of the reverse transcription step, the results were normalized against the *M. tuberculosis* 16S rDNA reference gene. Data is presented as the *n*-fold difference relative to the control (non-exposed condition or, when necessary, the reference strain) plus standard deviation (\pm SD).

Results

Evaluation of the Synergistic Effect between Efflux Inhibitors and Antibiotics

The MICs of the antibiotics isoniazid, rifampicin, amikacin and ofloxacin, the efflux substrate ethidium bromide, as well as the MICs of the EIs verapamil, thioridazine, and chlorpromazine, for each of the strains enrolled in this study, are given in **Table 3**. The FICs and MF obtained for each combination are listed in **Table 4**. All the multidrug resistant strains (*n* = 5) presented high-level resistance to isoniazid (5/5) and high- (4/5) and intermediate-level resistance to rifampicin (1/5). High-level resistance to ofloxacin was observed in one multidrug resistant strain, FURG-4. Resistance to amikacin (high-level) was detected only in one multidrug resistant strain, FURG-5. A mutation associated with the resistant phenotype was identified in all five multidrug resistant strains (**Table 1**). The combination between the antibiotics and the EIs tested at $\frac{1}{2}$ of its MIC consistently produced non-determinable FICs since the combination interaction was always below the concentration range tested (see Tables S1, S2). This data indicates that the effect of these compounds at $\frac{1}{2}$ of MIC, as commonly tested in the literature and in previous works of our group (Viveiros et al., 2010), is due to its antibacterial effect and not due exclusively to the inhibition of efflux activity (Machado, 2014). As such, for a more accurate and precise analysis of the effect of the EIs on the MIC values of the antibiotics and efflux substrate, the results were compared at $\frac{1}{4}$ MIC of each efflux inhibitor, where all the FICs (for all the strains) are inside the concentration range tested (**Tables 3, 4**).

As can be seen in **Table 4**, the MIC values of isoniazid were reduced (MF \geq 3) in 2/5 multidrug resistant strains (FURG-1 and -2) by the three inhibitors, and in 1/5 only by chlorpromazine (FURG-4). For this last strain, the FIC result indicated a synergist effect. For strain FURG-5, none of the inhibitors was able to reduce the high-level resistance to isoniazid (MIC of 512 μ g/ml). For H37Rv, the MIC for isoniazid was reduced by all the inhibitors originating a FIC of 0.25 indicative of synergism. Concerning rifampicin resistance, the MIC values were reduced with verapamil in all rifampicin resistant strains by four-fold (2/5), eight-fold (1/5), 32-fold (1/5), and 64-fold (1/5). Thioridazine was able to reduce the MIC of rifampicin in 2/5 strains and chlorpromazine in 1/5. Of note, strain FURG-4, which displays intermediate level of resistance to rifampicin and harbors a rare mutation on codon 516, was the strain for which the resistance to rifampicin was reduced in the presence of the three inhibitors to levels similar of that of the susceptible H37Rv reference strain (**Table 4**). The MIC for rifampicin of the susceptible H37Rv reference strain was reduced four-fold only by verapamil. Resistance to amikacin was found in strain FURG-5 to which the MIC was reduced four-fold with chlorpromazine. For the amikacin susceptible strains the MIC values were reduced by two- to four-fold depending on the strain. Resistance to ofloxacin was reduced only in strain FURG-2 by four-fold with verapamil and thioridazine. Concerning ethidium bromide, the MIC values were reduced in all strains with verapamil by four- to 16-fold, and with thioridazine and chlorpromazine by four- to eight-fold in 4/6 and 2/6 strains, respectively. The FICs determined for the

TABLE 3 | Minimum inhibitory concentrations of the antibiotics, efflux inhibitors, and ethidium bromide for the *M. tuberculosis* strains.

Strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$)							
	INH	RIF	AMK	OFX	VP	TZ	CPZ	EtBr
FURG-1	10	2048	2	1	512	15	15	8
FURG-2	10	1024	2	2	512	15	30	8
FURG-3	5	1024	1	1	512	15	15	4
FURG-4	5	16	2	16	512	15	30	4
FURG-5	512	1024	640	1	512	15	30	8
H37Rv	0.1	0.5	2	2	512	15	15	4

INH, isoniazid; RIF, rifampicin; AMK, amikacin; OFX, ofloxacin; VP, verapamil; TZ, thioridazine; CPZ, chlorpromazine; EtBr, ethidium bromide.

TABLE 4 | Synergistic activity of the efflux inhibitors in combination with antituberculosis drugs against the *M. tuberculosis* strains.

Antibiotics	EIs	Strains																	
		FURG-1			FURG-2			FURG-3			FURG-4			FURG-5			H37Rv		
		MIC ($\mu\text{g/ml}$)	FIC	MF	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	FIC	MF	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	FIC	MF	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	FIC	MF	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	FIC	MF	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	FIC	MF
INH	No EI	10	-	-	10	-	-	5	-	-	5	-	-	512	-	-	0.1	-	-
	+VP ¼	3	0.3	3	3	0.3	3	3	0.6	2	5	1	1	512	1	1	0.025	0.25	4
	+TZ ¼	3	0.3	3	3	0.3	3	3	0.6	2	5	1	1	512	1	1	0.025	0.25	4
	+CPZ ¼	3	0.3	3	3	0.3	3	3	0.6	2	1.25	0.25	4	512	1	1	0.025	0.25	4
RIF	No EI	2048	-	-	1024	-	-	1024	-	-	16	-	-	1024	-	-	0.5	-	-
	+VP ¼	512	0.25	4	256	0.25	4	16	0.015	64	0.5	0.03	32	128	0.125	8	0.125	0.25	4
	+TZ ¼	2048	1	1	512	0.5	2	32	0.03	32	1	0.06	16	1024	1	1	0.25	0.5	2
	+CPZ ¼	2048	1	1	512	0.5	2	512	0.5	2	0.5	0.03	32	1024	1	1	0.25	0.5	2
OFX	No EI	1	-	-	2	-	-	1	-	-	16	-	-	1	-	-	2	-	-
	+VP ¼	0.5	0.5	2	0.5	0.25	4	0.5	0.5	2	16	1	1	0.5	0.5	2	1	0.5	2
	+TZ ¼	1	1	1	0.5	0.25	4	0.5	0.5	2	16	1	1	0.5	0.5	2	1	0.5	2
	+CPZ ¼	0.5	0.5	2	1	0.5	2	0.5	0.5	2	16	1	1	0.5	0.5	2	1	0.5	2
AMK	No EI	2	-	-	2	-	-	1	-	-	2	-	-	640	-	-	2	-	-
	+VP ¼	0.5	0.25	4	0.5	0.25	4	0.25	0.25	4	0.5	0.25	4	640	1	1	0.5	0.125	4
	+TZ ¼	1	0.5	2	0.5	0.25	4	0.25	0.25	4	0.5	0.25	4	640	1	1	1	0.5	2
	+CPZ ¼	1	0.5	2	0.25	0.125	4	0.5	0.5	2	0.5	0.25	4	160	0.25	4	0.5	0.125	4
EtBr	No EI	8	-	-	8	-	-	4	-	-	4	-	-	8	-	-	4	-	-
	+VP ¼	1	0.125	8	0.5	0.06	16	0.25	0.0625	16	1	0.25	4	0.5	0.06	4	0.5	0.125	8
	+TZ ¼	2	0.25	4	2	0.25	4	0.5	0.125	8	2	0.5	2	1	0.125	8	2	0.5	2
	+CPZ ¼	8	1	1	8	1	1	4	1	1	1	0.25	4	2	0.25	4	4	1	1

MIC, Minimum inhibitory concentration; FIC, fractional inhibitory concentration; MF, modulation factor; INH, isoniazid; RIF, rifampicin; AMK, amikacin; OFX, ofloxacin; VP, verapamil; TZ, thioridazine; CPZ, chlorpromazine; EtBr, ethidium bromide; EI, efflux inhibitor. Values in bold type indicate synergistic interactions.

individual synergistic interactions described above ranged from 0.25 (MF = 4) to 0.015 (MF = 64) (Table 4) and is illustrated in Figure 1 for the four antibiotics and ethidium bromide plus verapamil against *M. tuberculosis* FURG-4 as an example for the remaining strains tested. Noteworthy, no antagonistic interaction was observed in this study.

Assessment of Efflux Activity by Real-time Fluorometry

After determining the synergistic effect between the inhibitors and antibiotics, the inhibitors were evaluated for their ability to inhibit efflux activity by the *M. tuberculosis* strains in study. Real-time fluorometry was applied to study their behavior in the

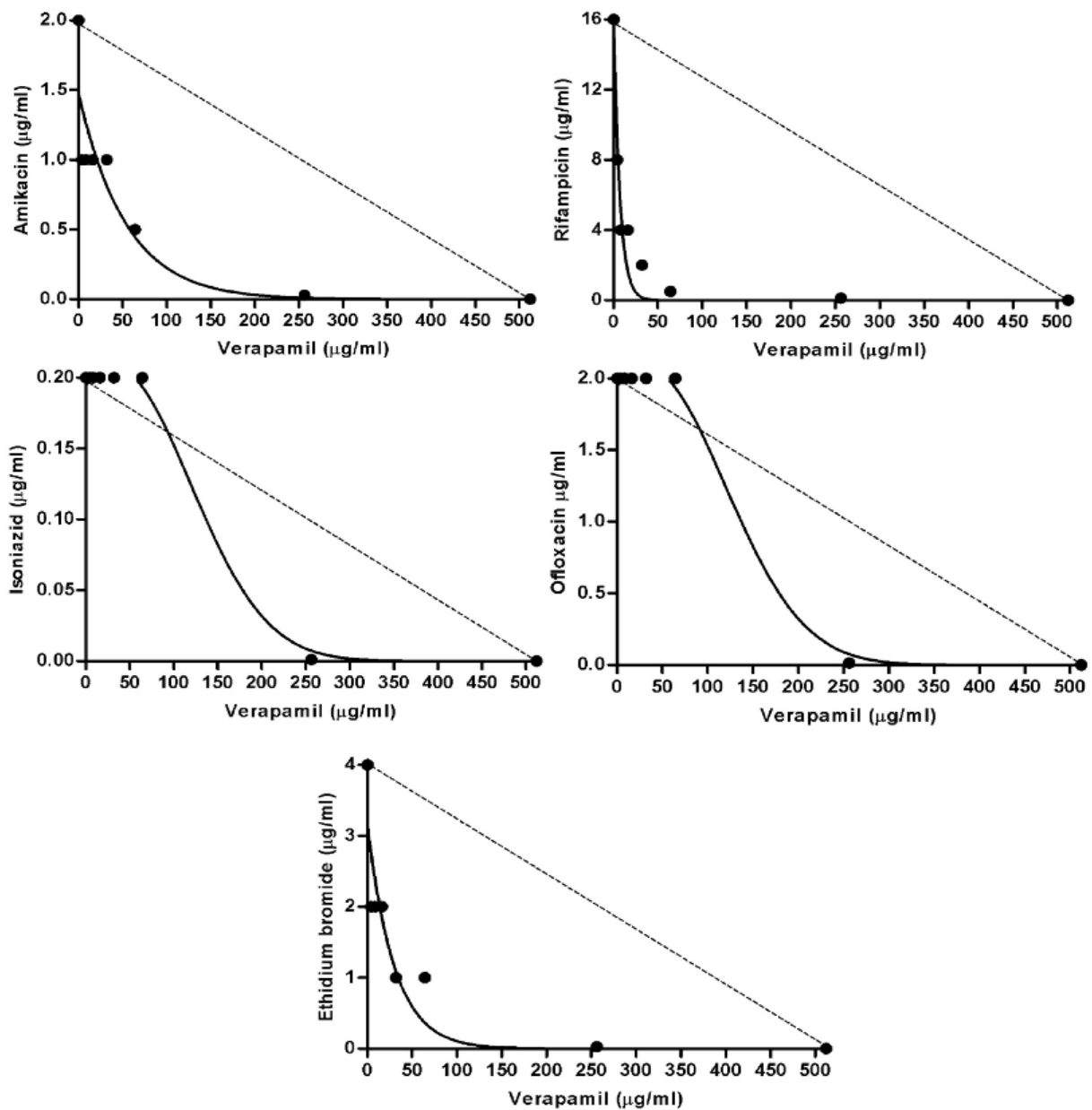


FIGURE 1 | Synergistic effect of the combination of amikacin, rifampicin, isoniazid, ofloxacin and ethidium bromide, plus verapamil. In the figure is represented the isobolograms for the

M. tuberculosis strain FURG-4 as an example. The dashed line represents the hypothetical indifferent effect. The concave isobol observed represents the synergistic effect.

presence of the broad efflux substrate ethidium bromide with and without glucose as the source of metabolic energy. First, was determined the lowest concentration that causes minimal accumulation of ethidium bromide, i.e., the concentration for which there is an equilibrium between influx and efflux of the substrate. The lowest concentration that resulted in equilibrium between the influx and efflux of ethidium bromide was $0.25 \mu\text{g/ml}$ for the reference strain H37Rv, $0.5 \mu\text{g/ml}$ for strains FURG-2 to FURG-5, and $1 \mu\text{g/ml}$ for strain FURG-1. These results clearly indicate that the clinical drug resistant *M.*

tuberculosis strains can handle higher concentrations of ethidium bromide than the reference strain, which is suggestive of the presence of more active efflux systems in these strains. After this, the EIs under study were tested under the equilibrium concentration of ethidium bromide identified for each strain. In **Figure 2A**, we can observe the effect of the EIs on the accumulation of ethidium bromide by *M. tuberculosis* FURG-5, in the presence of glucose, as an example. Due to the large number of graphs describing the effects of verapamil, thioridazine and chlorpromazine, with and without glucose, on

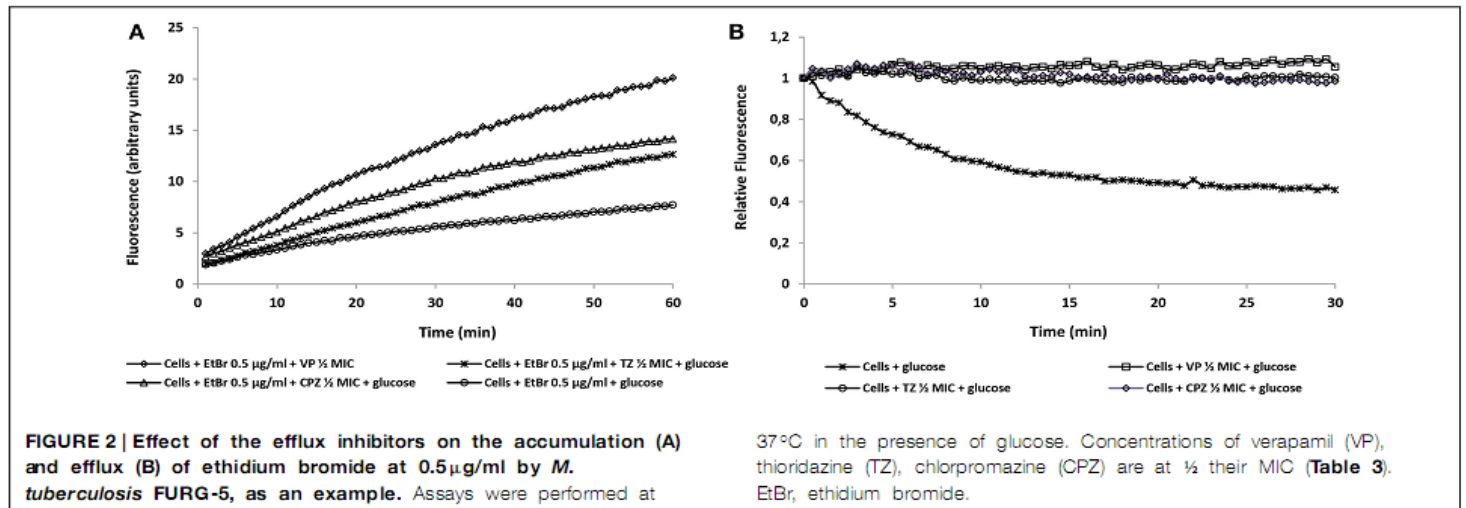


TABLE 5 | Relative final fluorescence (RFF) based on accumulation of EtBr.

Strains	RFF of the efflux inhibitors					
	Verapamil		Thioridazine		Chlorpromazine	
	- glucose	+ glucose	- glucose	+ glucose	- glucose	+ glucose
FURG-1	0.82	0.47	0.66	0.29	0.32	0.01
FURG-2	1.36	1.01	0.63	0.33	0.39	0.21
FURG-3	0.71	0.53	0.21	0.27	0.07	-0.04
FURG-4	1.58	1.22	0.76	0.45	0.64	0.46
FURG-5	1.62	1.48	1.37	1.54	1.06	1.01
H37Rv	1.57	2.27	0.77	1.31	0.52	0.88

Accumulation of EtBr at 0.25 µg/ml (H37Rv), 0.5 µg/ml (FURG-2 to 5), and 1 µg/ml (FURG-1), in the presence of glucose at 0.4%. The most efficient inhibitors are in bold type.

the efflux activity of the other five *M. tuberculosis* strains studied, the RFF indexes were calculated and the results presented in tabular form (Table 5). The index of activity of the three EIs tested against the *M. tuberculosis* strains was calculated with the aid of the Formula 3 (see Material and Methods). The RFF index is a measure of how effective the compound is on the inhibition of ethidium bromide efflux (at a given non-inhibitory concentration) by comparison of the final fluorescence at the last time point (60 min) of the treated cells with the cells treated only with ethidium bromide. The inhibitor that presents the highest ethidium bromide accumulation rate was verapamil, followed by thioridazine and chlorpromazine, as previously demonstrated (Machado et al., 2012; Rodrigues et al., 2012). The results showed that all strains studied presented with efflux activity which can be inhibited in the presence of the EIs (Figure 2B as an example of the results obtained with all strains tested). Efflux activity was more pronounced in the clinical strain FURG-5 (Figure 2B); strains FURG-1 to - 4 presented significant and similar EtBr efflux activities but less than FURG-5, whilst H37Rv presented a basal efflux activity, assessed by the semi-automated fluorometric method (data not shown). Moreover, it was also noticed that the accumulation of ethidium bromide by the *M. tuberculosis* strains is not affected by the presence of glucose (Table 5), revealing that the external energization of *M. tuberculosis* cells is not

determinant to guarantee an optimal active efflux, as previously noticed (Machado et al., 2012; Rodrigues et al., 2012). These results provide further evidence that efflux activity is an intrinsic characteristic of susceptible and drug resistant *M. tuberculosis* strains and is directly involved in antibiotic resistance in the *M. tuberculosis* clinical strains, irrespectively of the presence or absence of mutations that confer antibiotic resistance.

Quantification of Efflux Pump mRNA by RT-qPCR

To further analyze the contribution of efflux pumps to antibiotic resistance in these strains, six efflux pump genes, *mmpL7*, *mmr*, *p55*, *Rv1258c*, *Rv2459* and *efpA*, and the transcriptional regulator *whib7*, were selected to examine changes in mRNA transcriptional levels (Table 2). The quantification of efflux pump mRNA level of the *M. tuberculosis* clinical isolates is shown in Table 6. When comparing the mRNA levels of each efflux pump gene for each isolate with that of the H37Rv reference strain, no increase in the expression of these genes was detected in these strains, with the exception of strain FURG-1. This strain presents a two- to five-fold increase in mRNA levels for all genes tested (Figure 3). To analyze if the presence of an antibiotic could induce an increase in mRNA transcriptional levels, the strains were exposed to ½ of the respective MIC of the antibiotic to which the strains was shown to be resistant and the transcription

TABLE 6 | Relative quantification of efflux pump gene mRNA quantity in the *M. tuberculosis* strains exposed to antibiotics.

Strain	Condition	Relative mRNA gene quantity (\pm SD) of:						
		<i>mmp17</i>	<i>mmr</i>	<i>Rv1258c</i>	<i>p55</i>	<i>efpA</i>	<i>Rv2459</i>	<i>whib7</i>
	Non-exposed	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
FURG-1	+INH	0.01 \pm 0.00	0.05 \pm 0.01	0.02 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.07 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00
	+RIF	0.02 \pm 0.00	0.04 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00
FURG-2	+INH	94.56 \pm 1.64	137.21 \pm 0.00	20.09 \pm 1.05	24.65 \pm 2.56	10.41 \pm 3.16	0.41 \pm 0.39	2.35 \pm 0.16
	+RIF	172.05 \pm 10.42	249.20 \pm 12.95	90.18 \pm 15.08	84.90 \pm 5.14	56.80 \pm 2.95	16.59 \pm 4.19	13.08 \pm 1.13
FURG-3	+INH	0.23 \pm 0.03	0.16 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01	0.18 \pm 0.04	0.80 \pm 0.29	0.13 \pm 0.01	0.04 \pm 0.00
	+RIF	0.02 \pm 0.00	0.05 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.06 \pm 0.03	0.06 \pm 0.04	0.05 \pm 0.00	0.06 \pm 0.03
FURG-4	+INH	0.28 \pm 0.05	0.17 \pm 0.01	0.22 \pm 0.01	0.53 \pm 0.11	0.76 \pm 0.03	0.37 \pm 0.03	0.42 \pm 0.06
	+RIF	0.01 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00	0.05 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00
	+OFX	4.45 \pm 0.15	2.41 \pm 0.25	2.75 \pm 0.29	4.17 \pm 0.29	4.02 \pm 0.14	2.96 \pm 0.51	5.51 \pm 0.38
FURG-5	+INH	1.00 \pm 0.10	0.60 \pm 0.24	0.10 \pm 0.06	0.76 \pm 0.05	1.15 \pm 0.04	0.48 \pm 0.03	0.20 \pm 0.01
	+RIF	0.07 \pm 0.04	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.01	0.02 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00
	+AMK	0.01 \pm 0.00	0.08 \pm 0.02	0.02 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00

INH, isoniazid; RIF, rifampicin; OFX, ofloxacin; AMK, amikacin. Data is presented as the *n*-fold difference relative to the control (non-exposed condition) plus standard deviation (\pm SD). Values in bold type were considered to be overexpression.

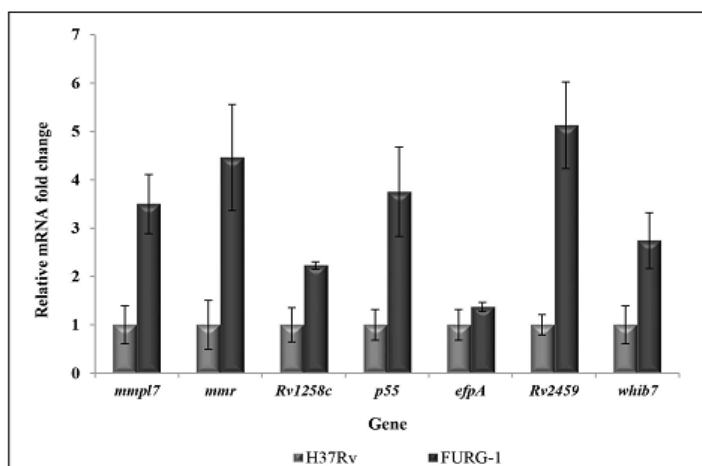


FIGURE 3 | Quantification of the mRNA transcriptional levels (*n*-fold) for the efflux pump genes in strain FURG-1. The mRNA levels of the genes *mmp17*, *mmr*, *p55*, *Rv1258c*, *Rv2459*, *efpA* and the transcriptional regulator *whib7* were compared with the H37Rv reference strain.

levels determined against the non-exposed counterpart. The results are presented in **Table 6**. Increased mRNA levels were found in strains FURG-2 for all seven genes upon exposure to rifampicin, and six genes for isoniazid (**Table 6**). Strain FURG-4 demonstrates increased mRNA levels for all genes tested upon exposure to ofloxacin. Strain FURG-5 shows only a marginal increase in the expression of the *efpA* gene. Concerning strains FURG-1, FURG-3, FURG-4, and FURG-5 it was noticed a general decrease in the transcript numbers of all efflux pump genes after the exposure to isoniazid, rifampicin, or amikacin.

Discussion

Understanding the mechanism by which *M. tuberculosis* develops resistance and how this can be reduced is essential to shorten and improve tuberculosis treatment. Mutations in the genes related with antibiotic resistance and efflux of drugs have been shown to contribute to the development of drug resistance in *M. tuberculosis* (Louw et al., 2011; Silva and Palomino, 2011; Machado et al., 2012). In this work, we aimed first to determine whether the combination of antituberculosis drugs and putative EIs act synergistically against a panel of drug resistant *M. tuberculosis* strains, and second to study the contribution of efflux systems to the overall drug resistance in these strains.

We applied a two-dimensional checkerboard procedure combined with a TEMA to evaluate the interactions of first and second line drugs and the efflux substrate ethidium bromide with the EIs verapamil, thioridazine, and chlorpromazine against a panel MDR *M. tuberculosis* clinical strains. The results showed a synergistic interaction between all antituberculosis drugs and the EIs although with different degrees of synergism (**Figure 1** as an example and **Table 4**). The interaction between rifampicin, amikacin or ethidium bromide plus the inhibitors was significant even at low concentrations of the inhibitors, whereas, for isoniazid and ofloxacin the synergic interaction was observed only at higher concentrations of the inhibitors. Significant reduction of the MIC values of ofloxacin was achieved only in one susceptible strain and no reduction was observed in the ofloxacin-resistant strain. This result indicates that, although fluoroquinolones are considered to be common substrates efflux pumps in other bacterial pathogens (Costa et al., 2011), efflux activity seems to have little contribution

for ofloxacin resistance in multidrug resistant *M. tuberculosis* strains, as previously shown (Machado, 2014). Resistance to isoniazid was only moderately reduced, as these isoniazid resistant strains harbor mutations within the *katG* gene (Table 1) associated with high-level resistance (Böttger, 2011; Cambau et al., 2015). Strain FURG-5 presents a rare mutation in the *katG* gene, D735A (Wei et al., 2003), and the highest level of isoniazid resistance. Although rifampicin is not assumed to be a common substrate of efflux pumps, it was possible to reduce rifampicin MICs for all mutant strains by at least one of the EIs. Although we cannot assume reversal of resistance due to the absence of breakpoints for this methodology, the rifampicin MIC values for strain FURG-4 reached values similar to the fully susceptible reference strain H37Rv, despite the presence of a mutation. The mutation D516Y in *rpoB* gene has been described by others as been associated with different levels of susceptibility, from sensitive to high-level resistance (Williams et al., 1998; Somoskovi et al., 2006; Cambau et al., 2015). Resistance to amikacin was reduced by at least one of the inhibitors in drug susceptible strains. Concerning the amikacin-resistant strain, the resistance was reduced by four-fold with chlorpromazine. Kigundu et al. (2014) have recently reported that combinations between chlorpromazine and aminoglycosides results in synergic activity against *Mycobacterium smegmatis*. In this study, verapamil was the efflux inhibitor that demonstrated stronger activity against these strains which are in accordance with previous reports (Rodrigues et al., 2009, 2011, 2012; Louw et al., 2011; Machado et al., 2012; Gupta et al., 2013). Moreover, the results demonstrated that these EIs are active against both antibiotic-susceptible and -resistant strains indicating that the effect of these compounds is not dependent of the mutational profile of the strain. Additionally, it is likely these inhibitors have a wide range of activity acting on several efflux systems instead of been specific of a particular efflux pump.

In order to correlate the data obtained by the MICs determination and efflux activity, we applied a semi-automated fluorometric method using ethidium bromide as an indicator of efflux activity. The accumulation of increasing concentrations of ethidium bromide by the *M. tuberculosis* clinical strains, when comparing with the pan-susceptible H37Rv strain, clearly demonstrated that the clinical drug resistant strains, except FURG-3, possess enhanced efflux activity which could be inhibited in the presence of the EIs verapamil, thioridazine and only marginally by chlorpromazine (Table 5). We have recently observed the same kind of results with multi- and extensively drug resistant *M. tuberculosis* strains (Machado, 2014).

For the analysis of efflux pump gene expression, we first compared the mRNA levels of the clinical strains with the antibiotic susceptible reference strain, *M. tuberculosis* H37Rv. We observed an increase in the mRNA levels of all efflux genes tested in strain FURG-1 when compared with the reference strain. Regarding the remaining strains no efflux pump gene was found to be overexpressed using the H37Rv strain as a reference. As such, the clinical strains were exposed to 1/2 of the MIC of the antibiotics and the corresponding mRNA levels were compared with those of the same strain grown in a drug-free condition. We noticed an increase in the mRNA levels of almost all genes in

strains FURG-2 exposed to isoniazid and rifampicin and FURG-4 exposed to ofloxacin. We also observed that the strains expressing efflux pumps shown the expression of the whole panel of genes tested and not a particular gene, as previously shown (Machado et al., 2012; Rodrigues et al., 2012; Machado, 2014). These results showed that these clinical strains are prepared to expel toxic compounds possibly as a consequence of the constant pressure to which they were subjected in the clinical setting (Costa et al., 2011; Machado et al., 2012). We did not notice a straight correlation between the efflux pump gene expression and the reduction of the antibiotic resistance levels by the EIs. Although the effect demonstrated by the EIs on the resistance levels of the antibiotics combined with the results obtained with the real-time fluorometry clearly supports the involvement of efflux pumps in the overall resistance in these strains, it does not necessarily indicate efflux pump over expression. All strains presented high-level resistance to the antibiotics tested (Table 3) due to the presence of a mutation conferring resistance (Table 1) coupled with a component of efflux demonstrated by the reduction of the resistance levels with the inhibitors (Table 4). The extent of the later will depend on the resistance level conferred by the mutation plus the different environmental pressures to which the strain was exposed. It is expected that clinical strains do not need to increase the amount of efflux pumps in the membrane to survive when exposed to subinhibitory concentrations of the antibiotics to which they are resistant. Additionally, we notice that some genes were downregulated upon exposure to the antibiotics (Table 6). At the present we do not know the reason, although we can hypothesize that (i) gene downregulation occurs due to an antibiotic killing effect, or (ii) the downregulation of these efflux systems occurs at the expense of the overproduction of other unknown efflux systems or (iii) gene downregulation can be due to the presence of mutations in the genes encoding the efflux pumps. Further experiments would be necessary to test these hypotheses.

Tuberculosis continues to be a deadly disease worldwide and new approaches for its treatment are necessary. The identification of clinical isolates of *M. tuberculosis* that presented an efflux component as part of their resistant phenotype has a major impact in tuberculosis therapeutics as well in the development of new drugs. With the increase of multi- and extensively drug resistant strains, there are few alternatives available to treat these patients. The data presented evidences a possible therapeutic value for compounds that have the ability to inhibit mycobacterial efflux pumps via the retention of co-administered antimycobacterial drugs that are subject to efflux (Viveiros et al., 2012). The rationale and procedures used in this study proved to be useful to evaluate the presence of active efflux systems in drug resistant *M. tuberculosis* strains. In our hands, they afford quantitative and reproducible results and proved to be an inexpensive, rapid, high-throughput assay to predict the activity of EIs against drug susceptible and resistant strains of *M. tuberculosis*. In conclusion, this study strengthens the notion that intrinsic efflux activity also contributes to the overall resistance in drug resistant clinical isolates of *M. tuberculosis* bearing the most frequent mutations for resistance and that the inhibition of this efflux activity by compounds such as thioridazine and

verapamil can promote the clinical effect of the antibiotics that are subject to efflux, highlighting the urgent need of animal studies to guide the future progress of these compounds into combinational clinical trials (Viveiros et al., 2012; Gupta et al., 2013; Dutta and Karakousis, 2014).

Acknowledgments

This work was supported by project PTDC/BIA-MIC/121859/2010 from Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), Portugal. Diana Machado was supported by doctoral grant SFRH/BD/65060/2009 from FCT, Portugal. Tatiane Coelho and Daniela Ramos were supported by doctoral and

post-doctoral grants, respectively, from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Ministério da Educação (CAPES/MEC), Brazil. This work was done under the objectives of the project “Ciência sem Fronteiras/Professor Visitante Especial” (Proc. nº 88881.064961/2014-01) awarded to Miguel Viveiros (Jose R. Lapa e Silva/UFRJ coordinator) by CAPES/MEC/Brazil.

Supplementary Material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.00330/abstract>

References

- Böttger, E. C. (2011). The ins and outs of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 1128–1134. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03551.x
- Brennan, P. J., and Nikaido, H. (1995). The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 29–63. doi: 10.1146/annurev.bi.64.070195.000333
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169–193. doi: 10.1677/jme.0.0250169
- Cambau, E., Viveiros, M., Machado, D., Raskine, L., Ritter, C., Tortoli, E., et al. (2015). Revisiting susceptibility testing in MDR-TB by a standardized quantitative phenotypic assessment in a European multicentre study. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 686–696. doi: 10.1093/jac/dku438
- Caviedes, L., Delgado, J., and Gilman, R. (2002). Tetrazolium microplate assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1873–1874. doi: 10.1128/JCM.40.5.1873-1874.2002
- Costa, S. S., Falcão, C., Viveiros, M., Machado, D., Martins, M., Melo-Cristino, J., et al. (2011). Exploring the contribution of efflux on the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* 11:241. doi: 10.1186/1471-2180-11-241
- De Rossi, E., Ainsa, J. A., and Riccardi, G. (2006). Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 36–52. doi: 10.1111/j.1574-6976.2005.00002.x
- Dutta, N. K., and Karakousis, P. C. (2014). Thioridazine for treatment of tuberculosis: promises and pitfalls. *Tuberculosis* 94, 708–711. doi: 10.1016/j.tube.2014.09.001
- Eliopoulos, G. M., and Moellering, R. C. Jr (1996). “Antimicrobial combinations,” in *Antibiotics in Laboratory Medicine, 4th Edn*, ed V. Lorian (Baltimore, MD: Williams and Wilkins), 330–396.
- Gomez-Flores, R., Gupta, S., Tamez-Guerra, R., and Mehta, R. T. (1995). Determination of MICs for *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex in liquid medium by a colorimetric method. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1842–1846.
- Green, K. D., and Garneau-Tsodikova, S. (2013). Resistance in tuberculosis: what do we know and where can we go? *Front. Microbiol.* 23, 4:208. doi: 10.3389/fmicb.2013.00208
- Gröblacher, B., Kunert, O., and Bucar, F. (2012). Compounds of *Alpinia katsumadai* as potential efflux inhibitors in *Mycobacterium smegmatis*. *Bioorg. Med. Chem.* 20, 2701–2706. doi: 10.1016/j.bmc.2012.02.039
- Gupta, S., Tyagi, S., Almeida, D. V., Maiga, M. C., Ammerman, N. C., and Bishai, W. R. (2013). Acceleration of tuberculosis treatment by adjunctive therapy with verapamil as an efflux inhibitor. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 188, 600–607. doi: 10.1164/rccm.201304-0650OC
- Kigundu, E. M., Warner, D. F., Njoroge, M., and Chibale, K. (2014). Synthesis and synergistic antimycobacterial screening of chlorpromazine and its metabolites. *Med. Chem. Commun.* 5, 502–506. doi: 10.1039/c3md00387f
- Li, X. Z., and Nikaido, H. (2009). Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* 69, 1555–1623. doi: 10.2165/11317030-000000000-00000
- Louw, G. E., Warren, R. M., Gey van Pittius, N. C., Leon, R., Jimenez, A., Hernandez-Pando, R., et al. (2011). Rifampicin reduces susceptibility to ofloxacin in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* through efflux. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184, 269–276. doi: 10.1164/rccm.201011-1924OC
- Machado, D. (2014). *The Dynamics of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis: Exploring the Biological Basis of Multi- and Extensively Drug Resistant Tuberculosis (MDR/XDR-TB) as a Route for Alternative Therapeutic Strategies*. Ph.D thesis, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- Machado, D., Couto, I., Perdigão, J., Rodrigues, L., Portugal, I., Baptista, P., et al. (2012). Contribution of efflux to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE* 7:e34538. doi: 10.1371/journal.pone.0034538
- Machado, L., Spengler, G., Evaristo, M., Handzlik, J., Molnár, J., Viveiros, M., et al. (2011). Biological activity of twenty-three hydantoin derivatives on intrinsic efflux pump system of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis NCTC 13349. *In Vivo* 25, 769–772.
- Mahamoud, A., Chevalier, J., Alibert-Franco, S., Kern, W. V., and Pagès, J. M. (2007). Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 1223–1229. doi: 10.1093/jac/dkl493
- Marquez, B. (2005). Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie* 87, 1137–1147. doi: 10.1016/j.biochi.2005.04.012
- Maschmann, R. A., Ribeiro, A. W., Machado, T. R. M., Spies, F. S., Zaha, A., Nunes, L. S., et al. (2013). Performance of the GenoType MTBDRplus assay directly on sputum specimens from Brazilian patients with tuberculosis treatment failure or relapse. *J. Clin. Microbiol.* 51, 1606–1608. doi: 10.1128/JCM.00364-13
- Moody, J. A. (1992). *Synergism Testing: Broth Microdilution Checkerboard and Broth Macrodilution Methods*. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Odds, F. C. (2003). Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 1. doi: 10.1093/jac/dkg301
- Fiddock, L. (2006). Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 382–402. doi: 10.1128/CMR.19.2.382-402.2006
- Pillai, S., Moellering, R., and Eliopoulos, G. (2005). “Antimicrobial combinations,” in *Antibiotics in Laboratory Medicine, 5th Edn*, ed V. Lorian (Baltimore, MD: Williams and Wilkins), 365–440.
- Rodrigues, L., Machado, D., Couto, I., Amaral, L., and Viveiros, M. (2012). Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infect. Genet. Evol.* 12, 695–700. doi: 10.1016/j.meegid.2011.08.009
- Rodrigues, L., Ramos, J., Couto, I., Amaral, L., and Viveiros, M. (2011). Ethidium bromide transport across *Mycobacterium smegmatis* cell-wall: correlation with antibiotic resistance. *BMC Microbiol.* 11:35. doi: 10.1186/1471-2180-11-35
- Rodrigues, L., Sampaio, D., Couto, I., Machado, D., Kern, W. V., Amaral, L., et al. (2009). The role of efflux pumps in macrolide resistance in *Mycobacterium avium* complex. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 34, 529–533. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.07.010

- Schmalstieg, A. M., Srivastava, S., Belkaya, S., Deshpande, D., Meek, C., Leff, R., et al. (2012). The antibiotic resistance arrow of time: efflux pump induction is a general first step in the evolution of mycobacterial drug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 4806–4815. doi: 10.1128/AAC.05546-11
- Silva, P. E. A., and Palomino, J. C. (2011). Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 1417–1430. doi: 10.1093/jac/dkr173
- Somoskovi, A., Dormandy, J., Mitsani, D., Rivenburg, J., and Salfinger, M. (2006). Use of smear-positive samples to assess the PCR-based genotype MTBDR assay for rapid, direct detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex as well as its resistance to isoniazid and rifampin. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4459–4463. doi: 10.1128/JCM.01506-06
- Viveiros, M., Martins, M., Rodrigues, L., Machado, D., Couto, I., Ainsa, J., et al. (2012). Inhibitors of mycobacterial efflux pumps as potential boosters for anti-tubercular drugs. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 10, 983–998. doi: 10.1586/eri.12.89
- Viveiros, M., Rodrigues, L., Martins, M., Couto, I., Spengler, G., Martins, A., et al. (2010). "Evaluation of efflux activity of bacteria by a semi-automated fluorometric system," in *Antibiotic Resistance Methods and Protocols, Methods in Molecular Medicine, 2nd Edn*, Vol. 642, ed S. H. Gillespie (New York, NY: Humana Press), 159–172.
- Wei, C.-J., Lei, B., Musser, J. M., and Tu, S.-C. (2003). Isoniazid activation defects in recombinant *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) mutants evident in InhA inhibitor production. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 670–675. doi: 10.1128/AAC.47.2.670-675.2003
- Williams, D. L., Spring, L., Collins, L., Miller, L. P., Heifets, L. B., Gangadharam, P. R., et al. (1998). Contribution of *rpoB* mutations to development of rifamycin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 1853–1857.
- World Health Organization. (2008). *Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World*. Fourth Global Report. WHO/HTM/TB/2008.394, Geneva.
- World Health Organization. (2013). *Global Tuberculosis Report*. WHO/HTM/TB/2013.11, Geneva.
- World Health Organization. (2014). *Global Tuberculosis Report 2014*. WHO/HTM/TB/2014.08, Geneva.
- Yin, J. L., Shackel, N. A., Zerry, A., McGuinness, P. H., Richards, C., van der Putten, K., et al. (2001). Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunol. Cell Biol.* 79, 213–221. doi: 10.1046/j.1440-1711.2001.01002.x

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Coelho, Machado, Couto, Maschmann, Ramos, von Groll, Rossetti, Silva and Viveiros. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

1 **4. RESULTADOS: CAPÍTULO II**

2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

**Synergy among efflux and canonic mutations to determine drug resistance in
*Mycobacterium tuberculosis***

Este artigo será submetido à revista Tuberculosis – Fator de impacto 3,5

Autores

**Diana Machado^{a,b#}, *Tatiane Coelho^{c,d#}, Isabel Couto^{a,b}, Raquel Maschmann^{c,d},
Daniela Ramos^e, Andrea von Groll^e, Maria Lucia Rossetti^{c,d}, Pedro A. Silva^{e†} and
Miguel Viveiros^{a,b,†}**

1
2 **Synergy among efflux and canonic mutations to determine drug resistance in**

3 ***Mycobacterium tuberculosis***

4
5 **Diana Machado^{a,b#}, *Tatiane Coelho^{c,d#}, Isabel Couto^{a,b}, Raquel Maschmann^{c,d},**
6 **Daniela Ramos^e, Andrea von Groll^e, Maria Lucia Rossetti^{c,d}, Pedro A. Silva^{e†} and**
7 **Miguel Viveiros^{a,b,†}**

8
9
10 **Affiliations**

11 ^a Grupo de Micobactérias, Unidade de Microbiologia Médica, Instituto de Higiene e
12 Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa (IHMT, UNL), Lisboa, Portugal

13 ^b Global Health and Tropical Medicine (GHTM) - Instituto de Higiene e Medicina
14 Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal

15 ^c Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Centro de Desenvolvimento
16 Científico e Tecnológico, Porto Alegre, RS, Brazil

17 ^d Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia,
18 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

19 ^e Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica (NUPEMM), Faculdade de Medicina,
20 Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brazil

21
22 #These authors contributed equally to this work.

23 †These authors share the senior authorship.

24
25 ***Corresponding author.** Mailing address: ^eNúcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica
26 (NUPEMM), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande, Rua General
27 Osório, 96200-400 Rio Grande, Brazil. Tel.: + 055 53 32374633. Fax: (+55 51) 32338892
28 E-mail: tati.coelho85@gmail.com

1 **Abstract**

2 Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis* has become one of the major
3 limitations for the effective treatment of tuberculosis. Mutations in genes coding for target
4 regions of anti-TB drugs promote high levels of resistance, but additional mechanisms way
5 also contribute to bacterial survival at high anti-TB drug concentrations. In this study, we
6 evaluate the contribution of efflux to the overall drug resistance level of five resistant
7 clinical isolates (three MDR, one Pre-XDR and one OFX mono resistant), including the
8 susceptible *M. tuberculosis* H₃₇Rv reference strain, using the BACTEC™ MGIT™ 960
9 system coupled with the Epicenter V5.53A module and the TB eXiST software. The
10 synergistic activity of efflux inhibitors on their resistance level towards the two major first
11 line (isoniazid plus rifampicin) and second line drugs (amikacin plus ofloxacin) was
12 analyzed. The results showed that the survival of these strains, bearing known high level
13 resistance conferring mutations, was severely affected when grown in presence of sub-
14 inhibitory concentrations of INH, RIF and OFX plus efflux-pump inhibitors verapamil
15 (VP), thioridazine (TZ) and/or chlorpromazine (CPZ). Conversely, it was not observed
16 influence of the EPIs in the resistance level to AMK in the Pre-XDR and H₃₇Rv strains,
17 most probably because AMK is not recognized as substrate of efflux in *M. tuberculosis*.
18 The results suggest that despite mutations in *katG*, *rpoB* and *gyrA* correlated to a high-
19 level resistance, the efflux act synergistically with the genetic resistance to reduce the
20 biological cost of bacteria when grown at high drug concentrations, evidenced by the
21 increase in time to detection of bacterial growth after inhibition of efflux.

22

23 **Keywords:** Tuberculosis, inhibitors, growth, time to detection

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1 **1. Introduction**

2
3 Tuberculosis (TB) remains associated with high rates of morbi-mortality. In 2013 an
4 estimate of 9.0 million individuals developed this disease and 1.5 million died [1]. Among
5 all TB cases notified, there were an estimate of 480 000 of MDR-TB cases with 210 000
6 associated deaths [1].

7 The adequate adherence to anti-TB drug therapy is difficult and as consequence
8 resistant mutants are selected by monotherapy or inadequate treatment [2,3]. The
9 occurrence of spontaneous mutations in target genes of anti-TB drugs or in the pro-drug
10 activators has been considered the main cause of resistance to anti-TB drugs [4]. However,
11 the contribution of efflux pumps that reduce the intracellular drug concentration to
12 sublethal levels and prevent the drug to reach the cellular target, might be involved in the
13 development and stabilization of resistant phenotypes [5,6].

14 Resistance to INH results from mutations in the *katG* gene (codes for the catalase-
15 peroxidase enzyme, the activator of INH) which reduce or eliminates its activity and
16 prevent activation of the INH and therefore no or reduced levels of activated drug reaches
17 the final target, the 2-trans-enoyl-acyl carrier protein reductase protein (*inhA*) [7]. In
18 clinical isolates the mutation most commonly found in *katG* gene is S315T [8,9].
19 Rifampicin, another highly effective first-line antimycobacterial drug, acts by binding to
20 the β -subunit of bacterial RNA polymerase, disrupting mRNA synthesis [10]. The main
21 molecular basis for RIF resistance in clinical isolates are mutations in the *rpoB* gene,
22 mostly within a defined region of 81 bp (hot-spot) [11-13]. In general, mutations in both
23 *katG* and in *rpoB* are associated with high levels of resistance [14]. Second line antibiotics
24 such as OFX and AMK are used to treat MDR-TB. Resistance to OFX involves mutations
25 in mycobacterial gyrase A [15] while mutations in position 1400 and 1401 of the *rrs* gene
26 are the most common mutations found in amikacin-resistant strains [12,16-18].

27 Besides the acquisition of drug resistance by mutation in genes coding for drug targets,
28 *M. tuberculosis* also presents intrinsic drug resistance, mainly attributed to the unusual
29 structure of its mycolic acid-containing cell wall combined with effective efflux
30 mechanisms [19-21]. Several efflux inhibitors pump (EPI) compounds have been used to
31 detect the existence of the efflux activity in resistant clinical isolates as well as potential
32 adjuvants of anti-TB therapeutic drug combinations [21].

33 To evaluate the effect on the drug resistance level of *M. tuberculosis* in presence or
34 absence of an EPI methods are needed with high accuracy and reproducibility. In order to

1 detect and quantify more precisely the role of the efflux-pump activity in MDR and XDR
2 clinical strains the quantitative drug susceptibility determination assay developed by
3 Böttger et al is an excellent methodology for such purpose [14]. Taking advantage of the
4 semi-automated BACTEC™ MGIT™ 960 system, its compatibility with computerized
5 expert systems for interpretation such as the Epicenter V5.53A module [22] and the
6 development of a specialized software such as the TB eXiST (extended individual
7 susceptibility testing) software, an automated method was developed to monitor and report
8 bacterial growth/survival in presence and absence of anti-TB compounds. The results are
9 obtained in real time and growth is recorded in parallel in control tubes and in drug-
10 containing tubes. The comparison of the time to detection (TTD) parameter in presence
11 and absence of compounds gives a very accurate and precise measure of the growth
12 inhibition promoted by different combinations of drugs [23-25].

13 In the present study we have evaluated the contribution of the efflux mechanisms to the
14 overall resistance to INH, RIF, OFX and AMK in the fully susceptible *M. tuberculosis*
15 reference strain H37Rv and in five resistant clinical isolates. We analyzed the relationship
16 between TTD of growth of the strains in presence and absence of EPIs plus anti-TB drugs
17 in the BACTEC™ MGIT™ 960 system. The synergistic effects detected were later
18 confirmed by an automated quantitative drug susceptibility testing procedure in presence
19 and absence of anti-TB drugs plus EPIs at the optimal synergistic concentrations
20 previously determined.

21

22 **2. Methodology**

23

24 **2.1. Strains**

25

26 A total of five drug resistant strains *M. tuberculosis* were selected from the culture
27 collection of Mycobacteria Laboratory of Interdisciplinary Area of Biomedical Sciences,
28 Núcleo de Pesquisa em Microbiologia Médica (NUPEMM), Faculty of Medicine,
29 Universidade Federal do Rio Grande, Brazil and Fundação Estadual de Produção e
30 Pesquisa em Saúde - Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, previously
31 characterized by the proportion method on Löwenstein-Jensen and whose DNA was
32 sequenced in genes involved in resistance to INH (*katG*), RIF (*rpoB*), AMK (*rrs*) and OFX
33 (*gyrA*) [26]. These strains are characterized as follows: four MDR strains (three resistant to
34 INH and RIF with mutations in *katG* S315T and *rpoB* S531L, respectively - named
35 MDR1, MDR2 and MDR3; one resistant to INH, RIF and AMK with mutations in *katG*

1 D735A, *rpoB* S531L and *rrs* A>G 1401, respectively, named Pre-XDR) and one strain
 2 mono resistant to OFX with mutation in *gyrA* D94N, named OFXr. *M. tuberculosis* H₃₇Rv
 3 (ATCC27294) wild-type reference strain was used as control.

4

5 2.2. Antibiotics and inhibitors

6

7 INH, RIF, OFX, AMK, verapamil (VP), thioridazine (TZ) and chlorpromazine (CPZ)
 8 were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Verapamil, CPZ, TZ, INH, and
 9 AMK were dissolved in sterile distilled water, RIF was dissolved in dimethyl sulfoxide
 10 (DMSO) and OFX in hydroxide chloride (HCl) 1% in water. Stock solutions were prepared
 11 at 10 mg/mL and stored at -20 °C. The work solutions were prepared at the day of the
 12 experiments.

13

14 2.3. Determination minimum inhibitory concentrations (MIC) of the drugs and inhibitors in 15 BACTEC™ MGIT™ 960 system

16

17 The MIC determination of the drugs and inhibitors against the strains was determined
 18 by BACTEC™ MGIT™ 960 system and the Epicenter V5.53A equipped with the TB
 19 eXiST (Extended Individual Susceptibility Testing) module (Becton Dickinson Diagnostic
 20 Systems, Sparks, MD, USA) [27]. The MIC was carried out as described by Cambau and
 21 colleagues [25] (Table 1).

22

23 **Table 1:** Antibiotic concentrations (µg/mL) used for DST in BACTEC MGIT.

Drugs	<i>M. tuberculosis</i> strains					
	H ₃₇ Rv	MDR1	MDR2	MDR3	Pre-XDR	OFXr
INH	0.1,0.05,0.025	3, 1, 0.1	3, 1, 0.1	3, 1, 0.1	3,1,0.1	0.1,0.05,0.025
RIF	1,0.5,0.25,0.125	320, 160, 80	320, 160, 80	320, 160, 80	320, 160, 80	1,0.5,0.25,0.125
OFX	1,0.5,0.25	1,0.5,0.25	1,0.5,0.25	1,0.5,0.25	1,0.5,0.25	16, 10, 2,1
AMK	1,0.5,0.25,0.125	1,0.5,0.25,0.125	1,0.5,0.25, 0.125	1,0.5,0.25,0.125	320, 160, 80	1,0.5,0.25,0.125

24

25 The MGIT tubes were inoculated with 0.8 mL of OADC supplement, 0.1 mL of each
 26 antibiotic or inhibitor at the appropriated concentrations and 0.5 mL of the culture (150
 27 growth units-GU). A drug-free growth control tube with 0.5 mL of the same bacterial
 28 suspension at GU=150 served as absolute control. For the preparation of the second control

1 that determined the susceptibility or resistance, the culture with GU=150 was diluted 1:100
2 - proportional control (PC) - with a sterile saline solution and 0.5 ml transferred into new
3 MGIT tubes supplemented with OADC. The tubes were inserted in the BACTEC 960
4 system and the growth monitored with the TB eXiST software to interpretation of data.
5 The MIC was considered the concentration, which the TTD of the containing drug tube
6 was superior to TTD of the PC tube – meaning that an elimination of 99% of the bacterial
7 population was reached during the test in presence of the respective drug (or combination
8 of drugs) concentration (s) [28].

9 10 2.4. Synergistic assays and susceptibility testing in the presence and absence of EPIs with 11 the BACTEC™ MGIT™ 960 system

12
13 For synergistic activity evaluation between antibiotics and EPIs, the antibiotics were
14 tested at sub inhibitory concentrations in combination with the inhibitors at ½ of their MIC,
15 determined for each strain under study (Table 2). These concentrations were selected in
16 order to avoid compromising the cellular viability, a condition which prevents the
17 antimicrobial activity inhibitor and act only in the efflux system [29,30]. The procedure is
18 the same performed to determine the MIC including the absolute and proportional controls
19 in every assay. In tubes with EPI+anti-TB drug combination 0.1mL drug and 0.1mL
20 inhibitor was added. The effect of the inhibitor on the susceptibility towards the anti-TB
21 drug was evaluated by comparing the TTD of the tubes: anti-TB drug plus inhibitor against
22 the TTD of the tubes only with drug, both with the TTD of the PC tube. Thus, when
23 growth was observed in the tube containing anti-TB drug or anti-TB drug plus inhibitor
24 after the growth of the 1:100 dilutes proportional control this means that more than 99% of
25 the bacterial population was eliminated, i.e. the strain was considered susceptible to that
26 concentration of anti-TB drug [28].

27 28 **3. Results**

29
30 The strains were submitted to quantitative testing for confirmation of resistance. The
31 MICs of the drugs and EPIs are showed in Table 2. It is observed high level of resistance
32 in the all resistant strains, considering the following cut-off: INH 0,1µg/mL; RIF >1
33 µg/mL; OFX >2 µg/mL; KAN > 1 µg/mL [25].

Table 2: MICs values obtained by BACTEC MGIT system in *M. tuberculosis* resistant clinical isolates and reference strain H₃₇Rv.

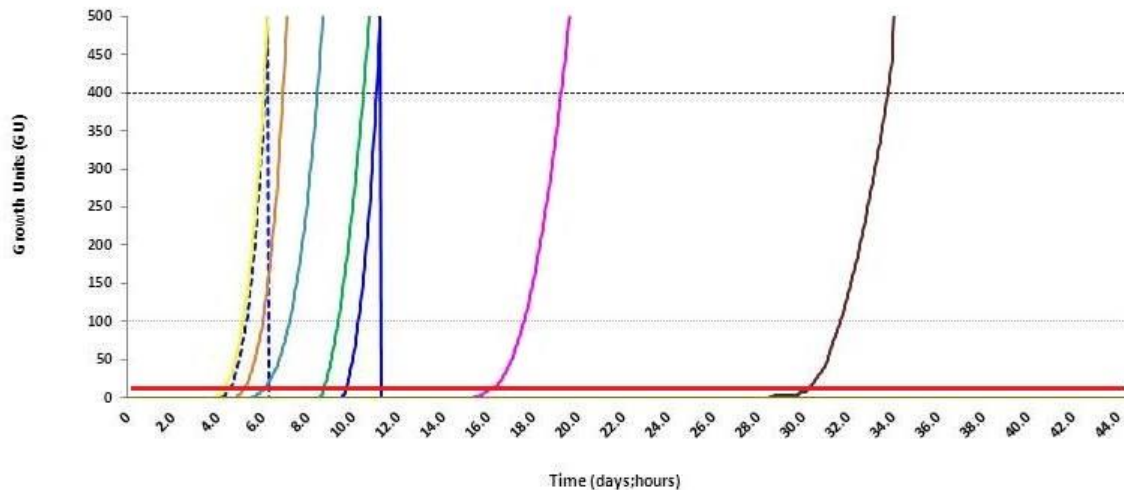
Strain	BACTEC MGIT (MIC µg/mL)						
	INH	RIF	AMK	OFX	TZ	CPZ	VP
H ₃₇ Rv	0,05	0,25	0,25	1	15	30	256
MDR1	>3	320	0,5	0,5	15	15	256
MDR2	>3	> 320	0,5	1	15	15	256
MDR3	>3	160	0,25	1	15	15	128
Pre-XDR	>3	80	320	0,5	30	30	128
OFXr	0,025	<0,125	<0,125	16	15	30	128

In order to detect the contribution of efflux on the resistance of the *M. tuberculosis* to drugs used in treatment of TB, sub inhibitory concentrations of the drugs alone (Table 3) and in the presence of EPI (at ½ MIC) was used to assess the synergism of the EPI and its effect on increasing susceptibility of the strains (Table 4). The TTD of the tubes with drugs and EPIs was compared with the TTD of the PC tube for each strain and interpreted as described in the material and methods section. The Figure 1 shows an example of a growth curves analysis of the MDR1 strain in presence of the subinhibitory concentrations of the anti-Tb drugs and anti-TB drugs plus EPIs.

Table 3: Antibiotic sub inhibitory concentrations used to evaluate EPIs synergism.

Drug	<i>M. tuberculosis</i> strains					
	H ₃₇ Rv	MDR1	MDR2	MDR3	Pre-XDR	OFXr
INH	0.025	3	3	3	3	na
RIF	0.125	160	320	40	40	na
OFX	0.5	na	na	na	na	10
AMK	0.125	na	na	na	160	na

Na = not applied



1

2 **Figure 1:** Illustration of the criteria used for interpretation of results of susceptibility in the presence of EPIs
 3 using MGIT 960 instrumentation equipped with the EpiCenter TBeXiST software. This example is illustrated
 4 with strain MDR1. Absolute growth control is dashed. The second control and drug concentrations are
 5 represented by colours: Blue = proportional control 1:100; brown = RIF160 µg/mL + CPZ 7,5 µg/mL; pink =
 6 RIF160 µg/mL + TZ 7,5 µg/mL; green = RIF160 µg/mL; light blue = VP 128 µg/mL; orange = TZ 7,5
 7 µg/mL; yellow = CPZ 7,5 µg/mL and red = RIF160 µg/mL + VP128 µg/mL. The MDR1 strain was resistant
 8 in CPZ, TZ, VP and RIF; susceptible in RIF+TZ and RIF+CPZ because inhibit the growth of more than 99%
 9 of the population of this strain and RIF+VP demonstrated by absence of bacterial growth at the end of 42
 10 days of incubation (TTD>42 days).
 11

12 According to Table 4, we observed that the three EPIs in association with
 13 subinhibitory concentrations of RIF (160µg/mL for MDR1, 320µg/mL for MDR2 and
 14 40µg/mL for MDR3) inhibited the growth of more than 99% of the population and restored
 15 the susceptibility of these concentrations in these MDR strains. The same happened with
 16 INH in MDR3 and Pre-XDR. However, in the MDR1 strain the combination among INH
 17 plus VP or TZ restored the activity of this drug to a level of 3µg/mL. Furthermore, the
 18 combination VP+RIF and INH+CPZ in the MDR1 and Pre-XDR, respectively, revealed a
 19 bactericidal activity of these combinations of drugs, demonstrated by absence of bacterial
 20 growth at the end of 42 days of incubation (TTD>42 days). In the case of MDR2 strain, the
 21 reestablishment of INH activity was observed only in presence of VP. The control strain
 22 H₃₇Rv also became more susceptible to concentrations below its normal MIC for INH,
 23 RIF, and OFX at least one EPI. In OFXr strain, despite the recorded increase in time to
 24 growth in the presence of EPIs, especially CPZ, susceptibility to the OFX subinhibitory
 25 concentration tested was not reached.
 26
 27
 28
 29

1

Table 4: Susceptibility profile of the strains in presence of drug plus inhibitor.

Drugs+EPIs	Strain H ₃₇ Rv		Strain MDR1		Strain MDR2		Strain MDR3		Strain Pre-XDR		Strain OFXr	
	TTD	RESULT	TTD	RESULT	TTD	RESULT	TTD	RESULT	TTD	RESULT	TTD	RESULT
INH	5,23	R	7,8	R	4,23	R	7,8	R	6,11	R	NA	NA
INH+VP	39.2	S	12.3	S	11.5	S	10.8	S	16.2	S	NA	NA
INH+TZ	17.8	S	11.23	S	7.1	R	13.7	S	19	S	NA	NA
INH+CPZ	15.9	S	10.3	R	6.6	R	9.12	S	NEG	S	NA	NA
RIF	6,12	R	9,6	R	8,5	R	5,7	R	10,3	R	NA	NA
RIF+VP	34	S	NEG	S	NEG	S	22	S	26	S	NA	NA
RIF+TZ	7.21	R	17.9	S	25	S	8	S	12.2	R	NA	NA
RIF+CPZ	7.17	R	31.9	S	32	S	9.9	S	50	S	NA	NA
OFX	4,15	R	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	6,5	R
OFX+VP	13.21	S	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	6,2	R
OFX+TZ	6.1	R	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	7,7	R
OFX+CPZ	5.11	R	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	8,8	R
AMK	4	R	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5,18	R	NA	NA
AMK+VP	5.12	R	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4.18	R	NA	NA
AMK+TZ	4.12	R	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5.1	R	NA	NA
AMK+CPZ	8.19	R	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4.11	R	NA	NA

2 The interpretation between susceptible (S) or resistant (R) was compared with the respective TTD of proportional control 1:100 of each
3 test.

4 NEG= negative, was considered when there was not growth.

5 NA = Not applied

6

7

8 4. Discussion

9

10 Since the description of the first efflux pump in the genus *Mycobacterium*, several
11 putative genes encoding efflux pump have been identified and characterized [5, 20,31- 35].
12 The involvement of efflux pump in the transport of different drugs, including
13 fluoroquinolones, aminoglycosides, tetracycline, RIF, ethambutol and INH have been
14 reported [29,36,37]. This phenomenon has been generally associated with low-level of
15 resistance, however overexpression of genes that code pump efflux also contribute to the
16 development of high levels of resistance [36,38-40]. In the present study, we have
17 determined the effect on resistance vs susceptibility *in vitro* of different resistant *M.*
18 *tuberculosis* clinical strains (MDR, Pre-XDR and OFXr) to drugs used in TB therapy in
19 presence of the efflux inhibitors VP, TZ or CPZ. We used the BACTEC MGIT 960 system
20 equipped with the TB eXiST software to evaluate the interaction between the
21 antituberculosis drugs and the EPIs. The interpretation of the results was established by the
22 analyzes of the TTD of bacterial growth, i.e. comparing the growth kinetics of the strains
23 in the presence and absence of EPIs. Furthermore, in order to determined if the strains
24 remained resistant or became sensitive in combinations between drugs and EPIs, both at
25 subinibitory concentrations, the profile of susceptibility or resistance in this assay was

1 obtained by comparison of the TTD of growth of the proportional control (1:100) with the
2 respective TTD in presence of the combinations. Thus, the susceptibility phenotype was
3 interpreted when the TTD of the interactions was greater than TTD of the PC. This
4 indicates that more 99% of the bacterial population was eliminated in the presence of drug
5 plus EPI [25].

6 As shown in Table 4, in the resistant strains studied it was observed that efflux pump
7 contributes to the overall establishment of the high-level resistance to INH, RIF and OFX.
8 This was demonstrated by the increased TTD in all strains evaluated when exposed at
9 drugs subinhibitory concentrations of anti-TB drugs in presence of EPIs, except in the
10 combination with KAN in Pre-XDR strain. In the case of MDR strains, in general, the TTD
11 in the presence of drug plus an EPI was significantly higher than the TTD without
12 inhibitor, in other words, when the efflux is active the strain can grow fast. In the case of
13 strain MDR2, despite the higher TTD with INH + TZ / CPZ (7.1 days and 6.6 days,
14 respectively) compared to the control (only with anti-TB drug, 4.23 days), the resistance
15 was maintained at a subinibitory level in relation to the proportional control. Due to the
16 genetic background of this strain, such inhibitors may not recognize and completely inhibit
17 the efflux-pumps that export INH. The Pre-XDR strain carries a rare mutation in *katG*
18 gene, identified at 735 codon, which was demonstrated reduces by 73% the ability to
19 activate INH [41]. However, despite the reduced inhibition noticed efflux also contributed
20 for the resistance level observed in this strain. No influence of the EPIs was observed
21 related to resistance to AMK in Pre-XDR and H₃₇Rv strains. It was reported that only one
22 pump MFS family (Rv1877) of *M. tuberculosis* was identified in the AMK transport,
23 indicating that this drug could not be a common substrate of efflux pumps [42].
24 Concerning the OFXr strain, when compared with the increase of the TDD in presence of
25 INH or RIF with at least one EPI in MDR and Pre-XDR strains, the efflux seems to have
26 little or no contribution towards OFX resistance, as previously evidenced by us (data not
27 published) and shown by Machado et al 2014 [43]. Furthermore, because the absence of
28 mutation in *katG*, *rpoB* and *gyrA* in H₃₇Rv strain, the efflux system appears to be an
29 intrinsic resistance mechanism.

30 The results obtained by studying the growth kinetics clearly showed a synergistic
31 interaction among drugs plus EPIs. Therefore, we conclude that the efflux play an essential
32 role in aiding the survival of strains when in presence of high concentrations of anti-TB
33 drugs. The use of efflux inhibitors can restore the activity in a particular concentration (in
34 this case, the sub inhibitory concentrations used). These findings confirm previous studies

1 in which EPIs possess the capacity to enhance or restore the susceptibility to anti-TB drugs
2 [45-47]. In addition, our study allowed us to investigate, for the first time, the decrease of
3 resistance of the DR strains exposed to combinations of anti-TB drugs and EPIs by TTD
4 assay in BACTEC MGIT 960, a very useful, accurate, reproducible and easy to perform
5 procedures, avoiding the risks of CFU counting of MDR and XDRTB strains.
6 Noteworthy, is the total absence of growth observed by combination between RIF plus VP
7 (MDR1 and MDR2) and INH plus CPZ (Pre-XDR) (Table 4).

8 In order to observe the synergy between drug plus EPI by the time necessary for the
9 detection of growth we also correlated the difference between TTD obtained for each
10 interaction with the biological cost of the bacteria when the efflux was inhibited. For this,
11 we followed the concept that strains that are metabolically more active replicate more
12 rapidly [47]. A similar phenomenon also observed in this study when we observe the time
13 needed for bacterial growth being detected (TTD). Mutations in *rpoB* commonly carries
14 the lowest biological cost, due to association with the acquisition of compensatory
15 mutations in genes encoding RNA polymerase (*rpoA*, *rpoB*, and *rpoC*), which restores the
16 wild type enzymatic activity [48-50]. The mutation in *katG* S315T has been reported not to
17 affect *in vivo* growth in an experimental animal model and INH-resistant *M. tuberculosis*
18 strains can grow as well as or better than susceptible strain, probably due to compensatory
19 mutations [47,51]. Our results allow us to infer that eventually the low cost of biological
20 mutations in *katG* and *rpoB*, as reported in the literature, can also be related with efflux
21 mechanisms, particularly in presence of high concentrations of drugs. We can also observe
22 that increasing drug intracellular concentration due to inhibition of efflux cause a high
23 cost for bacteria to survive in the environment, because the growth slows down as
24 observed in the interactions between INH and RIF plus EPIs, being less evident between
25 OFX plus EPIs.

26 Although the efficient activity of these EPIs evidenced here and other studies, the
27 precise mechanism of their inhibitory action on the transporter proteins remains to clarify
28 [6,52-54]. The coadministration of efflux inhibitors has been proposed as an alternative to
29 enhance the drug activity, even in resistant strains [36,54,55]. Studies *in vitro* and *in vivo*
30 have shown the reestablishment of the antimicrobial effect of drugs in presence of EPIs
31 [46,56-58]. Recently, Gupta et.al 2013 [58] showed *in vivo* that VP in combination with
32 standard TB chemotherapy restored drug activity and potentially shorten the duration of
33 treatment, demonstrating the importance of these molecules and validity of the proposed
34 model.

1 A limitation of our study is a small number of strains examined. Thus, the results must
2 be interpreted with caution and should not be generalized. However, we can also infer that
3 even though the identified mutations in genes generally involved in resistance to INH, RIF
4 and OFX observed in this study, the efflux mechanism acts as an additional mechanism
5 which favor survival, when the bacteria is exposed to high concentrations of the antiTB
6 drug, probably reducing their biological cost, as evidenced by the faster growth in the
7 absence of pump inhibitors. This finding is consistent with studies that also reported that in
8 drug resistant clinical strains (including MDR) there was the coexistence of genetic
9 mutations and efflux pumps [39,40,59]. Interestingly, Louw et.al. 2011 [56] identified that
10 the use of VP in combination with RIF restored the susceptibility of this drug, independent
11 of the mutation in *rpoB* gene.

12 The global impact of TB is related to the emergence of *M. tuberculosis* strains
13 increasingly resistant to first-line and second-line drugs. This implies reducing antibiotic
14 alternatives available to effectively treat the patient [60]. In conclusion, our results showed
15 that when efflux of INH and RIF was inhibited with least one EPI (MDR1, MDR2, MDR3
16 and Pre-XDR), strains grew more slowly when compared with the control without
17 inhibitor. We speculate that, when the resistant strain grows in high concentrations of an
18 anti-TB drug the efflux markedly reduces its intracellular concentration and accelerates
19 growth. These results include the fully sensitive strain H37Rv used as reference.
20 Furthermore, the reduction by inhibition of the efflux generate a high biological cost for
21 bacteria that grow under stress conditions, such as the presence of anti-TB drugs,
22 evidenced by the increased TTD when in combination of anti-TB drugs plus EPI. The data
23 presented evidences that despite the high level of resistance in these strains (see Table 2),
24 with mutations well known and established, the presence of the sub inhibitory
25 concentrations of drugs, such as occurs in individuals who do not fully adhere to treatment,
26 can induce the activity of efflux systems an ensure bacterial survival, therefore promoting
27 the emergence of MDRTB. Thus, the strains with evident signs of active efflux may have a
28 lower biological cost, and this increases the possibility of enhancement/selection/survival
29 of the population of resistant bacteria.

30 The results obtained in this study showed that efflux plays an important role in
31 reducing a putative biological cost, evidenced by better performance growth in the absence
32 of inhibitors in high drugs concentrations. Moreover, the susceptibility phenotype obtained
33 in some interactions (Table 4) reinforce the conclusion that efflux contributes to the overall
34 resistance to drugs. Thus, due the activity evidenced by VP, TZ and CPZ, these efflux

1 inhibitors can have a significant role in the improvement treatment of anti-TB therapy and
2 in the prevention of MDR-TB.

4 **Acknowledgments**

5 This work was supported by project PTDC/BIA-MIC/121859/2010 from Fundação para a
6 Ciência e a Tecnologia (FCT), Portugal. Diana Machado was supported by grant
7 SFRH/BD/65060/2009 from FCT, Portugal. Tatiane Coelho and Daniela Ramos were
8 supported by doctoral and post-doctoral grants, respectively, from Coordenação de
9 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Ministério da Educação (CAPES/MEC),
10 Brazil. This work was done under the objectives of the project Ciência sem
11 Fronteiras/Professor Visitante Especial awarded to Miguel Viveiros (Jose R. Lapa e
12 Silva/UFRJ coordinator) by CAPES/MEC/Brazil.

14 **Competing interests:** None declared.

15 **Ethical approval:** Not required.

17 **References**

- 18
19
20 [1] WHO. Global tuberculosis report 2014. WHO/HTM/TB/2014.08
21
22 [2] Hazbón MH, Brimacombe M, del Valle MB, Cavatore M, Guerrero MI, Varma-Basil
23 M, et al. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of
24 multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*
25 2006;50:2640–49.
26
27 [3] Pasipanodya JG, Gumbo T. A new evolutionary and pharmacokinetic–
28 pharmacodynamic scenario for rapid emergence of resistance to single and multiple anti-
29 tuberculosis drugs. *Curr Opin Pharmacol* 2011;11:457–63.
30
31 [4] Somoskövi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid,
32 rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res* 2001; 2:164–68.
33
34 [5] Louw GE, Warren RM, van Pittius NC, McEvoy CR, Van Helden PD, Victor TC. A
35 balancing act: efflux/influx in mycobacterial drug resistance. *Antimicrob Agents*
36 *Chemother* 2009; 53:3181-89.
37
38 [6] Viveiros M, Leandro C, Amaral L. Mycobacterial efflux pumps and chemotherapeutic
39 implications. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 22: 274–78.
40
41 [7] Cohen T, Sommers B, Murray M. The effect of drug resistance on the fitness of
42 *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet Infect Dis* 2003;3:13-21.
43

- 1 [8] Marttila HJ, Soini H, Eerola E, Vyshnevskaya E, Vyshnevskiy BI, Otten TF et al. A
2 Ser315Thr substitution in KatG is predominant in genetically heterogeneous multidrug-
3 resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates originating from the St. Petersburg area in
4 Russia. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42: 2443–45.
5
- 6 [9] van Soolingen D, de Haas PE, van Doorn HR, Kuijper E, Rinder H, Borgdorff MW.
7 Mutations at amino acid position 315 of the katG gene are associated with high-level
8 resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of
9 *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. *J Infect Dis* 2000;182: 1788–90.
10
- 11 [10] Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Schopfer
12 K, Bodmer T. Detection of rifampicin resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*.
13 *Lancet* 1993;341:647-50.
14
- 15 [11] Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance
16 in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis* 1998;79:3–29.
17
- 18 [12] Palomino JC, Martin A. Drug resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*
19 *Antibiotics* 2014;3:317-40.
20
- 21 [13] Cohen KA, Bishai WR, Pym AS. Molecular Basis of Drug Resistance in
22 *Mycobacterium tuberculosis* In: Hatfull GF, Jacobs WR editors. *Molecular Genetics of*
23 *Mycobacteria* 2nd edition; 2014 doi:10.1128/9781555818845
24
- 25 [14] Böttger EC. Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular mechanisms
26 and laboratory susceptibility testing. In: Donald PR, van Helden PD editors.
27 *Antituberculosis chemotherapy*. Prog Respir Res. Basel, Karger, 2011, 40:128–144.
28
- 29 [15] Drlica K, Malik M. Fluoroquinolones: action and resistance. *Curr Top Med Chem*
30 2003; 3:249-82.
31
- 32 [16] Alangaden GJ, Kreiswirth BN, Aouad A, Khetarpal M, Igno FR, Moghazeh SL et al.
33 Mechanism of resistance to amikacin and kanamycin in *Mycobacterium tuberculosis*.
34 *Antimicrob. Agents Chemother* 1998; 42:1295–97.
35
- 36 [17] Suzuki Y, Katsukawa C, Tamaru A, Abe C, Makino M, Mizuguchi Y, et al. Detection
37 of kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by identifying mutations in the 16S
38 rRNA gene. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1220–25.
39
- 40 [18] Georghiou SB, Magana M, Garfein RS, Catanzaro DG, Catanzaro A, Rodwell TC.
41 Evaluation of genetic mutations associated with *Mycobacterium tuberculosis* resistance to
42 amikacin, kanamycin and capreomycin: a systematic review. *PLoS ONE* 2012;7:e33275.
43
- 44 [19] Jarlier V, Nikaido H. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance
45 to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 123:11–18.
46
- 47 [20] De Rossi E, Aínsa JA, Riccardi G.. Role of mycobacterial efflux transporter in drug
48 resistance. an unresolved question. *FEMS Microbiol Rev* 2006;30: 36–52.
49

- 1 [21] Silva PEA, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in
2 *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. J Antimicrob Chemother
3 2011;66:1417-30.
4
- 5 [22] Lucke K, Hombach M, Friedel U, Ritter C, Böttger EC. Automated quantitative drug
6 susceptibility testing of non-tuberculous mycobacteria using MGIT 960/EpiCenter TB
7 eXiST. J Antimicrob Chemother 2012;67: 154–58.
8
- 9 [23] Hanna BA, Ebrahimzadeh A, Elliott LB, Morgan MA, Novak SM, Rüsç-Gerdes S,
10 Acio M, Dunbar DF, Holmes TM, Rexer CH, Savthyakumar C, Vannier AM. Multicenter
11 evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. J Clin
12 Microbiol 1999;37:748–52.
13
- 14 [24] Kolibab K, Yang A, Parra M, Derrick SC, Morris SL. Time to Detection of
15 *Mycobacterium tuberculosis* using the MGIT 320 system correlates with colony counting
16 in preclinical testing of new vaccines. Clin Vaccine Immunol 2014;21:453–55.
17
- 18 [25] Cambau E, Viveiros M, Machado D, Raskine L, Ritter C, Tortoli E. et al. Revisiting
19 susceptibility testing in MDR-TB by a standardized quantitative phenotypic assessment in
20 a European multicentre study J Antimicrob Chemother 2015;70:686-96.
21
- 22 [26] Maschmann RA, Ribeiro AW, Machado TRM, Spies FS, Zaha A, Nunes LS, Rossetti
23 MLR. Performance of the GenoType MTBDRplus assay directly on sputum specimens
24 from brazilian patients with tuberculosis treatment failure or relapse. J Clin Microbiol
25 2013;51:1606-08.
26
- 27 [27] Springer B, Lucke K, Ritter C, Calligaris-Maibach R, Böttger EC. Quantitative drug
28 susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by use of MGIT 960 and EpiCenter
29 Instrumentation. J Clin Microbiol 2009;47:1773–80.
30
- 31 [28] Shin SJ, Han JH, Manning EJB, Collins MT. 2007. Rapid and reliable method for
32 quantification of *Mycobacterium paratuberculosis* by use of the BACTEC MGIT 960
33 system. J Clin Microbiol 2007; 45:1941–1948.
34
- 35 [29]Rodrigues L, Wagner D, Viveiros M, Sampaio D, Couto I, Vavra M, et al.
36 Thioridazine and chlorpromazine inhibition of ethidium bromide efflux in *Mycobacterium*
37 *avium* and *Mycobacterium smegmatis*. J Antimicrob Chemother 2008;61:1076–82.
38
- 39 [30] Amaral L, Cerca P, Spengler G, Machado L, Couto I, Viveiros M, Fanning S, Pagès J.
40 Ethidium bromide efflux by Salmonella: modulation by metabolic energy, pH, Ions and
41 phenothiazines Int J Antimicrob Agents 2011;38:140–45.
42
- 43 [31] Takiff HE, Cimino M, Musso MC, Weisbrod T, Martinez R, Delgado MB, Salazar L,
44 et al. Efflux pump of the proton antiporter family confers low-level fluoroquinolone
45 resistance in *Mycobacterium smegmatis*. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:362-66.
46
- 47 [32] Liu J, Takiff HE, Nikaido H. Active efflux of fluoroquinolones in *Mycobacterium*
48 *smegmatis*, mediated by LfrA, a multidrug efflux pump. J Bacteriol 1996;178:3791-95.
49

- 1 [33] Aínsa JA, Blokpoel MC, Ota I, Young DB, De Smet KA, Martín C. Molecular
2 cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in
3 *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol 1998;180:5836–43.
4
- 5 [34] Silva PE, Bigi F, Santangelo MP, Romano MI, Martin C, Cataldi A, Aínsa JA.
6 Characterization of P55, a multidrug efflux pump in *Mycobacterium bovis* and
7 *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:800–04.
8
- 9 [35] Balganesch M, Kuruppath S, Marcel N, Sharma S, Nair A, Sharma U. Rv1218c, an
10 ABC transporter of *Mycobacterium tuberculosis* with implications in drug discovery.
11 Antimicrob Agents Chemother 2010;54:5167–72.
12
- 13 [36] Piddock, L. J. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. Nat Rev
14 Microbiol 2006;46:629-36.
15
- 16 [37] Machado D, Couto I, Perdigão J, Rodrigues L, Portugal I, Baptista P, et al.
17 Contribution of efflux to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in
18 *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One 2012;7:e34538.
19
- 20 [38] Lee A, Mao W, Warren MS, Mistry A, Hoshino K, Okumura R, Ishida H,
21 Lomovskaya O. Interplay between efflux pumps may provide either additive or
22 multiplicative effects on drug resistance. J Bacteriol 2000;182:3142–50.
23
- 24 [39] Siddiqi N, Das R, Pathak N, Banerjee S, Ahmed N, Katoch VM et al. *Mycobacterium*
25 *tuberculosis* isolate with a distinct genomic identity overexpresses a Tap-like efflux pump.
26 Infection 2004;32:109–11.
27
- 28 [40] Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology
29 and pharmacological exploitations. Biochem Biophys Res Commun 2014;453:254-67.
30
- 31 [41] Wei CJ, Lei B, Musser JM, Tu SC. Isoniazid activation defects in recombinant
32 *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) mutants evident in InhA inhibitor
33 production. Antimicrob. Agents Chemother 2003;47:670-75.
34
- 35 [42] Li XZ, Zhang L, Nikaido H. Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in
36 *Mycobacterium smegmatis*. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:2415–23.
37
- 38 [43] Machado, D. (2014). The dynamics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*:
39 exploring the biological basis of multi- and extensively drug resistant tuberculosis
40 (MDR/XDRTB) as a route for alternative therapeutic strategies. PhD thesis. Instituto de
41 Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, Portugal.
42
- 43 [44] Spies FS, Silva PEA, Ribeiro MO, Rossetti ML, Zaha A Identification of mutations
44 related to streptomycin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and
45 possible involvement of efflux mechanism. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:2947-
46 49.
47
- 48 [45] Kristiansen JE, Thomsen VF, Martins A, Viveiros M, Amaral L Non-antibiotics
49 reverse resistance of bacteria to antibiotics. In Vivo 2010;24:751-54.
50

- 1 [46] Rodrigues L, Machado D, Couto I, Amaral L, Viveiros M. Contribution of efflux
2 activity to isoniazid resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Infect Genet
3 Evol 2012;12:695–700.
4
- 5 [47] Spies FS, von Groll A, Ribeiro AW, Ramos DF, Costa ERD, Martin A, et al.
6 Biological cost in *Mycobacterium tuberculosis* with mutations in the *rpsL*, *rrs*, *rpoB*, and
7 *katG* genes. Tuberculosis 2013;93:150-54.
8
- 9 [48] Trauner A, Borrell S, Reither K, Gagneux S. Evolution of drug resistance in
10 tuberculosis: recent progress and implications for diagnosis and therapy. Drugs
11 2014;74:1063–72.
12
- 13 [49] Song T, Park Y, Shamputa IC, Seo S, Lee SY, Jeon H-S, et al. Fitness costs of
14 rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* are amplified under conditions of
15 nutrient starvation and compensated by mutation in the β -subunit of RNA polymerase. Mol
16 Microbiol 2014;91:1106–19.
17
- 18 [50] Brandis G, Hughes D. Genetic characterization of compensatory evolution in strains
19 carrying *rpoB* Ser531Leu, the rifampicin resistance mutation most frequently found in
20 clinical isolates. J Antimicrob Chemother 2013;68:2493–7.
21
- 22 [51] Pym AS, Saint-Joanis B, Cole ST. Effect of *katG* mutations on the virulence of
23 *Mycobacterium tuberculosis* and the implication for transmission in humans. Infect Immun
24 2002;70:4955e60.
25
- 26 [52] Lomovskaya O, Bostian KA, Practical applications and feasibility of efflux pump
27 inhibitors in the clinic – a vision for applied use. Biochem Pharmacol 2006;71:910–18.
28
- 29 [53] Martins M, Dastidar SG, Fanning S, Kristiansen JE, Molnar J, Pagès JM, et al.
30 Potential role of non-antibiotics (helper compounds) in the treatment of multidrugresistant
31 Gram-negative infections: mechanisms for their direct and indirect activities. Int J
32 Antimicrob Agents 2008;31:198–208.
33
- 34 [54] Pagès JM, Amaral L. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them:
35 challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. Biochim Biophys Acta
36 2009;1794:826–33.
37
- 38 [55] Marquez B. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. Biochimie
39 2005;87:1137–47.
40
- 41 [56] Louw GE, Warren RM, Gey van Pittius NC, Leon R, Jimenez A, Hernandez-Pando
42 R, et al. Rifampicin reduces susceptibility to ofl oxacin in rifampicin-resistant
43 *Mycobacterium tuberculosis* through efflux. Am J Respir Crit Care Med 2011;184:269–76.
44
- 45 [57] Balganes M, Dinesh N, Sharma S, Kuruppath S, Nair AV, Sharma U. Efflux pumps
46 of *Mycobacterium tuberculosis* play a significant role in antituberculosis activity of
47 potential drug candidates. Antimicrob Agents Chemother 2012;56:2643–51.
48

1 [58] Gupta S, Tyagi S, Almeida DV, Maiga MC, Ammerman NC, Bishai WR.
2 Acceleration of tuberculosis treatment by adjunctive therapy with verapamil as an efflux
3 inhibitor. Am J Respir Crit Care Med 2013;188:600-07.

4
5 [59] Jiang X, Zhang W, Zhang Y, Gao F, Lu C, Zhang X, et al. Assessment of efflux pump
6 gene expression in a clinical isolate *Mycobacterium tuberculosis* by real-time reverse
7 transcription PCR. Microb Drug Resist 2008;14:7–11.

8
9 [60] Viveiros M, Martins M, Rodrigues L, Machado D, Couto I, Ainsa J, Amaral L.
10 Inhibitors of mycobacterial efflux pumps as potential boosters for anti-tubercular drugs.
11 Expert Rev Anti Infect. Ther 2012;10:983–98.

5. DISCUSSÃO GERAL

Mycobacterium tuberculosis apresenta um dos maiores números de bombas de efluxo em comparação ao tamanho do seu genoma. Análises de bioinformática têm estabelecido relações entre efluxo de fármacos com resistência intrínseca ou adquirida em *M. tuberculosis* (SILVA *et al.*, 2011). As bombas de efluxo destacam-se em termos de sua alta eficiência na extrusão de fármacos e na inespecificidade dos substratos transportados (SUN *et al.*, 2014). Tem sido relatado que quando estas bombas de efluxo são sobreexpressas, a resistência aos antibióticos pode ocorrer e comprometer o tratamento de uma doença (DARTOIS & BARRY, 2010; GIAMARELLOU & POULAKOU, 2009).

Pelo fato das bombas de efluxo desempenharem um importante papel na mediação da resistência, a inibição da atividade do efluxo torna-se uma abordagem promissora para combater a resistência bacteriana. Os inibidores de efluxo podem ser utilizados para aumentar a concentração do antibiótico no interior da célula, a fim de restaurar ou aumentar a atividade antimicrobiana; reduzir a acumulação de outros mecanismos de resistência e; para fins de diagnóstico, avaliar a presença e a contribuição de um mecanismo de efluxo em um agente patogênico (BHARDWAJ & MOHANTY, 2012).

Neste estudo, analisamos a contribuição geral do sistema de efluxo na resistência aos principais fármacos utilizados para o tratamento da TB (INH, RIF, OFX e AMK) em seis isolados clínicos de *M. tuberculosis* MDR, os quais dois isolados foram definidos como Pré-XDR, e um monorresistente a OFX. Foram utilizadas diferentes metodologias a fim de detectar de forma direta e indireta o envolvimento do efluxo em cepas resistentes com distintos perfis genotípicos.

Primeiramente (Capítulo I), foram realizadas combinações entre os clássicos EPIs (VP, TZ e CPZ) com os antibióticos e o BrEt, a fim de verificar a atividade sinérgica das interações e o efeito modulador dos inibidores. As combinações foram realizadas pelo ensaio TEMA (*tetrazolium microplate-based assay*) através da técnica de *checkerboard*. Nossos resultados demonstraram que, de maneira geral, os inibidores influenciaram na redução das CMIs dos antibióticos em todas as cepas resistentes estudadas. Porém, não foi observado redução da CMI da OFX na cepa resistente a esta quinolona (FURG 4). A influência dos inibidores só foi detectada com VP e TZ na cepa sensível a OFX (FURG 2), com um FIC de 0,25. Isto sugere que a atividade do efluxo frente a cepa resistente a OFX estudada parece não contribuir para o fenótipo de resistência, como mostrado

1 anteriormente (MACHADO *et al.*, 2014), porém, na cepa sensível, o efluxo pode ser o
2 antecessor para o desenvolvimento de mutações que poderá estabelecer uma resistência.

3 Apesar da INH ser um substrato comum de bombas de efluxo, os clássicos EPIs
4 utilizados não aumentaram a atividade da INH nas cepas analisadas neste estudo. O
5 sinergismo foi observado apenas na interação com CPZ na cepa Pre-XDR com resistência
6 adicional a OFX (FURG 4), com uma redução de 4 vezes na CMI da INH. Isso indica que
7 a atividade dos inibidores depende das características genéticas e fisiológicas de cada cepa.
8 Cabe ressaltar que todas as cepas resistentes apresentavam mutações no gene *katG* que
9 determinam os altos níveis de resistência observados (BÖTTGER, 2011; CAMBAU *et al.*,
10 2014). Uma rara mutação no gene *katG*, no códon D735A, foi detectada na cepa Pré-XDR
11 com resistência adicional a AMK (FURG 5), a qual apresentou o mais alto nível de
12 resistência (CMI 512µg/mL) quando comparada com as outras cepas resistentes à INH.
13 Este alto nível pode ser explicado pelos resultados obtidos por Wei e colaboradores em
14 2003, o qual esta mutação impede uma alta eficiência da atividade catalase-peroxidase em
15 *M. tuberculosis*.

16 No caso da RIF, mutações no gene *rpoB* que codifica a subunidade β da RNA
17 polimerase estão envolvidas na resistência. Isto resulta em uma mudança conformacional
18 que determina uma baixa afinidade com o antibiótico e, conseqüentemente, o
19 desenvolvimento da resistência (SILVA & PALOMINO, 2011). Apesar das mutações, foi
20 observada uma redução de 4 a 64 vezes na CMI da RIF com pelo menos um dos EPIs em
21 todas as cepas analisadas. No entanto, na cepa FURG 4, os inibidores VP e TZ
22 reestabeleceram a concentração determinada na cepa padrão sensível H37Rv de 0,5
23 µg/mL, porém não é possível inferir que houve uma reversão da resistência a este
24 antibiótico, devido a ausência de um padrão definido de concentrações para determinar a
25 sensibilidade nesta metodologia. Estes resultados sugerem que o mecanismo de efluxo
26 pode estar atuando em sinergia com a mutação para determinar o alto nível de resistência
27 nestas cepas. Por outro lado, a mutação encontrada no gene *rpoB* na cepa FURG 4 é no
28 códon D516Y, a qual está envolvida com diferentes níveis de sensibilidade, desde sensível
29 à resistente (WILLIAMS *et al.*, 1998; SOMOSKOVI *et al.*, 2006; CAMBAU *et al.*, 2014).

30 Quando analisada a presença dos inibidores na CMI da AMK, foi observado sinergia
31 (FIC = 0,25) entre AMK e CPZ na cepa resistente a este antibiótico (FURG 5), com
32 redução de 4 vezes na CMI, porém o alto nível de resistência foi mantido. Além disso, os
33 inibidores apresentaram um considerável efeito modulador frente às cepas sensíveis a
34 AMK. Kigundu e colaboradores em 2014 estudaram a combinação de CPZ com fármacos

1 anti-TB, e, similar ao nosso estudo, foi também registrado efeito sinérgico para as
2 combinações de CPZ com canamicina (um aminoglicosídeo similar a AMK) frente ao *M.*
3 *smegmatis*.

4 Diante dos resultados obtidos foi possível observar que os inibidores atuam como
5 moduladores, aumentando a sensibilidade de cepas resistentes de *M. tuberculosis* aos
6 fármacos atualmente administradas no tratamento da TB, cujo inibidor mais eficiente foi o
7 VP, seguido de TZ e CPZ. Além disso, os baixos valores de FIC dos antibióticos ($\leq 0,25$)
8 indicou que a presença dos EPIs foram importantes para aumentar a atividade dos
9 fármacos. Estes dados reforçam as pesquisas de que VP, TZ e CPZ são candidatos
10 potenciais para estudos de combinação com fármacos anti-TB, e que compostos similares a
11 estes poderiam ser adjuvantes na terapêutica anti-TB. Um dado interessante é que
12 independente do perfil de suscetibilidade e de mutações que conferem resistência
13 antimicrobiana, os EPIs modularam a atividade dos fármacos utilizados neste estudo tanto
14 para as cepas sensíveis quanto para as resistentes demonstrando ainda a variabilidade dos
15 EPIs.

16 Além da atividade inibitória do efluxo, muitos EPIs tem sido utilizado em humanos
17 para o tratamento de algumas patologias, como na terapia anti psicótica, anti hipertensiva e
18 anti arritmias (MCTAVISH & SORKIN, 1989; LÓPEZ-MUÑOZ *et al.*, 2005;
19 ANDERSEN *et al.*, 2006), porém nenhum destes compostos são utilizados na prática
20 clínica como inibidores de bombas de efluxo no tratamento da TB. Além disso, o
21 mecanismo de ação destes EPIs não está completamente esclarecido. Alguns estudos
22 indicam que as fenotiazinas inibem o transporte de cálcio na células (AMARAL *et al.*,
23 2007; DUTTA *et al.*, 2010), enquanto VP inibe as bombas de efluxo em *M. tuberculosis*
24 independente dos canais de cálcio (GUPTA *et al.*, 2013).

25 A análise da atividade do efluxo foi determinada também em tempo real, o qual foi
26 utilizado o BrEt como substrato de bomba pelo método fluorimétrico semi-automatizado
27 em presença e ausência dos EPIs. No ensaio de acumulação do BrEt em presença dos EPIs
28 em concentração subinibitória ($1/2$ da CMI), foi observado que, com exceção da cepa FURG
29 3 (MDR), as cepas resistentes apresentaram evidência da atividade de efluxo, quando
30 comparado com a cepa sensível H37Rv. A acumulação mais evidente foi observada na
31 cepa Pré-XDR com resistência adicional à AMK (FURG 5), com todos os inibidores. Isso
32 demonstra que a acumulação do BrEt aumentou na presença dos EPIs, ou seja, sua
33 extrusão foi inibida. Neste ensaio, o VP foi o inibidor que promoveu uma maior
34 acumulação do BrEt em todas as cepas quando comparado a TZ e CPZ, o qual também foi

1 observado em outros estudos (MACHADO *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2012). No
2 ensaio do efluxo, foi claramente observada a redução da concentração interna do BrEt,
3 sendo mais pronunciada na cepa FURG 5, inferindo que o efluxo pode ter contribuído para
4 o fenótipo de resistência aos fármacos do esquema básico e de multirresistência. Em um
5 estudo recente realizado por nosso grupo, foi também observado que em cepas MDR e
6 XDR houve uma pronunciada atividade do efluxo (MACHADO *et al.*, 2014). Estes ensaios
7 demonstram claramente a existência do efluxo nas cepas resistentes, o qual foi inibido
8 pelos clássicos EPIs utilizados.

9 Resistência a múltiplos fármacos em *M. tuberculosis* pode estar associada com a
10 expressão intrínseca ou induzível de sistemas de efluxo (DE ROSSI *et al.*, 2006;
11 BALGANESH *et al.*, 2010; BALGANESH *et al.*, 2012; GUPTA *et al.*, 2010).
12 Recentemente, com o desenvolvimento de várias técnicas moleculares (LI & NIKAIDO,
13 2004), tais como PCR quantitativo por transcrição reversa (RT-qPCR) e *imunoblotting*, a
14 associação da sobre-expressão de bombas de efluxo com níveis clinicamente relevantes de
15 resistência tem sido amplamente registrado (HOWELL, 2013).

16 O sistema de efluxo promove um ambiente indispensável para a sobrevivência
17 bacteriana, conduzindo na extrusão de compostos tóxicos, tais como os fármacos, e
18 estabelecendo concentrações subletais no meio intracelular. Para isso, torna-se importante
19 elucidar a influência das bombas de efluxo, sob condições de estresse com antibióticos, na
20 resistência. Recentemente, vários estudos relacionados à expressão de genes de bombas
21 através da detecção de níveis ou números de cópias de moléculas de RNA foram
22 determinados nessas condições (DE KNEGT *et al.*, 2013; GUPTA *et al.*, 2006, SIDDIQI *et*
23 *al.*, 2004). Com base nisso, nosso terceiro objetivo foi analisar por RT-qPCR o nível
24 transcricional dos mRNA de genes mais comumente envolvidos com a expressão de
25 bombas de efluxo (*mmpL7*, *mmr*, *Rv1258*, *p55*, *Rv2469* e *efpA*), além da inclusão do
26 regulador transcricional do efluxo, o *whiB7*.

27 A cepa padrão sensível, *M. tuberculosis* H₃₇Rv, foi utilizada para comparar o nível de
28 transcrição dos RNAm dos genes envolvidos com o efluxo com as cepas resistentes
29 estudadas. A análise foi realizada através da quantificação dos níveis de RNAm das cepas
30 expostas às concentrações subinibitórias dos antibióticos (½ da CMI) e não expostas.
31 Observamos que quando a cepa FURG 1 (MDR) foi exposta a INH ou RIF houve um
32 aumento transcricional dos níveis de RNAm de todos os genes analisados em relação a
33 cepa *M. tuberculosis* H₃₇Rv. No entanto, quando analisamos a expressão relativa dos genes
34 em presença e em ausência dos antibióticos, não houve diferença quanto a expressão

1 desses genes nestas duas condições, ou seja, mesmo após exposição aos antibióticos não
2 houve aumento da expressão. Isso indica que esta cepa é a cepa menos resistente, pois
3 concentrações subinibitórias dos antibióticos foram suficientes para induzir a expressão das
4 bombas de efluxo e a comparação com uma cepa sensível. No caso da cepa FURG 2
5 (MDR) houve aumento da expressão de todos os genes na presença de RIF ou INH, com
6 exceção do gene Rv2459 em presença de INH, quando comparados à condição não
7 exposta. Por outro lado, na cepa FURG 4 (Pré-XDR, resistência adicional a OFX), o
8 aumento da expressão desses genes foi obtido após exposição à OFX. Diante desses
9 resultados, observa-se que a expressão dos genes que codificam bombas não apresentou
10 relação com um antibiótico em particular.

11 Ao analisarmos os resultados obtidos com o *checkerboard* e com a expressão gênica,
12 observamos que não houve uma correlação entre a redução das CMIs na presença dos
13 inibidores e a expressão dos genes de bombas de efluxo. Por outro lado, com os resultados
14 em tempo real da acumulação e efluxo do BrEt em conjunto com os resultados do
15 *checkerboard*, observamos que as cepas apresentam efluxo, mas que não necessariamente
16 ocorre uma sobreexpressão das bombas estudadas. Além disso, a redução dos níveis de
17 resistência com os inibidores, sugere que o efluxo é um mecanismo adicional para uma
18 bactéria tolerar altos níveis de concentração dos antibióticos. Por isso, inferimos que a
19 exposição das cepas em concentrações dos antibióticos acima da subinibitória, poderia
20 induzir a expressão de bombas para auxiliar na sobrevivência bacteriana em estresse
21 ambiental, neste caso a presença de antibiótico.

22 No capítulo II da seção de resultados desta tese, foi analisada a contribuição do efluxo
23 na cinética do crescimento das cepas FURG 1, FURG 2 e FURG 3 (todas MDR), FURG 5
24 (Pré-XDR com resistência adicional a AMK) e incluída uma cepa monorresistente a OFX.
25 Foi utilizado o sistema BACTEC™ MGIT™ 960 e o Epicenter V5.53A equipado com o
26 software TB eXiST para avaliar a interação entre INH, RIF, OFX e AMK com os
27 inibidores VP, TZ e CPZ através do tempo de detecção (*time do detection* -TTD) do
28 crescimento bacteriano.

29 Demonstramos que em geral o efluxo contribui para o estabelecimento da resistência
30 em ambiente com altos níveis de concentração de antibióticos, o qual foi evidenciado pelo
31 aumento do TTD do crescimento das cepas expostas a concentração subinibitória de INH e
32 RIF na presença dos EPIs, porém em menos evidência na cepa resistente exposta a OFX.
33 Na combinação entre EPIs e AMK na cepa Pré-XDR, o TTD foi similar na presença e na
34 ausência dos EPIs. Tem sido registrado que somente uma bomba (Rv1877, família MFS)

1 exporta AMK em *M. tuberculosis* (LI *et al.*, 2004), e por isso, esses dados sugerem que
2 este antibiótico não é um substrato comum de bomba.

3 Além das diferenças entre os TTD do crescimento das cepas expostas apenas com os
4 fármacos e expostas com a combinação de fármacos e inibidores, foi identificado que na
5 maioria das combinações houve inibição de >99% do crescimento bacteriano, indicando
6 um perfil de suscetibilidade devido a comparação do TTD das combinações com o TTD do
7 controle proporcional (1:100). Estes resultados indicam que quando o efluxo está
8 inativado, ou seja, com inibidor, as cepas resistentes a INH e RIF cresceram mais
9 lentamente quando exposta a concentrações subinibitórias desses fármacos. Com relação a
10 cepa OFXr, quando comparado com aumento considerável do TTD na presença de INH ou
11 RIF com pelo menos um EPI nas cepas resistentes, o efluxo parece ter pouca contribuição
12 na resistência a OFX, como evidenciado anteriormente nos ensaios apresentados no
13 capítulo II e por MACHADO *et al.*, 2014.

14 Todas as cepas analisadas apresentaram alto nível de resistência, com mutações em
15 genes envolvidos com a atividade destes antibióticos. Vários estudos constataram que, por
16 exemplo, as mutações em *katG* e *rpoB* relacionadas com a resistência a INH e RIF,
17 respectivamente, mais frequentemente observadas em isolados clínicos apresentavam
18 baixo custo biológico para a bactéria. Esse fato pode estar relacionado com mutações
19 compensatórias que substituem a perda ou a redução da atividade das proteínas codificadas
20 por estes genes (PYM *et al.*, 2002; BRANDIS *et al.*, 2013; SPIES *et al.*, 2013; TRAUNER
21 *et al.*, 2014; SONG *et al.*, 2014). Com isso, a fim de observar a interação entre os
22 antibióticos e os EPIs através do tempo necessário para a detecção do crescimento
23 bacteriano, relacionamos a diferença entre TTD obtido para cada interação com o custo
24 biológica das bactérias quando o efluxo foi inibido. A partir disso, foi possível inferir que o
25 baixo custo destas mutações pode também ser favorecido pela presença de efluxo, devido
26 ao rápido crescimento observado na ausência dos EPIs. Por exemplo, no caso de mutações
27 em *katG*, o efluxo pode atuar na extrusão de compostos tóxicos que não são detoxificados
28 eficazmente pela catalase-peroxidase mutada, incluindo a eliminação de altas
29 concentrações de fármacos.

30 Estes resultados sugerem que, apesar da presença das mutações canônicas relacionadas
31 com alto nível resistência, o efluxo pode atuar sinergicamente, reduzindo o custo
32 biológico, bem como aumentar a probabilidade das bactérias sobrevivem em concentrações
33 elevadas de antibiótico. Foi possível concluir que aumentando a concentração intracelular
34 dos fármacos devido a inibição do efluxo, pode causar um alto custo biológico para a

1 bactéria sobreviver em um ambiente com altas concentrações de antibiótico, mesmo na
2 presença de mutações. Isto foi evidenciado pelo lento crescimento observado nas
3 interações entre INH e RIF com os EPIs, porém com menos evidência entre OFX e EPIs.

4 A demonstração da atividade de efluxo em cepas resistentes analisadas neste estudo
5 indica que o efluxo pode atuar como um mecanismo adicional de resistência para acelerar
6 o crescimento e reduzir o custo biológico da bactéria quando exposta em ambientes com
7 antibiótico. Este fato pode ser particularmente relevante no caso de uma terapia de longo
8 prazo, tais como a utilizada tratamento da TB, onde uma pressão contínua de
9 concentrações subinibitórias de um antibiótico pode resultar em um aumento da atividade
10 de efluxo, permitindo a seleção de mutantes resistentes. Uma maneira para evitar que estes
11 eventos ocorram pode ser a inibição destes sistemas de efluxo. Isto poderia clinicamente
12 restaurar ou aumentar a atividade de antibióticos que são substratos de bomba, como
13 demonstrado nos ensaios *in vitro* realizados neste estudo (VIVEIROS *et al.*, 2012). Assim,
14 podemos inferir que se as bombas de efluxo desempenham um papel na estabilização de
15 mutantes relacionados com a resistência, a presença de um EPI em conjunto com a terapia
16 da TB pode reduzir a frequência das mutações e dar condições para a atividade
17 antimicrobiana dos antibióticos. Por essa razão, é necessário compreender os mecanismos
18 moleculares e funcionais que estão envolvidos com a resistência mediada pelo efluxo em
19 *M. tuberculosis* e como este conhecimento pode ser usado para evitar as suas
20 consequências.

21

22 6. CONCLUSÕES

23

24 - Demonstramos a existência do efluxo em cepas com diferentes perfis de resistência,
25 evidenciado pela redução da CMI na presença de VP, TZ e CPZ além do ensaio
26 fluorimétrico semi-automatizado, os quais avaliaram quantitativamente a contribuição do
27 efluxo no mecanismo geral de resistência em cepas MDR e Pre-XDR.

28

29 - Observamos que não houve relação entre as reduções das CMI com a sobreexpressão de
30 genes que codificam as principais bombas de efluxo.

31

32 - Detectamos as diferenças no TTD do crescimento das cepas na interação entre fármacos e
33 inibidores e observamos que o sistema de efluxo é indispensável para o rápido crescimento
34 bacteriano em condições de estresse com altas concentrações de antibiótico.

7. PERSPECTIVAS

Avançar nos estudos de expressão dos genes que codificam bombas de efluxo utilizados neste estudo, expondo as cepas em concentrações acima da subinibitória dos antibióticos, a fim de analisar se há sobreexpressão dos genes quando as cepas crescem em condições de estresse elevado.

8. REFERÊNCIAS

AÍNSA, J.A.; BLOKPOEL, M.C.; OTAL, I.; YOUNG, D.B.; DE SMET, K.A.; MARTÍN, C.J. Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Bacteriology*, 180(22):5836-43, 1998.

ALEXANDER, K.A.; LAVER, P.N.; MICHEL, A.L.; WILLIAMS, M.; VAN HELDEN, P.D.; WARREN, R.M. & VAN PITTIUS, N.C.G. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerging Infectious Diseases*, 16(8):1296-9, 2010.

AMARAL, L.; FANNING, S. & PAGÈS, J.M. Efflux pumps of gram-negative bacteria: genetic responses to stress and the modulation of their activity by pH, inhibitors, and phenothiazines. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 77:61-108, 2011.

AMARAL, L.; MARTINS, M. & VIVEIROS, M. Phenothiazines as anti-multi-drug resistant tubercular agents. *Infectious Disorders Drug Targets*, 7(3):257-265, 2007.

ANDERSEN, C.L.; HOLLAND, I.B. & JACQ, A. Verapamil, a Ca²⁺ channel inhibitor acts as a local anesthetic and induces the sigma E dependent extra-cytoplasmic stress response in *E. coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758(10):1587-1595, 2006.

ANDERSON, R. The immunopharmacology of antileprosy agents. *Leprosy Review*, 54(2):139-44, 1983.

ANDRIES, K.; VERHASSELT, P.; GUILLEMONT, J.; GÖHLMANN, H.W.; NEEFS, J.M.; WINKLER, H.; VAN GESTEL, J.; TIMMERMAN, P.; ZHU, M.; LEE, E.; WILLIAMS, P.; DE CHAFFOY, D.; HUITRIC, E.; HOFFNER, S.; CAMBAU, E.; TRUFFOT-PERNOT, C.; LOUNIS, N. & JARLIER, V. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 307(5707):223-227, 2005.

ANDRIES, K.; VILLELLAS, C.; COECK, N.; THYS, K.; GEVERS, T.; VRANCKX, L.; JONG, B.C. & KOUL, A. Acquired resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to bedaquiline. *PLoS One*, 9(7): e102135, 2014.

AUBRY, A.; VEZIRIS, N.; CAMBAU, E.; TRUFFOT-PERNOT, C.; JARLIER, V. & FISHER, L.M. Novel Gyrase Mutations in Quinolone-Resistant and -Hypersusceptible Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*: Functional Analysis of Mutant Enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(1):104-112, 2006.

1 BALGANESH, M.; DINESH, N.; SHARMA, S.; KURUPPATH, S.; NAIR, A.V.;
2 SHARMA, U. Efflux pumps of *Mycobacterium tuberculosis* play a significant role in
3 antituberculosis activity of potential drug candidates. *Antimicrobial Agents and*
4 *Chemotherapy*, 56(5):2643-2651, 2012.

5
6 BALGANESH, M.; KURUPPATH, S.; MARCEL, N.; SHARMA, S.; NAIR, A.;
7 SHARMA, U. Rv1218c, an ABC transporter of *Mycobacterium tuberculosis* with
8 implications in drug discovery. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(12):5167-
9 5172, 2010.

10
11 BALZER, H.; MAKINOSE, M.; FIEHN, W.; HASSELBACH, W. The binding of the
12 calcium transport inhibitors reserpine, chlorpromazine and prenylamine to the lipids of the
13 membranes of the sarcoplasmic reticulum. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Exp. Pathol.*
14 *Pharmakol.* 260(5):456-473, 1968.

15
16 BARRERA, L. The Basics of Clinical Bacteriology. In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S.C. &
17 RITACCO, V. *Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient care.*, Cap. 3, p.93-112,
18 2007.

19
20 BARRY, V.C.; BELTON, J.G.; CONALTY, M.L. DENNENY, J.M.; EDWARD,
21 D.W.; O'SULLIVAN, J.F.; TWOMEY, D.; WINDER, F. A new series of phenazine
22 (rimino-compounds) with high anti-tuberculosis activity. *Nature*, 179(4568):1013-5, 1957.

23
24 BECKERT, P.; HILLEMANN, D.; KOHL, T.A.; KALINOWSKI, J.; RICHTER, E.;
25 NIEMANN, S. *et al.* *rplC* T460C identified as a dominant mutation in linezolid-resistant
26 *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,
27 56(5):2743-5, 2012.

28
29 BHARDWAJ, A.K. & MOHANTY, P. Bacterial efflux pumps involved in multidrug
30 resistance and their inhibitors: rejuvenating the antimicrobial chemotherapy. *Recent Patents*
31 *on Anti-Infective Drug Discovery*, 7(1):73-89, 2012.

32
33 BHATT, K.; BANERJEE, S.K. & CHAKRABORTI, P.K. Evidence that phosphate
34 specific transporter is amplified in a fluoroquinolone resistant *Mycobacterium smegmatis*.
35 *European Journal Biochemistry*, 267(13):4028-4032, 2000.

36
37 BHUSAL, Y.; SHIOHIRA, C.M. & YAMANE, N. Determination of in vitro synergy
38 when three antimicrobial agents are combined against *Mycobacterium tuberculosis*.
39 *International Journal of Antimicrobial Agents* 26(4):292-297, 2005.

40
41 BLOOM, B.R. & MURRAY, C.J.L. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer.
42 *Science*, 257(5073):1055-1064, 1992.

43
44 BODDINGHAUS, B., ROGALL, T., FLOHR, T., BLOCKER, H. & BOTTGER, E. C.
45 Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *Journal of Clinical*
46 *Microbiology*, 28(8):1751-1759, 1990.

47
48 BOSHOFF, H.I.; MYERS, T.G.; COPP, B.R.; MCNEIL, M.R.; WILSON, M.A.; BARRY,
49 C.E., 3rd. The transcriptional responses of *Mycobacterium tuberculosis* to inhibitors of

1 metabolism: Novel insights into drug mechanisms of action. *Journal of Biology Chemistry*,
2 279: 40174–40184, 2004.

3

4 BOTTAI, D.; SUPPLY, P.; STINEAR, T.P. & BROSCHE, R. Mycobacterial
5 Pathogenomics and Evolution. In: HATFULL, G.F. & JACOBS, W.R. *Molecular Genetics*
6 *of Mycobacteria*, American Society for Microbiology, Washington, DC, Cap. 2, p.27-47,
7 2014.

8

9 BÖTTGER, E. C. The ins and outs of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility
10 testing. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(8):1128–1134, 2011. A

11

12 BÖTTGER, E. C. Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular Mechanisms
13 and Laboratory Susceptibility Testing. *Progress in Respiratory Research*, 40: 128–144,
14 2011. B

15

16 BRAIBANT, M.; GILOT, P. & CONTENT, J. The ATP binding cassette (ABC) transport
17 systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiology Review*, 24(4):449–467,
18 2000.

19

20 BRANDIS, G. & HUGHES, D. Genetic characterization of compensatory evolution in
21 strains carrying *rpoB* Ser531Leu, the rifampicin resistance mutation most frequently found
22 in clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(11):2493–7, 2013.

23

24 BRASIL, 2008. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de
25 Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e
26 outras Micobactérias, 2008.

27

28 BRASIL, 2011. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de
29 Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no
30 Brasil, 2011.

31

32 BRASIL, 2014. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde – Boletim
33 Epidemiológico, 44(2), 2014.

34

35 BRENNAN, P.J. & NIKAIIDO, H. The envelope of mycobacteria. *Annual Reviews*
36 *Biochemistry*, 64:29-63, 1995.

37

38 BROSCHE R.; GORDON S.V.; MARMIESSE M.; BRODIN, P.; BUCHRIESER, C.;
39 EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; GUTIERREZC.; HEWINSON, G.; KREMER, K.;
40 PARSONS, L.M.; PYM, A.S.; SAMPER, S.; VAN SOOLINGEN, D. & COLE, S.T. A
41 new evolutionary scenario for *the Mycobacterium tuberculosis* complex. *PNAS*, 99(6):
42 3684–3689, 2002.

43

44 BURIAN, J.; RAMÓN-GARCÍA, S.; HOWES, C.G. & THOMPSON, A.C. WhiB7, a
45 transcriptional activator that coordinates physiology with intrinsic drug resistance in
46 *Mycobacterium tuberculosis*. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 10 (9):1037–1047,
47 2012.

48

49 CAMBAU, E.; VIVEIROS, M.; MACHADO, D.; RASKINE, L.; RITTER, C.; TORTOLI,
50 E., MATTHYS, V.; HOFFNER, S.; RICHTER, E.; PEREZ DEL MOLINO,

1 M.L.; CIRILLO, D.M.; VAN SOOLINGEN, D. & BÖTTGER, E.C. Revisiting
2 susceptibility testing in multidrug resistant tuberculosis by a standardized quantitative
3 phenotypic assessment in a European multicenter study. *Journal Antimicrobial and*
4 *Chemotherapy*, 70(3): 686-96, 2014.

5

6 CAMBI, A.; KOOPMAN, M. & FIGDOR, C.G. How C-type lectins detect pathogens.
7 *Cellular Microbiology*, 7(4): 481–488, 2005.

8

9 CANETTI G., FROMAN S., GROSSET J. et.al. Mycobacteria: laboratory methods for
10 testing drug sensitivity and resistance. *Bull WHO*, 29:565-578, 1963.

11

12 CARDOSO, R.F.; COOKSEY, R.C.; MORLOCK, G.P. et al. Screening and
13 characterization of mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates
14 obtained in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 3373–81, 2004.

15

16 CDC - Center for Disease Control - <http://www.cdc.gov/tb/topic/treatment/default.htm>
17 acessado em 01 de março de 2015.

18

19 CHOLO, M.C.; STEEL, H.C.; FOURIE, P.B.; GERMISHUIZEN, W.A. & ANDERSON,
20 R. Clofazimine: Current status and future prospects. *Journal of Antimicrobial*
21 *Chemotherapy*, 67(2):290–298, 2012.

22

23 CHOPRA, T. & GOKHALE, R.S. Polyketide versatility in the biosynthesis of complex
24 mycobacterial cell wall lipids. *Methods in Enzymology*, 459:259–294, 2009.

25

26 CLEMENTE ,W.T.; SOARES LIMA, S.S.; PALACI, M.; SILVA, M.S.; SUMNIENSKI,
27 RODRIGUES, V.F.; DALLA COSTA, E.R.; POSSUELO, L.; CAFRUNE, P.I.; RIBEIRO,
28 F.K.; GOMES, H.M.; SERUFO, J.C. Phenotypic and genotypic characterization of drug-
29 resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Diagnostic Microbiology and Infectious*
30 *Disease*, 62(2):199–204, 2008.

31

32 COELHO, M.B.; COSTA, E.R.; VASCONCELLOS, S.E. et al. Sequence and structural
33 characterization of tbnat gene in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*:
34 identification of new mutations. *Mutation Research*, 712: 33–9, 2011.

35

36 COHEN, K.A.; BISHAI, W.R. & PYM, A.S. Molecular basis of drug resistance in
37 *Mycobacterium tuberculosis* In: Hatfull, G.F. & Jacobs, W.R. *Molecular Genetics of*
38 *Mycobacteria*, Cap. 21, p. 413-429, 2014.

39

40 COLDITZ, G.A.; BERKLEY, C.S.; MOSTELLER, F.; BREWER, T.F.; WILSON, M.E.;
41 BURDICK, E.; FINEBERG, H.V. The efficacy of bacillus Calmette-Guerin vaccination of
42 newborns and infants in the prevention of tuberculosis: meta-analysis of the published
43 literature. *Pediatrics*, 96:29–35, 1995.

44

45 COLE, S.T. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis*
46 complex. *Microbiology*, 148(Pt 10): 2919-2928, 2002.

47

48 COLE, S. T. ; BROSH, R; PARKHILL, J; GARNIER, T; CHUROHER, O; HARRIS, D.
49 et al.. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome
50 sequence. *Nature*. 393(6685):537–544, 1998.

1
2 COMAS, I.; COSCOLLA, M.; LUO, T.; BORRELL, S.; HOLT, K.E.; KATO-MAEDA,
3 M.; PARKHILL, J.; MALLA, B.; BERG, S.; THWAITES, G.; YEBOAH-MANU,
4 D.; BOTHAMLEY, G.; MEI, J.; WEI, L.; BENTLEY, S.; HARRIS, S.R.; NIEMANN,
5 S.; DIEL, R.; ASEFFA, A.; GAO, Q.; YOUNG, D.; GAGNEUX, S. Out-of-Africa
6 migration and neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans.
7 *Nature Genetics*, 45(10):1176–1182, 2013.
8
9 CUENCA-ESTRELLA, M. Combinations of antifungal agents in therapy—what value are
10 they? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(5):854–869, 2004.
11
12 CYNAMON, M. H.; KLEMENS, S. P.; SHARPE, C. A. & CHASE, S. Activities of
13 several novel oxazolidinones against *M. tuberculosis* in a murine model. *Antimicrobial*
14 *Agents and Chemotherapy*, 43(5):1189–91, 1999.
15
16 DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*, 100(11):1862–1870,
17 2006.
18
19 DARTOIS, V. & BARRY, C.E. Clinical Pharmacology and lesion penetrating
20 properties of second- and third-line antituberculous agents used in the management of
21 multidrug-resistant (MDR) and extensively-drug resistant (XDR) tuberculosis. *Current*
22 *Clinical Pharmacology*, 5(2):96-114, 2010.
23
24 DE KNEGT, G.J.; BRUNING, O.; TEN KATE, M.T.; DE JONG, M.; VAN BELKUM,
25 A.; ENDTZ, H.P.; BREIT, T.M.; BAKKER-WOUDENBERG, I.A., STEENWINKEL,
26 J.E. Rifampicin-induced transcriptome response in rifampicin-resistant *Mycobacterium*
27 *tuberculosis*. *Tuberculosis*, 93(1):96-101, 2013.
28
29 DE ROSSI, E.; AÍNSA, J.A. & RICCARDI, G. Role of mycobacterial efflux transporters
30 in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(1):36-52,
31 2006.
32
33 DE ROSSI, E.; BRANZONI, M.; CANTONI, R.; MILANO, A.; RICCARDI, G. &
34 CIFERRI, O. *mmr*, a *Mycobacterium tuberculosis* gene conferring resistance to small
35 cationic dyes and inhibitors. *Journal of Bacteriology*, 180(22): 6068–6071, 1998.
36
37 DE STEENWINKEL, J.E.; DE KNEGT, G.J.; TEN KATE, M.T. *et al.* Time-kill kinetics
38 of antituberculosis drugs, and emergence of resistance, in relation to metabolic activity of
39 *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(12): 2582–2589,
40 2010.
41
42 DHEDA, K.; GUMBO, T.; GANDHI, N.R.; MURRAY, M.; THERON, G.; UWADIA, Z.;
43 MIGLIORI, G.B. & WARREN, R. Global control of tuberculosis: from extensively drug-
44 resistant to untreatable tuberculosis. *The Lancet Respiratory Medicine*, 2(4):321-38, 2014.
45
46 DIACON, A.H.; DAWSON, R.; HANEKOM, M.; NARUNSKY, K.; VENTER, A.;
47 HITTEL, N.L.; GEITER, J.; WELLS, C.D.; PACCALY, A.J. & DONALD, P.R. Early
48 bactericidal activity of delamanid (OPC-67683) in smear-positive pulmonary tuberculosis
49 patients. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 15(7):949–954, 2011.
50

1 DIACON, A.H.; DAWSON, R.; VON GROOTE-BIDLINGMAIER, F.; SYMONS, G.;
2 VENTER, A.; DONALD, P.R.; VAN NIEKERK, C.; EVERITT, D.; WINTER, H.;
3 BECKER, P.; MENDEL, C.M. & SPIGELMAN, M.K. 14-day bactericidal activity of PA-
4 824, bedaquiline, pyrazinamide, and moxifloxacin combinations: a randomised trial.
5 *Lancet*, 380(9846):986-993, 2012.

6
7 DIACON, A.H.; PYM, A.; GROBUSCH, M.; PATIENTIA, R.; RUSTOMJEE, R.;
8 PAGE-SHIPPI, L.; PISTORIUS, C.; KRAUSE, R.; BOGOSHI, M.; CHURCHYARD, G.;
9 VENTER, A.; ALLEN, J.; PALOMINO, J.C.; DE MAREZ, T.; VAN HEESWIJK, R.P.;
10 LOUNIS, N.; MEYVISCH, P.; VERBEECK, J.; PARYS, W.; DE BEULE, K.; ANDRIES,
11 K. & MC NEELEY, D.F. The diarylquinoline TMC207 for multidrug-resistant
12 tuberculosis. *The New England Journal of Medicine*, 360(23):2397-2405, 2009.

13
14 DOMENECH, P.; REED, M.B. & BARRY, C.E. 3rd. Contribution of the *Mycobacterium*
15 *tuberculosis* MmpL protein family to virulence and drug resistance. *Infection and*
16 *Immunity*, 73(6):3492–3501, 2005.

17
18 DORMAN, S.E.; JOHNSON, J.L.; GOLDBERG, S.; MUZANYE, G.; PADAYATCHI,
19 N.; BOZEMAN, L.; HEILIG, C.M. *et al.* Substitution of moxifloxacin for isoniazid during
20 intensive phase treatment of pulmonary tuberculosis. *American Journal of Respiratory and*
21 *Critical Care Medicine*, 180(3):273-80, 2009.

22
23 DROBNIEWSKI, F.; BALABANOVA, Y.; NIKOLAYEVSKY, V.; RUDDY, M.;
24 KUZNETZOV, S.; ZAKHAROVA, S.; MELENTYEV, A. & FEDORIN, I. Drug-resistant
25 tuberculosis, clinical virulence, and the dominance of the Beijing strain family in Russia.
26 *JAMA*, 293:2726-31, 2005.

27
28 DU, Q.; LONG, Q.; MAO, J.; FU, T.; DUAN, X.; XIE, J. Characterization of a novel
29 mutation in the overlap of tlyA and ppnK involved in capreomycin resistance in
30 *Mycobacterium*. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 66(6):405-
31 14, 2014.

32
33 DUCATI, R.G.; RUFFINO-NETTO, A.; BASSO, L.A. & SANTOS, D.S. The resumption
34 of consumption - A review on tuberculosis. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 101(7):697-
35 714, 2006.

36
37 DUTTA, N.K.; MEHRA, S. & KAUSHAL, D. A *Mycobacterium tuberculosis* sigma
38 factor network responds to cell-envelope damage by the promising antimycobacterial
39 thioridazine. *PLoS ONE* 5:e10069, 2010.

40
41 ELIOPOULOS, G.M. & MOELLERING, R.C. Antibiotics in laboratory medicine. In:
42 Lorian, V. Antibiotics in laboratory medicine. p. 432-492, 1991.

43
44 ELIOPOULOS, G. M. & MOELLERING, R. C. J. Antimicrobial combinations. In: Lorian,
45 V. Antibiotics in Laboratory Medicine, p. 330–96, 1996.

46
47 ERNST, J.D. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and*
48 *Immunity*, 66(4): 1277–1281, 1998.

49

1 FEUERRIEGEL, S.; COX, H.S.; ZARKUA, N.; KARIMOVICH, H.A.; BRAKER, K.;
2 RUSCH-GERDES, S. & NIEMANN, S. Sequence analyses of just four genes to detect
3 extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in multidrug-resistant
4 tuberculosis patients undergoing treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,
5 53(8):3353–3356, 2009.

6
7 FINKEN, M.; KRISCHNER, P.; MEIER, A.; WREDE, A. & BOTTGGER, E.C. Molecular
8 basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the
9 ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA
10 pseudoknot. *Molecular Microbiology*, 9(6):1239-1246, 1993.

11
12 FOX G. J. & MENZIES D. A Review of the evidence for using bedaquiline (TMC207) to
13 treat multi-drug resistant tuberculosis. *Infectious Disease and Therapy*, 2(2):123–144,
14 2013.

15
16 GALAGAN, J.E. Genomic insights into tuberculosis. *Nature Reviews Genetics*, 15(5):
17 307-320, 2014.

18
19 GALE, E. F.; CUNDLIFFE, E.; REYNOLDS, P. E.; RICHMOND, M. H. & WARING, M.
20 J. The molecular basis of antibiotic action. John Wiley and Sons, Inc., New York, 1981.

21
22 GEIMAN, D.E.; RAGHUNAND, T.R.; AGARWAL, N. & BISHAI, W.R. Differential
23 gene expression in response to exposure to antimycobacterial agents and other stress
24 conditions among seven *Mycobacterium tuberculosis* whiB-Like Genes. *Antimicrobial*
25 *Agents and Chemotherapy*, 50(8):2836–2841, 2006.

26
27 GENGENBACHER, M & KAUFMANN, S.H.E. *Mycobacterium tuberculosis*: success
28 through dormancy. *FEMS Microbiology Review*, 36(3):1–19, 2012.

29
30 GILLESPIE, H.S. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical
31 and Molecular Perspective. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(2):267-274, 2002.

32
33 GIAMARELLOU, H. & POULAKOU, G. Multidrug-resistant Gram-negative infections:
34 what are the treatment options? *Drugs*, 69(14):1879-901, 2009.

35
36 GINSBURG, A. S.; GROSSET, J. H, & BISHAI, W. R. Fluoroquinolones, tuberculosis,
37 and resistance. *The Lancet of Infectious Diseases*, 3(7):432-42, 2003.

38
39 GLER, M.T.; SKRIPCONOKA, V.; SANCHEZ-GARAVITO, E.; XIAO, H.; CABRERA-
40 RIVERO, J.L.; VARGAS-VASQUEZ, D.E.; GAO, M.; AWAD, M.; PARK, S.K.; SHIM,
41 T.S.; *et al.* Delamanid for multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. *The New England*
42 *Journal of Medicine*, 366(23):2151–2160, 2012.

43
44 GLICKMAN, M. S. & JACOBS, W. R. Microbial Pathogenesis of *Mycobacterium*
45 *tuberculosis*: Dawn of a Discipline, *Cell*, 104(4):477–485, 2001.

46
47 GOLDEN, M.P. & VIKRAM, H.R. Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *American*
48 *Family Physician*, 72(9):1761-1768, 2005.

49

1 GOMEZ, J.E. & MCKINNEY, J.D. *Mycobacterium tuberculosis* persistence, latency, and
2 drug tolerance. *Tuberculosis*, 84(1-2):29–44, 2004.
3
4 GRECO, W. R.; BRAVO, G. & PARSONS, J. C. The search for synergy: a critical review
5 from a response surface perspective. *Pharmacology Reviews*, 47(2):331–85, 1995.
6
7 GREULICH, K.O. Single molecule techniques for biomedicine and pharmacology.
8 *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 5(3):243–259, 2004.
9
10 GRKOVIC, S.; BROWN, M. H. & SKURRAY, R. A. Transcriptional regulation of
11 multidrug efflux pumps in bacteria. *Semininars in Cell & Developmental Biology*, 12(3):
12 225–237, 2001.
13
14 GRZYBOWSKI, S. & ALLEN, E. A. Tuberculosis. History of the disease in Canada.
15 *Journal Canadian Medical Association*, 160(7):1025-1028, 1999.
16
17 GUPTA, S.; TYAGI, S.; ALMEIDA, D.V.; MAIGA, M.C.; AMMERMAN, N.C. &
18 BISHAI, W.R. Acceleration of tuberculosis treatment by adjunctive therapy with
19 verapamil as an efflux inhibitor. *American Journal of Respiratory and Critical Care*
20 *Medicine*, 188(5):600-607, 2013.
21
22 GUPTA, A.K.; CHAUHAN, D.S.; SRIVASTAVA, K.; DAS, R.; BATRA, S.; MITTAL,
23 M.; GOSWAMI, P.; SINGHAL, N.; SHARMA, V.D.; VENKATESAN, K.; HASNAIN,
24 S.E.; KATOCH, V.M. Estimation of efflux mediated multi-drug resistance and its
25 correlation with expression levels of two major efflux pumps in mycobacteria. *Journal of*
26 *Communication Disorders*, 38(3): 246-54, 2006.
27
28
29 GUPTA, A.K.; KATOCH, V.M.; CHAUHAN, D.S.; SHARMA, R.; SINGH, M.;
30 VENKATESAN, K. & SHARMA, V.D. Microarray analysis of efflux pump genes in multi
31 drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* during stress induced by common anti-
32 tuberculosis drugs. *Microbial Drug Resistance*, 16(1):21–28, 2010.
33
34
35 GUPTA, S.; COHEN, K.A.; WINGLEE, K.; MAIGA, M.; DIARRA, B. & BISHAI, W.R.
36 Efflux Inhibition with verapamil potentiates bedaquiline in *Mycobacterium tuberculosis*.
37 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1):574–576, 2014.
38
39 GUTIERREZ, M.C.; BRISSE, S.; BROSCHE, R. , FABRE, M.; OMAÏS, B.;
40 MARMIESSE, M.; SUPPLY, P. & VINCENT, V. Ancient origin and gene mosaicism of
41 the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathogens*, 1(1):55-61, 2005.
42
43 GUTIERREZ, M.G.; MASTER, S.S.; SINGH, S.B.; TAYLOR, G.A.; COLOMBO, M.I. &
44 DERETIC, V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium*
45 *tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell*, 119(6):753–66, 2004.
46
47 HAMMA, Z. Management of Drug-Resistant. In: Mahboub, B.H. & Vats, M.G.
48 Tuberculosis current issues in diagnosis and management, Cap. 13, p. 225-259, 2013.
49

1 HAO, P.; SHI-LIANG, Z.; JU, L.; YA-XIN, D.; BIAO, H.; XU, W.; MIN-TAO, H.;
2 SHOU-GANG, K. & KE, W. The role of ABC efflux pump, Rv1456c-Rv1457c-Rv1458c,
3 from *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in China. *Folia Microbiologica*,
4 56(6):549–53, 2011.

5
6 HARTKOORN, R.C.; UPLEKAR, S. & COLE, S.T. Cross-resistance between clofazimine
7 and bedaquiline through upregulation of MmpL5 in *Mycobacterium tuberculosis*.
8 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(5): 2979–2981, 2014.

9
10 HAZBON, M.H.; BRIMACOMBE, M.; BOBADILLA DEL VALLE, M.; CAVATORE,
11 M.; GUERRERO, M.I.; VARMA-BASIL, M.; BILLMAN-JACOB, H.; LAVENDER, C.
12 *et al.* Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of
13 multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,
14 50(8):2640–9, 2006.

15
16 HEIFETS, L. & LINDHOLM-LEVY, P. Comparison of bactericidal activities of
17 streptomycin, amikacin, kanamycin, and capreomycin against *Mycobacterium avium* and
18 *M. tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(8):1298–301, 1989.

19
20 HEIFETS, L.; SIMON, J.; & PHAM, V. Capreomycin is active against non-replicating *M.*
21 *tuberculosis*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 4:6, 2005.

22
23 HENDRIKSE, N.H. Monitoring interactions at ATP-dependent drug efflux pumps.
24 *Current Pharmaceutical Design*, 6(16):1653–1668, 2000.

25
26 HOFFMANN, C.; LEIS, A.; NIEDERWEIS, M.; PLITZKO, J.M. & ENGELHARDT, H.
27 Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous
28 sections reveal the lipid bilayer structure. *Proceedings of the National Academy of*
29 *Sciences of the USA*, 105(10):3963–3967, 2008.

30
31 HOWELL, L. Global Risks 2013: An Initiative of the Risk Response Network, World
32 Economic Forum, Geneva, Switzerland, 2013.

33
34 HUITRIC, E.; VERHASSELT, P.; ANDRIES, K. & HOFFNER, S.E. *In vitro*
35 antimycobacterial spectrum of a diarylquinoline ATP synthase inhibitor. *Antimicrobial*
36 *Agents and Chemotherapy*, 51(11): 4202–4204, 2007.

37
38 IMKAMP, F.M. Clofazimine (Lamprene or B663) in lepra reactions. *Leprosy Review*,
39 52(2):135–40, 1981.

40
41 INDERLIED, C.B. & NASH, K. A. Antimycobacterial Agents: In vitro susceptibility
42 testing, spectra of activity, mechanism of action and resistance, and assays for activity in
43 biologic fluids. In: Lorian, V. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, p. 330–96, 1996.

44
45 JAGIELSKI, T.; BAKUŁA, Z.; ROESKE, K.; KAMINSKI, M.; NAPIÓRKOWSKA, A.;
46 AUGUSTYNOWICZ-KOPÉC, E.; ZWOLSKA, Z. & BIELECKI, J. Detection of
47 mutations associated with isoniazid resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium*
48 *tuberculosis* clinical isolates. *Journal Antimicrobial and Chemotherapy*, 69(9):2369-2375,
49 2014.

50

1 JARLIER, V. & NIKAIDO, H. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural
2 resistance to antibiotics. *FEMS Microbiology Letters*, 123(1–2):11–18,1994.
3
4 JERNAES, M.W. & STEEN, H.B. Staining of *Escherichia coli* for flow cytometry: influx
5 and efflux of ethidium bromide. *Cytometry*, 17(4):302–309, 1994.
6
7 JIA, L.; COWARD, L.; GORMAN, G.S. et al. Pharmacoproteomic effects of isoniazid,
8 ethambutol, and N-geranyl-N'-(2-adamantyl)ethane-1,2diamine (SQ109) on
9 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Journal of Pharmacology and Experimental*
10 *Therapeutics*, 315:905–11, 2005.
11
12 JIANG, X.; ZHANG, W.; ZHANG, Y.; GAO, F.; LU, C.; ZHANG, X. & WANG, H.
13 Assessment of efflux pump gene expression in a clinical isolate *Mycobacterium*
14 *tuberculosis* by real-time reverse transcription PCR. *Microbial Drug Resistance*, 14(1):7–
15 11, 2008.
16
17 JIN, J.; ZHANG, J.Y.; GUO, N.; SHENG, H.; LI, L.; LIANG, J.C.; WANG, X.L.; LI,
18 Y.; LIU, M.Y.; WU, X.P. YU, L. Farnesol, a potential efflux pump inhibitor in
19 *Mycobacterium smegmatis*. *Molecules*, 15(11):7750–7762, 2010.
20
21 JNAWALI, H.N & RYOO, S. First– and Second–Line Drugs and Drug Resistance. In:
22 Mahboub, B.M. & Vats, M.G. Tuberculosis current issues in diagnosis and management,
23 Cap. 10, p.163-180, 2013.
24
25 JOHNSON, K. & SCHULTZ, P.G. Mechanistic studies of the oxidation of isoniazid by
26 the catalase peroxidase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of the American*
27 *Chemical Society*, 116:7425–7426, 1994.
28
29 JOUX, F. & LEBARON, P. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of
30 bacteria at single-cell level. *Microbes and Infection*, 2(12):1523–1535, 2000.
31
32 JUGHELI, L.; BZEKALAVA, N.; DE RIJK, P.; FISSETTE, K.; PORTAELS, F. &
33 RIGOUTS, L. High level of cross-resistance between kanamycin, amikacin, and
34 capreomycin among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Georgia and a close
35 relation with mutations in the *rrs* gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,
36 53(12):5064-8, 2009.
37
38 JURÉEN, P.; WERNGREN, J.; TORO, J.C. & HOFFNER, S. Pyrazinamide resistance and
39 *pncA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and*
40 *Chemotherapy*, 52(5):1852–4, 2008.
41
42 KAATZ, G.W. Bacterial efflux pump inhibition. *Current Opinion in Investigational*
43 *Drugs*, 6(2):191–8, 2005.
44
45 KAMICKER, B.J.; SWEENEY, M.T.; KACZMAREK, F.; DIB-HAJJ, F.; SHANG,
46 W.; CRIMIN, K.; DUIGNAN, J. & GOOTZ, T.D. Bacterial efflux pump inhibitors.
47 *Methods Molecular Medicine*, 142:187-200, 2008.
48 KAUFMANN, S.H.E. & SCHAIBLE, U.E. 100th anniversary of Robert Koch's nobel
49 prize for the discovery of the tubercle bacillus. *Trends Microbiology*, 13(10):469-475,
50 2005.

1
2 KAUR, D.; GUERIN, M.E.; SKOVIEROVA, H.; BRENNAN, P.J. & JACKSON, M.
3 Chapter 2: biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium*
4 *tuberculosis*. *Advances in Applied Microbiology*, 69:23–78, 2009.
5
6 KAWAI, S.; MORI, S.; MUKAI, T.; SUZUKI, S.; YAMADA, T.; HASHIMOTO,
7 W.; MURATA, K. Inorganic Polyphosphate/ATP-NAD kinase of *Micrococcus flavus* and
8 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Biochemical and Biophysical Research*
9 *Communications*, 276(1):57–63, 2000.
10
11 KIGONDU E.M.; NJOROGE, M.; SINGH, K.; NJUGUNA, N.; WARNER, D.F.;
12 CHIBALE, K. Synthesis and synergistic antimycobacterial screening of chlorpromazine
13 and its metabolites. *Medical Chemistry Communications*, 5:502-506, 2014.
14
15 KLEINNIJENHUIS, J.; OOSTING, M.; JOOSTEN, L. A.; NETEA, M.G. & CREVEL
16 R.V. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical and*
17 *Developmental Immunology*, 2011:405310, 2011.
18
19 KOHANSKI, M.A.; DWYER, D.J.; HAYETE, B. LAWRENCE, C.A.; COLLINS, J.J. A
20 common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, 130(5):
21 797–810, 2007.
22
23 KONNO, K.; FELDMANN, F.M. & MCDERMOTT, W. Pyrazinamide susceptibility and
24 amidase activity of tubercle bacilli. *American Review of Respiratory Disease*, 95(3):461–9,
25 1967.
26
27 KOUL, A.; VRANCKX, L.; DENDOUGA, N.; BALEMANS, W.; VAN DEN
28 WYNGAERT, I.; VERGAUWEN, K.; GÖHLMANN, H.W.; WILLEBRORDS,
29 R.; PONCELET, A.; GUILLEMONT, J.; BALD, D. & ANDRIES, K. Diarylquinolines are
30 bactericidal for dormant mycobacteria as a result of disturbed ATP homeostasis. *The*
31 *Journal of Biological Chemistry*, 283(37):25273–80, 2008.
32
33 KOURTESI, C.; BALL, A.R.; HUANG, Y.Y.; JACHAK, S.M.; VERA, D.M.A.;
34 KHONDKAR, P.; GIBBONS, S.; HAMBLIN, M.R. & TEGOS, G.P. Microbial efflux
35 systems and inhibitors: approaches to drug discovery and the challenge of clinical
36 implementation. *The Open Microbiology Journal*, 7:(Suppl 1-M3) 34-52, 2013.
37
38 KUBICA, T.; AGZAMOVA, R.; WRIGHT, A.; AZIZ, M.A.; RAKISHEV, G.;
39 BISMILDA, V.; RICHTER, E.; RÜSCH-GERDES, S. & NIEMANN, S. The Beijing
40 genotype is a major cause of drug-resistant tuberculosis in Kazakhstan. *International*
41 *Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 9:646–653, 2005.
42
43 LEÃO, S. C. & PORTAELS, F. History. In: PALOMINO, J. C.; LEÃO, S.C. &
44 RITACCO, V. *Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient care.*, Cap 1, p. 25-51,
45 2007.
46
47 LEE, A.S.; TEO, A.S. & WONG, S.Y. Novel mutations in *ndh* in isoniazid-resistant
48 *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,
49 45(7):2157-9, 2001.
50

1 LEE, A.; MAO, W.; WARREN, M.S.; MISTRY, A.; HOSHINO, K.; OKUMURA, R.;
2 ISHIDA, H. & LOMOVSKAYA, O. Interplay between efflux pumps may provide either
3 additive or multiplicative effects on drug resistance. *Journal of Bacteriology*,
4 182(11):3142–50, 2000.
5
6 LEE, M.; LEE, J.; CARROLL, M.W.; CHOI, H.; MIN, S.; SONG, T. *et al.* Linezolid for
7 treatment of chronic extensively drug-resistant tuberculosis. *New England Journal*
8 *Medicine*, 367(16):1508–18, 2012.
9
10 LEHMANN J. Para-Aminosalicylic acid in the treatment of tuberculosis. *Lancet*
11 1(6384):15, 1946.
12
13 LEMIEUX, G.; DAVIGNON, A. & GENEST, J. Depressive states during Rauwolfia
14 therapy for arterial hypertension; a report of 30 cases. *Canadian Medical Association*
15 *Journal*, 74(7):522–526, 1956.
16
17 LI, X.Z. & H. NIKAIDO Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*, 64(2):159–
18 204, 2004.
19
20 LI, X.Z.; ZHANG, L.; NIKAIDO, H. Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in
21 *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy*, 48(7):2415–2423,
22 2004.
23
24 LIENHARDT, C.; RAVIGLIONE, M.; SPIGELMAN, M.; HAFNER, R.; JARAMILLO,
25 E.; HOELSCHER, M.; ZUMLA, A.; GHEUENS, J. New drugs for the treatment of
26 tuberculosis: needs, challenges, promise, and prospects for the future. *Journal of*
27 *Infectious Disease*, 205(Suppl. 2):S241–9, 2012.
28
29 LONG, K.S. & VESTER, B. Resistance to linezolid caused by modifications at its binding
30 site on the ribosome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(2):603–12, 2012.
31
32 LÓPEZ-MUÑOZ, F.; ALAMO, C.; CUENCA, E.; SHEN, W.W.; CLERVOY, P.; RUBIO,
33 G. History of the discovery and clinical introduction of chlorpromazine. *Annals of Clinical*
34 *Psychiatry*, 17(3):113–135, 2005.
35
36 LOUW, G. E.; WARREN, R. M.; GEY VAN PITTIUS, N. C.; MCEVOY, C. R. E.; VAN
37 HELDEN, P. D. & VICTOR, T. C. A Balancing Act: Efflux/Influx in Mycobacterial Drug
38 Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(8):3181–3189, 2009.
39
40 LUBASCH, A.; KELLER, I.; BORNER, K.; KOEPPE, P. & LODE, H. Comparative
41 pharmacokinetics of ciprofloxacin, gatifloxacin, grepofloxacin, levofloxacin, trovafloxacin
42 and moxifloxacin after single oral administration in healthy volunteers. *Antimicrobial*
43 *Agents and Chemoterapy*, 44(10):2600-2603, 2000.
44
45 LUCA, S. & MIHAESCU, T. History of BCG vaccine. *Maedica*, 8(1):53-8, 2013.
46
47 LUCKE, K.; HOMBACH, M.; FRIEDEL, U.; RITTER, C. & BÖTTGER, E.C. Automated
48 quantitative drug susceptibility testing of non-tuberculous mycobacteria using MGIT
49 960/EpiCenter TB eXiST. *Journal Antimicrobial and Chemotherapy*, 67(1):154–158, 2012.
50

1 MACHADO, D. The dynamics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*:
2 exploring the biological basis of multi- and extensively drug resistant tuberculosis
3 (MDR/XDR-TB) as a route for alternative therapeutic strategies. Tese de Doutorado,
4 Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, Portugal,
5 2014.

6

7 MACHADO, D.; COUTO, I.; PERDIGÃO, J.; RODRIGUES, L.; PORTUGAL,
8 I.; BAPTISTA, P.; VEIGAS, B.; AMARAL, L. & VIVEIROS, M. Contribution of efflux
9 to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.
10 *PLoS One*, 7(4):e34538, 2012.

11

12 MANCA, C.; TSENOVA, L.; BARRY, C.E. 3RD; BERGTOLD, A.; FREEMAN, S.;
13 HASLETT, P.A.; MUSSER, J.M.; FREEDMAN, V.H. & KAPLAN, G. *Mycobacterium*
14 *tuberculosis* CDC1551 induces a more vigorous host response in vivo and in vitro, but is
15 not more virulent than other clinical isolates. *Journal of Immunology*, 162(11):6740–6746,
16 1999.

17

18 MANJUNATHA, U.H.; BOSHOF, H.; DOWD, C.S.; ZHANG, L.; ALBERT,
19 T.J.; NORTON, J.E.; DANIELS, L.; DICK, T.; PANG, S.S.; BARRY, C.E. 3RD.
20 Identification of a nitroimidazo-oxazine
21 specific protein involved in PA824 resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings*
22 *of the National Academy of Sciences U S A*, 103(2):431-6, 2006.

23

24 MARQUEZ, B. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie*,
25 87(12):1137-1147, 2005.

26

27 MARTINS, M.; SANTOS, B.; MARTINS, A.; VIVEIROS, M.; COUTO, I.; CRUZ,
28 A.; PAGÈS, J.M. *et al.* An instrument-free method for the demonstration of efflux pump
29 activity of bacteria. *In Vivo*, 20(5):657–64, 2006.

30

31 MARTINS, M.; DASTIDAR, S.G.; FANNING, S.; KRISTIANSEN, J.E.; MOLNAR,
32 J.; PAGÈS, J.M.; SCHELZ, Z.; SPENGLER, G.; VIVEIROS, M.; AMARAL, L. Potential
33 role of non-antibiotics (helper compounds) in the treatment of multidrug-resistant Gram-
34 negative infections: mechanisms for their direct and indirect activities. *International*
35 *Journal of Antimicrobial Agents*, 31(3):198–208, 2008.

36

37 MARTINS, M.; VIVEIROS, M.; COUTO, I.; COSTA, S.S.; PACHECO, T.; FANNING,
38 S.; PAGÈS, J.M. & AMARAL, L. Identification of efflux pump-mediated multidrug-
39 resistant bacteria by the ethidium bromide-agar cartwheel method. *In Vivo*, 25 (2):171-8,
40 2011.

41

42 MARTTILA, H.J.; SOINI, H.; EEROLA, E.; VYSHNEVSKAYA, E.; VYSHNEVSKIY,
43 B.I.; OTTEN, T.F.; VASILYEF, A.V. & VILJANEN, M.K. A Ser315Thr substitution in
44 *KatG* is predominant in genetically heterogeneous multidrug resistant *Mycobacterium*
45 *tuberculosis* isolates originating from the St Petersburg area in Russia. *Antimicrobial*
46 *Agents and Chemotherapy*, 42(9):2443-2445, 1998.

47

48 MATHYS, V.; WINTJENS, R.; LEFEVRE, P.; BERTOUT, J.; SINGHAL, A.; KIASS,
49 M.; KUREPINA, N.; WANG, X. M.; MATHEMA, B.; BAULARD, A.; KREISWIRTH,
50 B. N. & BIFANI, P. Molecular genetics of para-aminosalicylic acid resistance in clinical

1 isolates and spontaneous mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents*
2 *and Chemotherapy*, 53(5):2100–2109, 2009.

3

4 MATSUMOTO, M.; HASHIZUME, H.; TOMISHIGE, T.; KAWASAKI, M.;
5 TSUBOUCHI, H.; SASAKI, H.; SHIMOKAWA, Y. & KOMATSU, M. OPC-67683, a
6 nitro-dihydro-imidazooxazole derivative with promising action against tuberculosis *in vitro*
7 and in mice. *PLoS Medicine*, 3(11):e466, 2006.

8

9 MAUS, C. E.; PLIKAYTIS, B. B & SHINNICK, T. M. Molecular analysis of cross-
10 resistance to capreomycin, kanamycin, amikacin, and viomycin in *Mycobacterium*
11 *tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(8):3192-7, 2005.

12

13 MCTAVISH, D. & SORKIN, E.M. Verapamil. An updated review of its
14 pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in hypertension.
15 *Drugs*, 38(1):19–76, 1989.

16

17 MERLE, C.S.; FIELDING, K.; SOW, O.B.; GNINAFON, M.; LO, M.B.; MTHIYANE,
18 T.; ODHIAMBO, J.; AMUKOYE, E.; BAH, B.; KASSA, F.; N'DIAYE,
19 A.; RUSTOMJEE, R.; JONG, B.C.; HORTON, J.; PERRONNE, C.; SISMANIDIS,
20 C.; LAPUJADE, O.; OLLIARO, P.L.; LIENHARDT, C. A four-month gatifloxacin-
21 containing regimen for treating tuberculosis. *The New England Journal of*
22 *Medicine*, 371(17):1588-98, 2014.

23

24 MITCHISON, D.A. The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy.
25 *Tubercle* 66(3): 219–25, 1985.

26

27 MLM - Mycobacteriology Laboratory Manual, Global Laboratory Initiative - Advancing
28 TB Diagnosis, First Edition, 2014.

29

30 MOKROUSOV, I.; OTTEN, T.; MANICHEVA, O.; POTAPOVA, Y.; VISHNEVSKY,
31 B.; NARVSKAYA, O. & RASTOGI, N. Molecular characterization of ofloxacin-resistant
32 *Mycobacterium tuberculosis* strains from Russia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,
33 52(8): 2937–2939, 2008.

34

35 MORRIS, R.P.; NGUYEN, L.; GATFIELD, J. et al. Ancestral antibiotic resistance in
36 *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*,
37 102(34):12200–12205, 2005.

38

39 MORTIMER, P.G. & PIDDOCK, L.J. A comparison of methods used for measuring the
40 accumulation of quinolones by *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and
41 *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 28(5):639–53, 1991.

42

43 MULDER, N. J.; ZAPPE, H. & STEYN, L. M. Characterization of a *Mycobacterium*
44 *tuberculosis* homologue of the *Streptomyces coelicolor whiB* gene. *Tubercle of Lung*
45 *Disease*, 79:299–308, 1999.

46

47 MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L. & PFALLER,
48 M.A. Manual of Clinical Microbiology, Washington, DC: ASM Press, 2007.

49

1 MUSSER, J. M. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic in-
2 sights. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(4):496-514, 1995.
3
4 NERLICH, A. G. & LOSCH, S. Paleopathology of human tuberculosis and the potential
5 role of climate. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2009:437187, 2009.
6
7 NEYFAKH, A. A. Mystery of multidrug transporters: the answer can be simple. *Molecular*
8 *Microbiology*, 44(5):1123-30, 2002.
9
10 NIKAIDO, H. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and
11 active efflux in bacteria. *Cell & Developmental Biology*, 12(3):215–223, 2001.
12
13 ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal*
14 *of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(1):1, 2003.
15
16 OETTINGER, T.; JØRGENSEN, M.; LADEFOGED, A.; HASLØV, K. & ANDERSEN,
17 P. Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: review of the historical and
18 biochemical evidence for a genealogical tree. *Tubercle and Lung Disease*, 79(4):243–250,
19 1999.
20
21 O’GARRA, A.; MCNAB, F.W.; WILKINSON, R.J; REDFORD, P.S.; BLOOM, C.I. &
22 BERRY, M.P.R. The Immune response in tuberculosis. *Annual Review of Immunology*,
23 31:475–527, 2013.
24
25 OKAMOTO, S.; TAMARU, A.; NAKAJIMA, C.; NISHIMURA, K.; TANAKA, Y.;
26 TOKUYAMA, S.; SUZUKI, Y. & OCHI, K. Loss of a conserved 7-methylguanosine
27 modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria.
28 *Molecular Microbiology*, 63(4):1096-1106, 2007.
29
30 ORDWAY, O.; VIVEIROS, M.; LEANDRO, C.; BETTENCOURT, R.; ALMEIDA,
31 J.; MARTINS, M.; KRISTIANSEN, J.E.; MOLNAR, J.; AMARAL, L. Clinical
32 concentrations of thioridazine kill intracellular multidrug-resistant *Mycobacterium*
33 *tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(3):917–922, 2003.
34
35 OTTENHOFF, T.H. & KAUFMANN, S.H. Vaccines against tuberculosis: where are we
36 and where do we need to go? *PLoS Pathogens*, 8(5):e1002607, 2012.
37
38 PAIXÃO, L.; RODRIGUES, L.; COUTO, I.; MARTINS, M.; FERNANDES, P.;
39 CARVALHO, C.C.C.R.; MONTEIRO, G.A.; SANSONETTY, F.; AMARAL, L. &
40 VIVEIROS, M. Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in
41 *Escherichia coli*. *Journal of Biological Engineering* 3:18, 2009.
42
43 PAGES, J.M. & AMARAL, L. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them:
44 challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica*
45 *Acta*,1794(5):826-33, 2009.
46
47 PALOMINO, J. C. & MARTIN, A. Is repositioning of drugs a viable alternative in the
48 treatment of tuberculosis? *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*, 68(2):275-83,
49 2012.
50

- 1 PALOMINO, J.C. & MARTIN, A. Tuberculosis clinical trial update and the current anti
2 tuberculosis drug portfolio. *Current Medicinal Chemistry*, 20(30): 3785–3796, 2013.
- 3
- 4 PALOMINO, J.C & MARTIN, A. Drug Resistance Mechanisms in *Mycobacterium*
5 *tuberculosis*. *Antibiotics*, 3:317-340, 2014.
- 6
- 7 PANDEY, A.K. & SASSETTI, C.M. Mycobacterial persistence requires the utilization of
8 host cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105(11):4376–
9 4380, 2008.
- 10
- 11 PANTEL, A.; PETRELLA, S.; MATRAT, S.; BROSSIER, F.; BASTIAN, S.; REITTER,
12 D.; JARLIER, V.; MAYER, C. & Aubry, A. DNA gyrase inhibition assays are necessary
13 to demonstrate fluoroquinolone resistance secondary to *gyrB* mutations in *Mycobacterium*
14 *tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(10):4524-4529, 2011.
- 15
- 16 PASCA, M.R.; GUGLIERAME, P.; ARCESI, F.; BELLINZONI, M.; DE ROSSI, E. &
17 RICCARDI, G. Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c, an ABCfluoroquinolone efflux pump in
18 *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(8):3175–3178,
19 2004.
- 20
- 21 PASCA, M.R.; GUGLIERAME, P.; DE ROSSI, E.; ZARA, F. & RICCARDI, G. *mmpL7*
22 gene of *Mycobacterium tuberculosis* is responsible for isoniazid efflux in *Mycobacterium*
23 *smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(11):4775–4777, 2005.
- 24
- 25 PASIPANODYA, J.G. & GUMBO, T. A new evolutionary and pharmacokinetic–
26 pharmacodynamic scenario for rapid emergence of resistance to single and multiple anti-
27 tuberculosis drugs. *Current Opinion of Pharmacology*, 11(5):457–463, 2011.
- 28
- 29 PAULSEN, I.T.; BROWN, M.H. & SKURRAY, R.A. Proton-Dependent Multidrug
30 Efflux Systems, *Microbiology Review*, 60(4):575-608, 1996.
- 31
- 32 PIDDOCK, L. J. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nature*
33 *Review Microbiology*, 4(8):629-36, 2006.
- 34
- 35 PLINKE, C.; WALTER, K.; ALY, S.; EHLERS, S. & NIEMANN, S. *Mycobacterium*
36 *tuberculosis* embB codon 306 mutations confer moderately increased resistance to
37 ethambutol in vitro and in vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(6):2891-6,
38 2011.
- 39
- 40 PROTOPOPOVA, M.; HANRAHAN, C.; NIKONENKO, B.; SAMALA, R.; CHEN, P.;
41 GEARHART, J.; EINCK, L. & NACY, C.A. Identification of a new antitubercular drug
42 candidate, SQ109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines. *Journal*
43 *Antimicrobial and Chemotherapy*, 56(5):968–974, 2005.
- 44
- 45 PUTMAN, M.; VAN VEEN, H. W. & KONINGS, W. N. Molecular properties of bacterial
46 multidrug transporters. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 64(4):672-693, 2000.
- 47
- 48 PYM, A.S.; SAINT-JOANIS, B. & COLE, S.T. Effect of *katG* mutations on the virulence
49 of *Mycobacterium tuberculosis* and the implication for transmission in humans. *Infection*
50 *and Immunity*, 70:4955e60, 2002.

1
2 RAMASWAMY, S. V. & MUSSER, J.M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent
3 resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tubercle and Lung Disease*, 79(1):
4 3–29, 1998.

5
6 RAMASWAMY, S.V.; REICH, R.; DOU, S.J.; JASPERSE, L.; PAN, X.; WANGER,
7 A.; QUITUGUA, T.; GRAVISS, E.A. Single nucleotide polymorphisms in genes
8 associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents*
9 *and Chemotherapy*, 47(4):1241–50, 2003.

10
11 RAMÓN-GARCÍA, S.; MARTÍN, C.; THOMPSON, C.J. & AÍNSA, J.A. Role of the
12 *Mycobacterium tuberculosis* P55 efflux pump in intrinsic drug resistance, oxidative stress
13 responses, and growth. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(9):3675–3682, 2009.

14
15 REECE, S.T. & KAUFMANN, S.H.E. Floating between the poles of pathology and
16 protection: can we pin down the granuloma in tuberculosis? *Current Opinion in*
17 *Microbiology*, 15(1):63–70, 2011.

18
19 REDDY, V.M.; EINCK, L.; ANDRIES, K. & NACY, C.A. In vitro interactions between
20 new antitubercular drug candidates SQ109 and TMC207. *Antimicrob Agents and*
21 *Chemotherapy*, 54(7):2840-6, 2010.

22
23 REY-JURADO, E.; TUDO, G.; MARTÍNEZ, J.A. & GONZÁLEZ-MARTÍN, J.
24 Synergistic effect of two combinations of antituberculous drugs against tuberculosis.
25 *Tuberculosis*, 92(3):260–3, 2012.

26
27 RINDER, H.; THOMSCHKE, A.; RÜSCH-GERDES, S.; BRETZEL, G.; FELDMANN,
28 K.; RIFAI, M. & LÖSCHER, T. Significance of *ahpC* promoter mutations for the
29 prediction of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *European Journal of*
30 *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 17(7):508-11, 1998.

31
32 RISK, P.F.; JACOBS, W.R. & ALLAND, D. Molecular determinants of drug resistance
33 in tuberculosis. *International Journal of Tuberculosis Lung Disease*, 4:(2 Suppl 1):S4-10,
34 2000.

35
36 ROBERTS, M.C. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation
37 of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiological Review*, 19:(1)–
38 24, 1996.

39
40 RODRIGUEZ-DÍAZ, J.C.; RUIZ, M.; LÓPEZ, M. & ROYO, G. Synergic activity of
41 fluoroquinolones and linezolid against *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal*
42 *of Antimicrobial Agents*, 21(4):354–6, 2003.

43
44 RODRIGUES, L.; MACHADO, D.; COUTO, I.; AMARAL, L. & VIVEIROS, M.
45 Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the *Mycobacterium tuberculosis*
46 complex. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(4): 695–700, 2012.

47
48 RODRIGUES, L.; RAMOS, J.; COUTO, I.; AMARAL, L.; VIVEIROS, M. Ethidium
49 bromide transport across *Mycobacterium smegmatis* cell-wall: correlation with antibiotic
50 resistance. *BMC Microbiology*, 11:35, 2011.

1
2 RODRIGUES, L.; SAMPAIO, D.; COUTO, I.; MACHADO, D.; KERN,
3 W.V.; AMARAL, L. & VIVEIROS, M. The role of efflux pumps in macrolide resistance
4 in *Mycobacterium avium* complex. *International Journal of Antimicrobial Agents*,
5 34(6):529–533, 2009.
6
7 RODRIGUES, L.; WAGNER, D.; VIVEIROS, M.; SAMPAIO, D.; COUTO, I.; VAVRA,
8 M.; KERN, W.V.; AMARAL, L. Thioridazine and chlorpromazine inhibition of ethidium
9 bromide efflux in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of*
10 *Antimicrobial Chemotherapy*, 61(5):1076–1082, 2008.
11
12 ROHDE, K.; YATES, R. M.; PURDY, G. E. & RUSSELL, D. G. *Mycobacterium*
13 *tuberculosis* and the environment within the phagosome. *Immunological Reviews*, 219: 37–
14 54, 2007.
15
16 ROZWARSKI, D.A.; GRANT, G.A.; BARTON, D.H.; JACOBS, W.R. &
17 SACCHETTINI, J.C. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from
18 *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 279(5347):98–102, 1998.
19
20 RUSTOMJEE, R.; LIENHARDT, C.; KANYOK, T.; DAVIES, G.R.; LEVIN,
21 J.; MTHIYANE, T.; REDDY, C.; STURM, A.W.; SIRGEL, F.A. *et al.* A phase II study of
22 the sterilising activities of ofloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin in pulmonary
23 tuberculosis. *International Journal of Tuberculosis Lung Disease*, 12(2):128-38, 2008.
24
25 SARATHY, J.P.; DARTOIS, V. & LEE, E.J.D. The role of transport mechanisms in
26 *mycobacterium tuberculosis* drug resistance and tolerance *Pharmaceuticals*, 5(11):1210-
27 1235, 2012.
28
29 SCHNAPPINGER, D.; EHRT, S.; VOSKUIL, M.I.; LIU, Y.; MANGAN,
30 J.A.; MONAHAN, I.M.; DOLGANOV, G.; EFRON, B.; BUTCHER, P.D.; NATHAN,
31 C.; SCHOOLNIK, G.K. Transcriptional adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within
32 macrophages: insights into the phagosomal environment. *Journal of Experimental*
33 *Medicine*, 198(5): 693–704, 2003.
34
35 SCHUMACHER, A.; TRITTLER, R.; BOHNERT, J.A.; KUMMERER, K.; PAGÈS, J.M.
36 & KERN, W.V. Intracellular accumulation of linezolid in *Escherichia coli*, *Citrobacter*
37 *freundii* and *Enterobacter aerogenes*: role of enhanced efflux pump activity and
38 inactivation. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 59:1261–1264, 2007.
39
40 SCORPIO, A.; LINDHOLM-LEVY, P.; HEIFETS, L. GILMAN, R.; SIDDIQI,
41 S.; CYNAMON, M.; ZHANG, Y. Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-
42 resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,
43 41(3):540–3, 1997.
44
45 SCORPIO, A. & ZHANG, Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding
46 pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide
47 in tubercle bacillus. *Nature Medicine*, 2(6):662–7, 1996.
48
49 SHAPIRO, H.M. Flow cytometry of bacterial membrane potential and permeability.
50 *Methods in Molecular Medicine*, 142:175–186, 2008.

1
2 SHI, W.; ZHANG, X.; JIANG, X.; YUAN, H.; LEE, J.S.; BARRY, C.E. 3RD.; WANG,
3 H.; ZHANG, W. & ZHANG, Y. Pyrazinamide inhibits translation in *Mycobacterium*
4 *tuberculosis*. *Science*, 333(6049):1630-2, 2011.
5
6 SIA, I.G. & WIELAND, M.L. Current concepts in the management of tuberculosis. *Mayo*
7 *Clinic Proceedings*, 86(4):348-361, 2011.
8
9 SIDDIQI, N.; DAS, R.; PATHAK, N.; BANERJEE, S.; AHMED, N.; KATOCH, V.M. &
10 HASNAIN, S.E. *Mycobacterium tuberculosis* isolate with a distinct genomic identity
11 overexpresses a tap-like efflux pump. *Infection*, 32(2):109-11, 2004.
12
13 SIDDIQI, S.H. & RÜSCH-GERDES, S. MGIT Procedure Manual, Foundation for
14 Innovative New Diagnostics, 2006.
15
16 SILVA, P. E.A & AÍNSA, J. A. Drugs and Drugs Interactions. In: PALOMINO, J. C.;
17 LEÃO, S.C. & RITACCO, V. *Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient care.*,
18 Cap. 18, p.593-634, 2007.
19
20 SILVA, P.E.; BIGI, F.; SANTANGELO, M.P. *et al.* Characterization of P55, a multidrug
21 efflux pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial*
22 *Agents and Chemotherapy*, 45(3):800-804, 2001.
23
24 SILVA, P.E.A & PALOMINO, J.C. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in
25 *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *Journal of Antimicrobial*
26 *Chemotherapy*, 66(7):1417-30, 2011.
27
28 SILVA, M.S.; SENNA, S.G.; RIBEIRO, M.O.; VALIM, A.R.; TELLES, M.A.; KRITSKI,
29 A.; MORLOCK, G.P.; COOKSEY, R.C.; ZAHA, A. & ROSSETTI M.L. Mutations in
30 *katG*, *inhA*, and *ahpC* genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium*
31 *tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9):4471-4, 2003.
32
33 SILVA, P.E.A.; VON GROLL, A.; MARTIN, A.; PALOMINO, J.C. Efflux as a
34 mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunology and*
35 *Medical Microbiology*, 63(1):1-9, 2011.
36
37 SINGH, M.; JADAUN, G.P.; RAMDAS, SRIVASTAVA, K.; CHAUHAN, V.; MISHRA,
38 R.; GUPTA, K.; NAIR, S.; CHAUHAN, D.S.; SHARMA, V.D.; VENKATESAN, K.
39 & KATOCH, V.M.
40 Effect of efflux pump inhibitors on drug susceptibility of ofloxacin resistant
41 *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Indian Journal of Medical Research*, 133:535-40,
42 2011.
43
44 SOMOSKÖVI, A.; PARSONS, L.M. & SALFINGER, M. The molecular basis of
45 resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*.
46 *Respiratory Research*, 2(3):164-168, 2001.
47
48 SOMOSKÖVI, A.; DORMANDY, J.; MITSANI, D.; RIVENBURG, J.; & SALFINGER,
49 M. Use of smear-positive samples to assess the PCR-based genotype MTBDR assay for

1 rapid, direct detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex as well as its resistance
2 to isoniazid and rifampin. *Journal Clinical Microbiology*, 44(12):4459-4463, 2006.

3
4 SONG, T.; PARK, Y.; SHAMPUTA, I.C.; SEO, S.; LEE, S.Y.; JEON, H-S. *et al.* Fitness
5 costs of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* are amplified under
6 conditions of nutrient starvation and compensated by mutation in the β -subunit of RNA
7 polymerase. *Molecular Microbiology*, 91(6):1106–19, 2014.

8
9 SPIES, F.S.; SILVA, P.E.; RIBEIRO, M.O.; ROSSETTI, M.L.& ZAHA, A. Identification
10 of mutations related to streptomycin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium*
11 *tuberculosis* and possible involvement of efflux mechanism. *Antimicrobial Agents and*
12 *Chemotherapy*, 52(8):2947-2949, 2008.

13
14 SPIES, F.S.; VON GROLL, A.; RIBEIRO, A.W.; RAMOS, D.F.; COSTA, E.R.D.;
15 MARTIN, A.; Palomino, J.C.; Rossetti, M.L.; Zaha, A. & Silva, P.E.A. Biological cost in
16 *Mycobacterium tuberculosis* with mutations in the *rpsL*, *rrs*, *rpoB*, and *katG* genes.
17 *Tuberculosis*, 93(2):150-54, 2013.

18
19 SREEVATSAN, S.; PAN, X.; STOCKBAUER, K. E.; CONNELL, N. D.; KREISWIRTH,
20 B. N.; WHITTAM, T. S. & MUSSER, J. M. Restricted structural gene polymorphism in
21 the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent
22 global dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*,
23 94(18):9869–9874, 1997. A

24
25 SREEVATSAN, S.; STOCKBAUER, K. E; PAN, X.; KREISWIRTH, B. N.;
26 MOGHAZEH, S. L.; JACOBS, W.R. JR.; TELENTI, A. & MUSSER, J.M. Ethambutol
27 resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. *Antimicrobial*
28 *Agents and Chemotherapy*, 41(8):1677-81, 1997. B

29
30 SREEVATSAN, S.; PAN, X.; STOCKBAUER, K.E.; WILLIAMS, D.L.; KREISWIRTH,
31 B.N. & MUSSER, J.M. Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin-
32 resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities.
33 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(4):1024-1026, 1997. C

34
35 SRIVASTAVA, S.; MUSUKA, S.; SHERMAN, C.; MEEK, C.; LEFF, R. & GUMBO, T.
36 Efflux-pump-derived multiple drug resistance to ethambutol monotherapy in
37 *Mycobacterium tuberculosis* and the pharmacokinetics and pharmacodynamics of
38 ethambutol. *The Journal of Infectious Disease*, 201(8):1225–31, 2010.

39
40 STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F.A. & WARD-RAINEY, N.L. Proposal for a new
41 hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *International Journal of*
42 *Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(2): 479–491, 1997.

43
44 STAVRI, M.; PIDDOCK, L.J.V. & GIBBONS, S. Bacterial efflux pump inhibitors from
45 natural sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(6):1247-60. 2006.

46
47 STOREY, P. B. A comparison of isoniazid-cycloserine with isoniazid-PAS in the therapy
48 of cavitary pulmonary tuberculosis. *American Review of Respiratory Disease* 81:868–80,
49 1960.

50

1 STOVER, C.K.; WARRENER, P.; VANDEVANTER, D.R.; SHERMAN, D.R.; ARAIN,
2 T.M.; LANGHORNE, M.H.; ANDERSON, S.W.; TOWELL, J.A.; YUAN, Y.;
3 MCMURRAY, D.N.; KREISWIRTH, B.N.; BARRY, C.E.; BAKER, W.R. A small-
4 molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. *Nature*,
5 405(6789): 962-966, 2000.

6

7 SULOCHANA, S.; RAHMAN, F. & PARAMASIVAN, C.N. In vitro activity of
8 fluoroquinolones against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Chemotherapy*,17:169-
9 73, 2005.

10

11 SUN, J.; DENG, Z. & YAN A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology
12 and pharmacological exploitations. *Biochemical and Biophysical Research
13 Communication*, 453(2):254-67, 2014.

14

15 TAKAYAMA, K & KILBURN, J. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by
16 ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,
17 33(9):1493-9, 1989.

18

19 TAYLOR, G.M.; STEWART, G.R.; COOKE, M.; CHAPLIN, S.; LADVA, S.; KIRKUP,
20 J.; PALMER, S. & YOUNG, D.B. Koch's Bacillus – a look at the first isolate of
21 *Mycobacterium tuberculosis* from a modern perspective. *Microbiology*, 149(Pt 11): 3213–
22 3220, 2003.

23

24 TEKAIA, F.; GORDON, S.V.; GARNIER, T.; BROSCHE, R.; BARRELL, B.G. & COLE,
25 S.T. Analysis of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* in silico. *Tubercle and Lung
26 Disease*, 79(6):329–342, 1999.

27

28 TENOVER, F. C.; CRAWFORD, J.T.; HUEBNER, R. E.; GEITER, L. J.; HORSBURGH,
29 C.R. JR. & GOOD, R. C. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *Journal
30 Clinical Microbiology*. 31(4):767–770, 1993.

31

32 TORTOLI, E.; BENEDETTI, M.; FONTANELLI, A. & SIMONETTI, M.T. Evaluation of
33 automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium
34 tuberculosis* to four major antituberculous drugs: comparison with the radiometric
35 BACTEC 460TB method and the agar plate method of proportion. *Journal of Clinical
36 Microbiology*, 40(2):607–10, 2002.

37

38 TELENTI, A.; IMBODEN, P.; MARCHESI, F.; SCHMIDHEINI, T.; BODMER, T.
39 Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by
40 polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis.
41 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(10): 2054–8, 1993.

42

43 TESSEMA, B.; BEER, J.; EMMRICH, F.; SACK, U. & RODLOFF, A.C. Analysis of
44 gene mutations associated with isoniazid, rifampicin and ethambutol resistance among
45 *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Ethiopia. *BMC Infectious Disease* 10;12:37,
46 2012.

47

48 TRAN, V.; LIU, J.; BEHR, M. A. M. BCG vaccines in molecular genetics of mycobacteria.
49 In: Hatfull, G.F. & Jacobs, W.R. American Society for Microbiology, Washington, DC
50 2014.

1
2 TRAUNER, A.; BORRELL, S.; REITHER, K. & GAGNEUX, S. Evolution of drug
3 resistance in tuberculosis: recent progress and implications for diagnosis and therapy.
4 *Drugs*, 74(10):1063–72, 2014.
5
6 TRUNZ, B.B.; FINE, P. & DYE, C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous
7 meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-
8 effectiveness. *Lancet*, 367(9517):1173–1180, 2006.
9
10 TUDÓ, G.; REY, E.; BORRELL, S.; ALCAIDE, F.; CODINA, G.; COLL, P.; MARTÍN-
11 CASABONA, N.; MONTEMAYOR, M.; MOURE, R.; ORCAU, A.; SALVADÓ,
12 M.; VICENTE, E.; GONZÁLEZ-MARTÍN, J. Characterization of mutations in
13 streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the area of
14 Barcelona. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(11):2341-6, 2010.
15
16 VAN DOORN, H.R.; DE HAAS, P.E.; KREMER, K.; VANDENBROUCKE-GRAULS,
17 C.M.; BORGDORFF, M.W.; VAN SOOLINGEN, D. Public health impact of isoniazid-
18 resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains with a mutation at amino-acid position 315 of
19 katG: a decade of experience in The Netherlands. *Clinical Microbiology and Infection*,
20 12(8):769–75, 2006.
21
22 VAN SOOLINGEN, D.; DE HAAS, P.E.; VAN DOORN, H.R.; KUIJPER, E.; RINDER,
23 H. & BORGDORFF, M.W. Mutations at amino acid position 315 of the *katG* gene are
24 associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful
25 transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. *Journal Infectious*
26 *Diseases*, 182(6):1788-1790, 2000.
27
28 VANDAL, O.H.; PIERINI, L.M.; SCHNAPPINGER, D.; NATHAN, C.F. & EHRT, S. A
29 membrane protein preserves intrabacterial pH in intraphagosomal *Mycobacterium*
30 *tuberculosis*. *Nature Medicine* 14(8):849–854, 2008.
31
32 VILCHÈZE, C. & JACOBS, W.R. Jr. The mechanism of isoniazid killing: clarity through
33 the scope of genetics. *Annual Review Microbiology*, 61:35-50, 2007.
34
35 VILCHÈZE, C.; WANG, F.; ARAI, M. HAZBÓN, M.H.; COLANGELI, R.; KREMER,
36 L.; WEISBROD, T.R.; ALLAND, D.; SACCHETTINI, J.C. & JACOBS, W.R.JR. Transfer
37 of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis inhA* resolves the target of isoniazid.
38 *Nature Medicine*, 12(9):1027–9, 2006.
39
40 VILCHÈZE, C.; WEISBROD, T.R.; CHEN, B.; KREMER, L.; HAZBÓN, M.H.; WANG,
41 F.; ALLAND, D.; SACCHETTINI, J.C.; JACOBS, W.R.JR. Altered NADH/NAD⁺ ratio
42 mediates coresistance to isoniazid and ethionamide in mycobacteria. *Antimicrobial Agents*
43 *and Chemotherapy*, 49(2):708–20, 2005.
44
45 VIVEIROS, M.; LEANDRO, C. & AMARAL, L. Mycobacterial efflux pumps and
46 chemotherapeutic implications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22(3):274–
47 278, 2003.
48
49 VIVEIROS, M.; LEANDRO, C.; RODRIGUES, L.; ALMEIDA, J.; BETTENCOURT, R.;
50 *et al.* Direct application of the INNO-LiPA Rif.TB line-probe assay for rapid identification

1 of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains and detection of rifampin resistance in 360
2 smear-positive respiratory specimens from an area of high incidence of multidrug-resistant
3 tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(9):4880–4884, 2005.

4

5 VIVEIROS, M.; MARTINS, M.; RODRIGUES, L.; MACHADO, D.; COUTO, I.;
6 AINSA, J. & AMARAL, L. Inhibitors of mycobacterial efflux pumps as potential boosters
7 for anti-tubercular drugs. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 10(9):983–998, 2012.

8

9 VIVEIROS, M.; PORTUGAL, I.; BETTENCOURT, R.; VICTOR, T.C.; JORDAAN,
10 A.M.; LEANDRO, C.; ORDWAY, D.; AMARAL, L. Isoniazid-induced transient high-
11 level-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,
12 46(9):2804–2810, 2002.

13

14 VIVEIROS, M.; MARTINS, A.; PAIXÃO, L.; RODRIGUES, L.; MARTINS, M.;
15 COUTO, I.; FÄHNRIK, E.; KERN, W.V. & AMARAL, L. Demonstration of intrinsic
16 efflux activity of *Escherichia coli* K-12 AG100 By an automated ethidium bromide
17 method. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31(5):458-462, 2008. A

18

19 VIVEIROS, M.; MARTINS, M.; COUTO, I.; RODRIGUES, L.; SPENGLER,
20 G.; MARTINS, A.; KRISTIANSEN, J.E.; MOLNAR, J. & AMARAL, L. New methods
21 for the identification of efflux mediated MDR bacteria, genetic assessment of regulators
22 and efflux pump constituents, characterization of efflux systems and screening for
23 inhibitors of efflux pumps. *Current Drug Targets*, 9(9):760-78, 2008. B

24

25 VIVEIROS, M.; RODRIGUES, L.; MARTINS, M.; COUTO, I.; SPENGLER,
26 G.; MARTINS, A. & AMARAL, L. Evaluation of efflux activity of bacteria by a semi-
27 automated fluorometric system. *Methods in Molecular Biology*, 642:159-72, 2010.

28

29 VON GROLL, A.; MARTIN, A.; PORTAELS, F.; JUREEN, P.; PALOMINO, J.C.;
30 HOFFNER, S.; VANDAMME, P. & SILVA, P.E.A. Fluoroquinolone Resistance in
31 *Mycobacterium tuberculosis* and Mutations in *gyrA* and *gyrB*. *Antimicrobial Agents A
32 and Chemotherapy*, 53(10):4498–4500, 2009.

33

34 WANG, F.; LANGLEY, R.; GULTEN, G.; DOVER, L.G.; BESRA, G.S.; JACOBS,
35 W.R.JR. & SACCHETTINI, J.C. Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis
36 and leprosy. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(1):73–8, 2007.

37

38 WEI, C-J.; LEI, B.; MUSSER, J.M. & TU, S-C. Isoniazid activation defects in
39 recombinant *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) mutants evident in
40 *InhA* inhibitor production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(2): 670-675, 2003.

41

42 WILLIAMS, D.L.; SPRING, L.; COLLINS, L.; MILLER, L.P.; HEIFETS, L.B.,
43 GANGADHARAM, P.R. & GILLIS, T.P. Contribution of *rpoB* mutations to development
44 of rifamycin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and
45 Chemotherapy*, 42(7):1853-1857, 1998.

46

47 WHO - World Health Organization Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Fourth
48 Global Report. The WHO/IUATLD Global Project on Antituberculosis Drug Resistance
49 Surveillance. 2002–2007. WHO/HTM/TB/ 2008.394. Geneva, Switzerland, 2008.

50

1 WHO - World Health Organization. Multidrug and extensively drug-resistant TB
2 (M/XDR-TB): Global report on surveillance and response. WHO/HTM/TB/2010.3, 2010.
3
4 WHO - World Health Organization. Guidelines for the programmatic management of
5 drugresistant tuberculosis: 2011 update. Geneva, 2011 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/
6 NBK148644](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK148644)
7
8 WHO - World Health Organization Global Tuberculosis Report (WHO/HTM/TB/2013.11)
9 Geneva, Switzerland, 2013.
10
11 WHO - World Health Organization. Global Tuberculosis Report
12 (WHO/HTM/TB/2014.08) Geneva, Switzerland, 2014.
13
14 WOLF, A.J.; DESVIGNES, L.; LINAS, B.; BANAIIEE, N.; TAMURA, T.; TAKATSU, K.
15 & ERNST, J.D. Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis*
16 depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *Journal of*
17 *Experimental Medicine*, 205(1):105-115, 2008.
18
19 YOUNG, D.B.; PERKINS, M.D.; DUNCAN, K.; BARRY, C.E. 3rd. Confronting the
20 scientific obstacles to global control of tuberculosis. *Journal of Clinical Investigation*
21 118(4):1255–65, 2008.
22
23 ZAUNBRECHER, M. A.; SIKES, R.D.JR; METCHOCK, B.; SHINNICK, T.M. &
24 POSEY, J.E. Over-express-ion of the chromosomally encoded aminoglycoside
25 acetyltransferase *eis* confers kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.
26 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 106(47):20004-9, 2009.
27
28 ZHANG, Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annual Review of*
29 *Pharmacology and Toxicology*, 45:529-64, 2005.
30
31 ZHANG, M.; YUE, J.; YANG, Y.P.; ZHANG, H.M.; LEI, J.Q.; JIN, R.L.; ZHANG, X.L.
32 & WANG, H.H. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in
33 *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *Journal of Clinical Microbiology*,
34 43(11): 5477-82, 2005.
35
36 ZHANG, Y.; HEYM, B.; ALLEN, B.; YOUNG, D.; COLE, S. The catalase/peroxidase
37 gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* 358(6387):591–3,
38 1992.
39
40 ZHANG, Y. & YEW, W.W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium*
41 *tuberculosis*. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 13(11):1320–
42 30, 2009.
43
44 ZHANG, Y.; PERMAR, S. & SUN, Z. Conditions that may affect the results of
45 susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *Journal of Medical*
46 *Microbiology*, 51(1):42–9, 2002.
47
48 ZHANG, Y.; WADE, M.M.; SCORPIO, A.; ZHANG, H. & SUN, Z. Mode of action of
49 pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and

1 energetics by pyrazinoic acid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(5):790–795,
2 2003.

3
4 ZIMHONY, O.; VILCHÈZE, C.; ARAI, M.; WELCH, J.T.; JACOBS, W.R.JR. Pyrazinoic
5 acid and its n-propyl ester inhibit fatty acid synthase type I in replicating tubercle bacilli.
6 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(2):752–4, 2007.

7
8 ZIMIC, M.; LOLI, S.; GILMAN, R.H.; GUTIERREZ, A.; FUENTES, P.; COTRINA,
9 M.; KIRWAN, D. & SHEEN, P. A new approach for pyrazinamide susceptibility testing in
10 *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbial Drug Resistance*, 18(4):372-5, 2012.

11 ZHENG, J.; RUBIN, E.J.; BIFANI, P.; MATHYS, V.; LIM, V.; AU, M.; JANG, J.; DICK,
12 T.; WALKER, J.R.; PETHE, K.; CAMACHO, L.C. & NAM, J. Para-aminosalicylic acid
13 is a prodrug targeting dihydrofolate reductase in *Mycobacterium tuberculosis* *The Journal*
14 *of Biological Chemistry*, 288(32):23447–23456, 2013.

15
16 ZHANG, M.; SALA, C.; DHAR, N.; VOCAT, A.; SAMBANDAMURTHY,
17 V.K.; SHARMA, S.; MARRINER, G.; BALASUBRAMANIAN, V.; COLE, S.T. In vitro
18 and in vivo activities of three oxazolidinones against nonreplicating *Mycobacterium*
19 *tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(6):3217-3223, 2014. A

20
21 ZHANG, L.; PANG, Y.; YU, X.; WANG, Y.; GAO, M.; HUANG, H.; ZHAO, Y.
22 Linezolid in the treatment of extensively drug-resistant tuberculosis. *Infection*, 42(4):705-
23 11, 2014. B

24
25 ZHANG, Y.; SCORPIO, A.; NIKAIDO, H. & SUN, Z. Role of acid pH and deficient
26 efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to
27 pyrazinamide. *Journal of Bacteriology*, 181(7):2044–2049, 1999.

28
29 ZUBER, B.; CHAMI, M.; HOUSSIN, C.; DUBOCHET, J.; GRIFFITHS, G. & DAFPE,
30 M. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their
31 native state. *Journal of Bacteriology*, 190(16):5672–5680, 2008.

32
33 ZUMLA, A.I.; GILLESPIE, S.H.; HOELSCHER, M.; PHILIPS, P.P.J.; COLE, S.T.;
34 ABUBAKAR, I.; MCHUGH, T.D.; SCHITO, M.; MAEURER, M. & NUNN, A.J. New
35 antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future
36 prospects. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(4):327–40, 2014.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

CURRICULUM VITAE RESUMIDO

Tatiane Silveira Coelho

1
2
3 **CURRICULUM VITAE resumido**

4
5 **COELHO, T. S.**

6
7 **1. DADOS PESSOAIS**

8
9 **Nome:** Tatiane Silveira Coelho

10
11 **Local e data de nascimento:** Rio Grande, RS, Brasil, 06 de julho de 1985

12
13 **Endereço profissional:** General Osório, s/n Centro, Rio Grande -RS

14
15 **Telefone profissional:** 53-32374633 **E-mail:** tati.coelho85@gmail.com

16
17
18 **2. FORMAÇÃO:**

19
20 **2015** Doutora em Ciências: Biologia Celular e Molecular
21 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre,
22 Brasil
23 Título: Relação entre o mecanismo de efluxo e a resistência aos
24 antimicobacterianos em isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*
25 Orientador: Dr^a Maria Lucia Rosa Rossetti.

26
27 **2008 - 2010** Mestrado em Ciências da Saúde
28 Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, Brasil
29 Título: Naftoimidazóis, naftoxazóis e fenazinas como protótipos no
30 desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da tuberculose
31 Orientador: Dr. Pedro Eduardo Almeida da Silva

32
33 **2004 - 2007** Graduação em Ciências Biológicas Bacharelado
34 Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, Brasil
35 Título: Avaliação da atividade antimicobacteriana de compostos
36 pirazólicos
37 Orientador: Dr. Pedro Eduardo Almeida da Silva

38
39
40
41 **3. ESTÁGIOS:**

42
43 Bolsa de iniciação científica

44
45 **Pesquisa de *Cryptococcus neoformans* e outros fungos oportunistas em pacientes com**
46 **SIDA** no período de abril a dezembro de 2004 – FURG – Programa Voluntário de
47 Qualificação Acadêmica

48
49 **Desenvolvimento de novos métodos diagnósticos com tuberculose** no período de abril a
50 dezembro de 2005 – FURG/CNPq

1
2 **Estudo de novos antimicobacterianos** no período de março a julho de 2007 –
3 FURG/CNPq

4
5 **4. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS**
6
7

8 1) ZANATTA, N. ; SANTOS, J. M. ; BUTZGE, C. ; BONACORSO, H. G.;
9 BONACORSO, H. G. ; MARTINS, M. A. P. ; Silva, PA ; GROLL, A. V. ; **COELHO, T.**
10 **S.** One-pot Two-step Synthesis of New Trifluoromethyl-containing Amino Alcohols.
11 International Journal of Chemistry: Recent Science, v. 34, p. 1317, 2013.
12

13 2) RODRIGUES, M. O. ; CANTOS, J. ; D Oca CRM ; Soares, KL ; COELHO, T.;
14 Piovesan, L ; Russowsky, D ; Almeida da Silva, P. E. ; DOCA, M. G. M. . Synthesis and
15 antimycobacterial activity of isoniazid derivatives from renewable fatty acids. Bioorganic
16 & Medicinal Chemistry (Print) **JCR**, v. 21, p. 6910-6914, 2013.
17

18 3) **COELHO, T. S.** ; CANTOS, JESSICA B. ; BISPO, MARCELLE L.F.; GONÇALVES,
19 RAONI S.B. ; LIMA, CAMILO H.S. ; DA SILVA, PEDRO E.A. ; DE SOUZA,
20 MARCUS . In vitro anti-mycobacterial activity of (E)-N'-(monosubstituted-benzylidene)
21 isonicotinohydrazide derivatives against isoniazid-resistant strains. Infectious Disease
22 Reports, v. 4, p. 49-51, 2012.
23

24 4) CANTOS, J. B. ; **COELHO, T.S.** ; CARNEIRO, P. F. ; MOURA, K. C. G. ; PINTO,
25 M. C. F. R. ; JÚNIOR, E.N.S. ; SILVA, P. E. A. . Antimicrobial evaluation of quinones
26 and heterocyclics compounds against *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium kansasii*
27 and *Mycobacterium abscessus*. Latin American Journal of Pharmacy, v. 31, p. 507-513,
28 2012.
29

30 5) MOURA, K.C.G. ; CARNEIRO, P. F. ; PINTO, M. C. F. R. ; SILVA, J. ; MALTA, V. ;
31 SIMONE, C. ; DIAS, G. ; JARDIM, G. ; CANTOS, J. B. ; **Coelho, T. S.** ; SILVA, P. E. ;
32 SILVA JUNIOR, E. N. . 1,3-Azoles from ortho-naphthoquinones: Synthesis of aryl
33 substituted imidazoles and oxazoles. Bioorganic & Medicinal Chemistry (Print) **JCR**, v. 20,
34 p. 6482-6488, 2012.
35

36 6) CASTELLAR, A. ; **COELHO, T.S.** ; Almeida da Silva, Pedro ; RAMOS, D. F. ;
37 LOURENCO, C. S. ; LAGE, C.L.S. ; JULIAO, L. S. ; BARBOSA, Y. G. ; LEITAO, S.
38 G. . The activity of flavones and oleanolic acid from *Lippia lacunosa* against susceptible
39 and resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. Revista Brasileira de Farmacognosia
40 (Impresso) **JCR**, v. 1, p. 1-6, 2011.
41

42 7) OLIVEIRA, D. R. ; LEITAO, G. G. ; **Coelho, T. S.** ; SILVA, P. E. A. ; LOURENÇO,
43 M.C.S ; ARQMO, ; LEITAO, S. G. . Comparison between ethnopharmacological versus
44 random plant selection methods for the evaluation of the antimycobacterial activity.
45 Revista Brasileira de Farmacognosia (Impresso) **JCR**, v. 1, p. 8-14, 2011.
46

47 8) CARNEIRO, P. F. ; PINTO, M. C. F. R. ; **Coelho, T. S.** ; CAVALCANTI, B.C. ;
48 PESSOA, C. ; SIMONE, C.A. ; NUNES, I.K.C. ; OLIVEIRA, N.M. ; ALMEIDA, R.G. ;
49 PINTO, A. V. ; MOURA, K.C.G. ; SILVA, P. E. A. ; JÚNIOR, E.N.S. . Quinonoid and
50 phenazine compounds: Synthesis and evaluation against H37Rv, rifampicin and isoniazid-

1 resistance strains of *Mycobacterium tuberculosis*. European Journal of Medicinal
2 Chemistry **JCR**, v. 46, p. 4521-4529, 2011.

3
4 9) **COELHO, T. S.**; Silva, Raphael S.F.; Pinto, Antonio V.; Pinto, Maria C.F.R.; Scaini,
5 Carlos J.; Moura, Kelly C.G.; Almeida da Silva, Pedro. Activity of β -lapachone derivatives
6 against rifampicin-susceptible and -resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*.
7 Tuberculosis (Edinburgh) **JCR**, v. 90, p. 293-297, 2010.

8
9 10) D' OCA, C.R.M.; **COELHO, T.S.**; MARINHO,T.G.; HACK, C.R.L.; DA COSTA,
10 R.D.; DA SILVA, P.E.A.; D OCA,M.G.M. Synthesis and antituberculosis activity of new
11 fatty acid amides. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **JCR**, v. 20, p. 5255-5257,
12 2010.

13
14 11) PINTO, S. C. ; LEITAO, G. G. ; OLIVEIRA, D. R. ; BIZZO, H. R. ; RAMOS, D.
15 F. ; **COELHO, T. S.** ; SILVA, P. E. A. ; LOURENCO, C. S. ; LEITAO, S. G. . Chemical
16 composition and antimycobacterial activity of the essential oil from *Anemia tomentosa* var.
17 *anthriscifolia*. Natural Product Communications **JCR**, v. 4, p. 1675-1678, 2009.

18
19 12) SILVA, P. E. A. ; RAMOS, D. F. ; BONACORSO, H. G. ; IGLESIA, A. I.
20 L.; OLIVEIRA, M. R. ; **COELHO, T. S.** ; NAVARINI, J. ; MORBIDONI, Hector ;
21 ZANATTA, N. ; MARTINS, M. A. P. . Synthesis and in vitro antimycobacterial activity of
22 3-substituted 5-hydroxy-5-trifluoro[chloro]methyl-4,5-dihydro-1H-1-(isonicotinoyl)
23 pyrazoles. International Journal of Antimicrobial Agents **JCR**, v. 32, p. 139-144, 2008.

24
25 13) LEITAO, F. S. ; LEITAO, S. G. ; Almeida, M. Z. ; CANTOS, J. B. ; **Coelho, T.**
26 **S.** ; SILVA, P. E. A. . Medicinal plants from open-air markets in the State of Rio de
27 Janeiro, Brazil as a potential source of new antimycobacterial agents. Journal of
28 Ethnopharmacology **JCR**, 2013.

29 30 **7. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS**

31
32 1) RAMOS, D. F. ; COELHO, H. S. ; ZANATTA, N. ; MARTINS, M. A. P. ;
33 BONACORSO, H. G. ; **COELHO, T.S.** ; SILVA, P. E. A. Antimicrobial activity of
34 some halogenated heterocycles. In: 3rd Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry,
35 2006, São Pedro-SP, 2006.

36
37 2) BONACORSO, H. G. ; ZANATTA, N. ; MARTINS, M. A. P. ; OLIVEIRA, M.
38 R.; **COELHO, T. S.**; RAMOS, D. F. ; SILVA, P. E. A. . Actividad antituberculosis de
39 derivados halogenados pirazólicos de la isoniazida. In: XVIII Congreso Latinoamericano
40 de Microbiología, 2006, Pucón/Chile, 2006.

41
42 3) SILVA, P. E. A. ; RAMOS, D. F. ; GROLL, A. V. ; RAMIS, I. B. ; **COELHO, T.S.**;
43 Flach, J. . Avaliação da atividade antimicobacteriana de extratos vegetais e moléculas de
44 síntese. In: II Amostra Científica da Associação de Caridade Santa Casa do Rio Grande,
45 2007, Rio Grande-RS. II Amostra Científica da Associação de Caridade Santa Casa do Rio
46 Grande, 2007.

47
48 4) **COELHO, T. S.**; RAMOS, D. F. ; ZANATTA, N. ; BONACORSO, H. G.; MARTINS,
49 M. A. P. ; SILVA, P. E. A. Análise da atividade de compostos pirazólicos frente a cepas de

- 1 *Mycobacterium tuberculosis*. In: VI Mostra da Produção Universitária, Rio Grande/RS,
2 2007.
- 3
- 4 5) RAMOS, D. F. ; SILVA, A. B. S. ; **COELHO, T. S.**; SILVA, P. E. A. ; ZANATTA, N.;
5 BONACORSO, H. G. ; MARTINS, M. A. P. Avaliação da atividade antimicobacteriana de
6 compostos pirazólicos. In: 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Brasília/Brasil,
7 2007.
- 8
- 9 6) **COELHO, T. S.**; RAMOS, D. F. ; PINTO, A. V. ; SILVA, R.S.F ; PINTO, M. C. F. R.;
10 MOURA, K. C. G. ; SILVA, P. E. A. antituberculosis activity of β -lapachones derivates.
11 In: VII Mostra da Produção Universitária, Rio Grande/RS, 2008.
- 12
- 13 7) LEITAO, F. S. ; PARENTE, R. ; LEITAO, S. G. ; ALMEIDA, M. Z. ; LOURENCO, C.
14 S.; **COELHO, T. S.**; SILVA, P. E. A. Plantas medicinais vendidas em feiras livres em
15 Petrópolis e Nova Friburgo, RJ: A erva-de-passarinho. In: I Jornada Fluminense de
16 Produtos Naturais, Macaé/RJ, 2008.
- 17
- 18 8) RODRIGUES, K.; RAMOS, D.F.; **COELHO, T.S.**; CARRION, L.L.; OSÓRIO,
19 M.I.C.; NUNES, C.V.; SILVA, P.E.A.; SCAINI, C.J. In: 1º Simpósio Internacional de
20 Microbiologia Clínica, Gramado/RS, 2008.
- 21
- 22 9) **COELHO, T.S.**; BERTUCCI, A.; RAMOS, D.F.; OLIVARO, C.; CERDEIRAS, M.P.;
23 VAZQUEZ, A.; SILVA, P.E.A. Atividade antimicobacteriana de extratos vegetais. In: 1º
24 Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, Gramado/RS, 2008.
- 25
- 26 10) **COELHO, T.S.**; RAMOS, D.F.; PINTO, A.V.; SILVA, R.S.F.; PINTO, M.C.F.R.;
27 DE MOURA, K.C.G.; SILVA, P.E.A. Anti-tuberculosis activity of β -lapachones derivates.
28 In: First International Congress – Micobacteria: A challenge for the 21st century, Third
29 Meeting of the SLAMTB, Bogotá/Colômbia, 2008.
- 30
- 31
- 32 11) **COELHO, T.S.**; MOURA, K.C.G.; RAMOS, D.F.; PINTO, A.V.; SILVA, M.C.F.R.;
33 SILVA, P.E.A. Atividade antimicobacteriana de naftoimidazóis derivados de quinonas
34 naturais. In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Porto de Galinhas/PE, 2009.
- 35
- 36 12) LEITAO, F. S. ; PARENTE, R. ; LEITAO, S. G. ; ALMEIDA, M. Z. ; **COELHO,**
37 **T.S.** ; SILVA, P. E. A. Plantas medicinais vendidas em feiras livres em Petrópolis e Nova
38 Friburgo, RJ e análise fitoquímica de espécies potenciais. 60 ° Congresso Nacional de
39 Botânica, Feira de Santana/BA, 2009.
- 40
- 41 13) **COELHO, T. S.**; RAMOS, D.F.; OLIVEIRA, D.R.; LEITÃO, S.G.; LEITÃO, G.G.;
42 SILVA, P.E.A. Extratos Vegtais como fonte de novos fármacos para o tratamento da
43 tuberculose: resultados preliminares com uma planta da família *Apocynaceae*. In: 1º
44 Congressi Latino-Americano de Resistência Microbiana, Santa Cruz/RS, 2009.
- 45
- 46 14) ROS, C. ; LOPES, C. R. ; **COELHO, T. S.** ; MARINHO, T. G. ; SILVA, P. E. A. ; D
47 OCA, M. G. M. . Atividade antituberculose de metilbenzilamidas graxas. In: XVII
48 SBQSUL – Desafios em Química Tecnológica e Ambiental, Rio Grande/RS, 2009.
- 49
- 50 15) **COELHO, T. S.**; CANTOS, J. B. ; CARNEIRO, P. F. ; GUIMARAES, T. T. ;

1 PINTO, M. C. F. R. ; MOURA, K. C. G. ; PINTO, A. V. ; SILVA, P. E. A. Avaliação da
2 atividade antimicobacteriana de derivados reduzidos e heterocíclicos de quinonas naturais.
3 IV Encontro Nacional de Tuberculose, Rio de Janeiro/RJ, 2010.

4
5 16) D'OCA, C.R.M.; **COELHO, T.S.**; DUARTE, R.C.; HACK, C.R.L.; RODRIGUES,
6 M.; MARINHO, T.G.; SILVA, P.E.A.; D'OCA, M.G.M. Synthesis and antituberculosis
7 activity of new fatty acid amides. In: BrazMedChem-The 5th Brazilian Symposium on
8 Medicinal Chemistry, Ouro Preto/MG, 2010.

9
10 17) LEITÃO, F.; LEITÃO, S.G.; ALMEIDA, M.Z.; NOGUEIRA, G.; **COELHO, T. S.**;
11 CANTOS, J.; SILVA, P.E.A. Etnobotânica urbana: espécies medicinais com potencial
12 antimicobacteriano. In: XX Congresso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina,
13 Fortaleza/CE, 2011.

14
15 18) **COELHO, T. S.**; MASCHAMANN, R.A.; SPIES, F.S.; RIBEIRO, M.O.; SILVA,
16 P.E.A.; ROSSETTI, M. L. Caracterização molecular do efluxo como mecanismo envolvido
17 na resistência aos antimicrobianos em isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*. In:
18 XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, Santos/SP, 2012.

19
20 19) **COELHO, T.S.**; MASCHAMANN, R.A.; SPIES, F.S.; VON GROLL, A.;
21 VIVEIROS, M.; ROSSETTI, M.L.R.; SILVA, P.E.A. Efflux as mechanism involved in
22 antimicrobial resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. In: 24th
23 European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID),
24 Barcelona/Espanha, 2014.