

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia

**Presença de bombas de efluxo em isolados clínicos e ambientais de
Acinetobacter spp.**

Desirèe Padilha Marchetti

Porto Alegre, dezembro de 2010.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia

**Presença de bombas de efluxo em isolados clínicos e ambientais de
Acinetobacter spp.**

Acadêmica: Desirèe Padilha Marchetti

Orientadora: Gertrudes Corção

Co-orientadora: Alessandra Einsfeld Ferreira

Porto Alegre, dezembro de 2010.

*Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida e viver com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia,
porque o mundo pertence a quem se atreve
e a vida é muito para ser insignificante.*

(Charlie Chaplin)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha orientadora Gertrudes Corção, por ter me recebido em 2008 com braços abertos no laboratório 166, e desde então me auxilia no que for preciso.

A minha co-orientadora Alessandra Einsfeld, pelos conhecimentos que me transmitiu, pelos almoços agradáveis, fofocas intermináveis, incentivo e força, mesmo quando as coisas pareciam desabar, mas principalmente pela amizade que construímos.

A todos os meus queridos companheiros e amigos do laboratório 166 de microbiologia: Carolina, Letícia, Giuliano, Natália, Lauren, Raisa, Maysa, Thaisy, Lyvia e Gabriela, pela grande ajuda que sempre me deram.

Aos meus colegas de graduação, pela forte amizade que construímos ao longo desses quatro anos e meio, por todas as vezes que me ouviram e me auxiliaram e por estarem sempre presente, tanto em momentos maravilhosos quanto em momentos não tão bons assim.

A minha família, por toda a força, incentivo, por acreditarem e investirem sempre em mim, em especial minha mãe Cinara e meu pai Anibal. Gostaria de agradecer também a minha irmã Fernanda e meu cunhado Ricardo, que mesmo estando a muitos quilômetros de distância, sempre estiveram por perto, dispostos a ajudarem no que fosse preciso.

ÍNDICE GERAL

1. ARTIGO.....	6
1.1. RESUMO.....	7
1.2. INTRODUÇÃO.....	8
1.3. MÉTODOS.....	10
1.3.1. Isolados de <i>Acinetobacter</i> spp. analisados.....	10
1.3.2. Seleção das cepas analisadas.....	11
1.3.3. Concentração Inibitória Mínima.....	11
1.3.4. Detecção Fenotípica do Sistema de Efluxo Dependente da Força Próton Motiva nos isolados.....	12
1.3.5. Extração do DNA e detecção do gene <i>adeA</i>	12
1.3.6. Análise estatística.....	13
1.4. RESULTADOS.....	13
1.5. DISCUSSÃO.....	17
1.6. CONCLUSÃO.....	21
1.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
1.8. ANEXOS.....	27
1.8.1. Tabela 1.....	27
1.8.2. Tabela 2.....	29
1.8.3. Normas para publicação.....	32

1. ARTIGO

O presente artigo foi elaborado de acordo com as normas da Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, apresentadas em anexo no final do trabalho.

Presença de bombas de efluxo em isolados clínicos e ambientais de *Acinetobacter* spp.

Desirèe Padilha Marchetti¹, Carolina de Souza Gusatti², Alessandra Einsfeld Ferreira³,
Gertrudes Corção⁴.

¹Acadêmica em Farmácia, UFRGS.

²Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

³Doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, UFRGS.

⁴Professor Associado III do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

Endereço para correspondência: Sarmento Leite, 500

Porto Alegre, RS, Brasil

Cep: 90050-170

Tel/Fax.: 55 51 33083445

Contato por: desireepmarchetti@gmail.com ; corcao@ufrgs.br

1.1. RESUMO

Acinetobacter spp. é um cocobacilo Gram negativo, considerado um patógeno oportunista que está envolvido em Infecções Associadas à Assistência à Saúde (IAAS). Esses micro-organismos possuem diversos mecanismos de resistência a antimicrobianos, podendo citar a presença de bombas de efluxo, que expulsam compostos utilizando a energia próton motiva. Para a detecção de bombas de efluxo, foram realizados testes fenotípicos com 107 isolados de *Acinetobacter* spp., dentre estes, 31 são isolados de efluente hospitalar e 76 são de origem clínica. Foi verificada a diminuição da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos ceftazidima, amicacina, imipenem, digluconato de clorexidina e quaternário de amônio, na presença e ausência do inibidor de bomba de próton carboxilciadina m-clorofenilhidrazona. Com os mesmos isolados também foi realizada a detecção do gene *adeA*, através da técnica de PCR. Verificou-se que 56 isolados de *Acinetobacter* spp. apresentavam diminuição de concentração inibitória mínima de um ou mais antimicrobianos, na presença do inibidor. Através da técnica de PCR foi detectada a presença do gene *adeA* em 70 isolados (65%). Através da análise estatística de McNemar, os testes fenotípicos e moleculares estão significativamente relacionados ($p < 0,01$), então se pode inferir que os isolados testados possuem, como mecanismo de resistência, a presença de bombas de efluxo e que este gene está sendo expresso, já que o teste fenotípico indicou a expulsão dos antimicrobianos.

PALAVRAS-CHAVE: *Acinetobacter* spp, bombas de efluxo, CCCP, concentração inibitória mínima, resistência bacteriana.

1.2. INTRODUÇÃO

Acinetobacter spp. é um cocobacilo Gram-negativo não fermentador, aeróbico, classificado como um patógeno oportunista envolvido frequentemente em Infecções Associadas à Assistência à Saúde (IAAS) ocorridas em unidades de tratamento intensivo (UTI), podendo causar bacteremia, pneumonia e infecções do trato urinário em pacientes hospitalizados^{1,2}. Estes micro-organismos são muito versáteis, crescendo em condições variadas de temperatura e pH, e tais propriedades explicam a capacidade dos mesmos persistirem em condições úmidas ou secas no ambiente hospitalar, contribuindo assim para a sua transmissão³. O tratamento de infecções causadas por *Acinetobacter* spp. é dificultado devido à resistência intrínseca desse micro-organismo a várias classes de agentes antimicrobianos⁴.

Biocidas, incluindo anti-sépticos e desinfetantes, são muito utilizados em hospitais e outros serviços de saúde para a esterilização de equipamentos médicos e de ambientes hospitalares. Em particular, os desinfetantes desempenham um papel importante no controle e prevenção de Infecções Associadas à Assistência à Saúde⁵. Antimicrobianos, desinfetantes e metais pesados geralmente são lançados ao mesmo tempo na água e podem exercer uma atividade seletiva, bem como um dano ecológico às comunidades de ambientes aquáticos, resultando em uma maior resistência aos antimicrobianos⁶.

A resistência a certos tipos de antimicrobianos pode ser atribuída devido ao sinergismo entre a redução da entrada da droga (principalmente pela diminuição da permeabilidade da membrana externa) e a expulsão da droga (via bombas de efluxo, que se encontram expressas de maneira constitutiva), o que se resume em uma menor suscetibilidade aos antimicrobianos⁷. Isto, somado a outros mecanismos de resistência,

tais como a produção de enzimas e alteração do sítio de ação, gera um fenótipo de multirresistência⁸. Aminoglicosídeos, eritromicina, cloranfenicol, trimetopim, fluoroquinolonas, alguns β -lactâmicos e também, recentemente, tigeciclina são considerados substratos para bombas de efluxo. Estes antimicrobianos agindo como substratos, podem aumentar a expressão dos genes que codificam essas bombas, acarretando um perfil de multirresistência⁷.

As bombas de efluxo correspondem a uma classe de transportadores envolvidos na captação de nutrientes essenciais e íons, excreção de produtos do metabolismo bacteriano e de substâncias tóxicas, além de participarem em processos de comunicação entre células, com o meio ambiente e também está relacionado à patogenicidade bacteriana (durante a colonização e sobrevivência do micro-organismo no hospedeiro)^{7,9}.

O sistema de efluxo de multidrogas tem sido agrupado em seis famílias: superfamília cassete de ligação de ATP (ABC), superfamília dos facilitadores principais (MFS), família resistência-nodulação-divisão (RND), família de extrusão de multidrogas e compostos tóxicos (MATE), família de baixa resistência a multidrogas (SMR) e superfamília dos transportadores drogas/metabólitos (DMT)^{10,11}.

O principal sistema de efluxo envolvido nos mecanismos de resistência pertence ao grupo dependente da força próton motiva, visto que os mais importantes são da família RND, MFS e SMR. Em *Acinetobacter baumannii*, a resistência aos antimicrobianos está associada com as famílias MFS e RND¹⁰. Esta última consiste em um sistema tripartido, denominado AdeABC⁴, o qual foi identificado em cepas de *A. baumannii* em 2001⁷. AdeA é uma proteína transmembrana, adeB é um transportador e

adeC é uma proteína de membrana externa¹⁰. Os três genes (*adeA*, *adeB*, e *adeC*) que codificam estes três componentes de efluxo são contíguos no genoma e orientados diretamente, o que sugere a formação de um operon, e precedidos por dois genes regulatórios, *adeR* e *adeS*¹¹.

Um ensaio fenotípico com o qual é possível detectar este mecanismo corresponde à utilização de um próton-ionóforo chamado de carboxilciadina m-clorofenilhidrazona (CCCP) como inibidor dos sistemas de efluxo¹². Estas moléculas interrompem o gradiente de prótons na membrana o que acarreta em diminuição da energia disponível para o transporte. Dessa maneira, os antimicrobianos não podem ser expulsos pela bomba AdeABC^{8,13}.

O objetivo deste trabalho foi verificar a presença de bombas de efluxo em isolados clínicos e de efluente hospitalar de *Acinetobacter* spp., através de testes fenotípicos, utilização o inibidor de bomba de prótons CCCP e a detecção do gene *adeA*.

1.3. MÉTODOS

1.3.1. Isolados de *Acinetobacter* spp. analisados

Neste estudo foram utilizados isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. coletados em quatro hospitais de Porto Alegre, RS, Brasil e isolados de amostras de efluente de três hospitais.

Foram realizadas duas coletas do efluente em cada hospital, nos períodos de julho de 2006 a setembro de 2007. Os isolados clínicos foram obtidos junto aos laboratórios de análises clínicas de cada hospital, no mesmo período em que foram

realizadas as coletas de efluente hospitalar. As cepas foram isoladas e identificadas em um estudo anterior¹⁴.

Após isolamento e identificação, os isolados foram estocados em caldo BHI com 15% de glicerol e mantidos em freezer a -20°C.

1.3.2. Seleção das cepas analisadas

Foram selecionados 107 isolados de *Acinetobacter* spp., 31 de efluente hospitalar e 76 de origem clínica, uma vez que estes isolados foram multirresistentes (resistentes a no mínimo duas classes, para os isolados de efluente e a no mínimo quatro classes para os clínicos) quando testados, em um estudo anterior¹⁴, quanto ao perfil de resistência aos antimicrobianos amicacina, aztreonam, ceftazidima, cefepime, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, meropenem, piperacilina-tazobactam, polimixina B e ticarcilina-clavulanato, através da técnica de disco difusão em Ágar Muller Hinton.

1.3.3. Concentração Inibitória Mínima

Para a realização dos testes de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram utilizados os antimicrobianos ceftazidima (CAZ), amicacina (AMI), imipenem (IMP), e os desinfetantes digluconato de clorexidina e quaternário de amônio. Os isolados foram semeados em caldo BHI e 230µL desta cultura foram diluídas em caldo Muller Hinton até 10^5 UFC mL⁻¹ em placas de microtitulação. Os antimicrobianos foram testados nas concentrações de 512 µg/mL a 1 µg/mL, o quaternário de amônio nas concentrações de 0,0625% a 0,0001% e o digluconato de clorexidina, de 0,2% a 0,0003%, em um volume final de 300µL por poço. A CIM foi estabelecida como a menor concentração do antimicrobiano que inibia o crescimento bacteriano¹³. Os isolados foram considerados resistentes a amicacina quando suas

concentrações inibitórias mínimas foram maior que 64 µg/mL, para ceftazidima 32 µg/mL, para o imipenem 16 µg/mL, para o quaternário de amônio 0,001% e para o digluconato de clorexidina 0,006%^{15,16}.

1.3.4. Detecção Fenotípica do Sistema de Efluxo Dependente da Força Próton Motiva nos isolados

Para detecção do sistema de efluxo, foi utilizado um desacoplador da força próton motiva, carboxilciadina m-clorofenilhidrazona (CCCP), que diminui a energia disponível ao transporte. Fez-se uma curva com diferentes concentrações do CCCP, e a concentração escolhida para o uso foi 30mM, a maior que não inibia o crescimento microbiano. O teste foi realizado em caldo Muller Hinton no volume final de 300 µL, com 10⁵ UFC mL⁻¹ da cultura bacteriana, 30 mM de CCCP e antimicrobiano na concentração determinada, em cada canaleta. A redução da CIM de no mínimo duas vezes, em presença do desacoplador, indica resultado positivo para bombas de efluxo^{1,12,13}. Para os desinfetantes, esta metodologia somente foi realizada com aqueles isolados que foram resistentes ao quaternário de amônio e à digluconato de clorexidina, através da técnica de concentração inibitória mínima.

1.3.5. Extração do DNA e detecção do gene *adeA*

Todos os 107 isolados de *Acinetobacter* spp. utilizados no presente estudo tiveram seus DNAs extraídos através do método de fervura, segundo Misbah *et al* (2005) com algumas alterações¹⁷. Os isolados foram cultivados em placa contendo TSA a 37°C por 24h. Após a incubação, foram selecionadas de duas a três colônias que foram semeadas em endorfes de 0,5mL contendo 100µL de tampão TE (8.2.1) e fervidas por dez minutos. Após a fervura foi adicionado igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico (8.2.2) na proporção de 24:1, as amostras foram centrifugadas a 12000 g

(Mini centrífuga Eppendorf modelo Spin) por dez minutos, resultando num sobrenadante contendo DNA bacteriano, o qual foi submetido à técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do gene *adeA*.

Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores *adeA*-F 5'- ATC TTC CTG CAC GTG TAC AT -3' e *adeA*-R 5'- GGC GTT CAT ACT CAC TAA CC -3'. O tamanho esperado para o fragmento era de 513 pb¹². As reações foram realizadas em misturas contendo 200µM de dNTP's, 1 µM de cada primer, 2,5mM de MgCl₂, 1 unidade de Taq polimerase, 1x de tampão de reação de Taq polimerase e 100ng de DNA bacteriano em um volume final de 15 µL. Foi utilizado um aparelho termociclador Mastercycler personal (Eppendorf) com as seguintes condições de amplificação: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por cinco minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por um minuto, temperatura de anelamento de 53°C, extensão a 72°C por um minuto e uma extensão final a 72°C por sete minutos. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, submetidos a corrida eletroforética a 70mV com tampão TAE 1X por aproximadamente uma hora. Os géis foram fotografados pelo equipamento KODAK 1D.

1.3.6. Análise estatística

Os dados obtidos para os teste de detecção de bomba de efluxo e presença do gene *adeA*, foram analisados no programa Bioestat (2007), através do teste de McNemar, para analisar a concordância entre os dois testes. Os resultados foram considerados significantes quanto $p < 0,01$.

1.4. RESULTADOS

O teste de concentração inibitória mínima para amicacina foi realizado com os 107 isolados, pois todos apresentaram resistência frente ao antimicrobiano, na técnica de disco difusão. Dos 76 isolados clínicos testados para amicacina, 21 isolados (28%) obtiveram diminuição da concentração inibitória mínima quando foi adicionado o CCCP, inibidor da bomba de próton. Em contrapartida, dos 31 isolados de efluente, apenas 16% tiveram sua CIM diminuída na presença do CCCP, o que corresponde a cinco isolados.

Para a realização do teste de concentração inibitória mínima utilizando a ceftazidima, foram utilizados 34 isolados clínicos e 31 de efluente hospitalar, os quais eram resistentes ao antimicrobiano pela técnica de disco difusão em ágar e sabidamente não possuíam o gene *bla_{OXA-23}*, o qual foi detectado em um estudo anterior¹⁴, pois estudos afirmam que na presença de enzimas com a capacidade de hidrolisar β -lactâmicos, o sistema de efluxo torna-se um mecanismo secundário para a resistência antimicrobiana¹⁸. Foi verificado que 50% dos isolados clínicos (17 isolados) apresentaram diminuição de sua concentração inibitória mínima, na presença do CCCP, já na análise feita com os 31 isolados de efluente hospitalar, esta diminuição pôde ser observada em 18 isolados, o que corresponde a 58% do total.

Para o imipenem, o teste foi realizado com os mesmos 34 isolados clínicos utilizados para ceftazidima (que também eram resistentes ao imipenem, segundo a técnica de disco difusão), considerando-se a mesma justificativa citada anteriormente. Em contrapartida, somente três isolados de efluente, os únicos resistentes, foram analisados. Verificou-se que 76% dos isolados clínicos analisados apresentaram diminuição de sua CIM na presença do inibidor da bomba de prótons. Todavia, entre os

três isolados de efluente testados, somente um apresentou diminuição de sua concentração inibitória mínima.

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados da diminuição da concentração inibitória mínima, na presença do inibidor CCCP, dos três antimicrobianos amicacina, ceftazidima e imipenem para 37 isolados, pois somente estes foram testados para os três antimicrobianos e entraram na análise estatística.

Os testes de concentração inibitória mínima para os desinfetantes quaternário de amônio e digluconato de clorexidina foram realizados somente com os isolados que tiveram a CIM do imipenem, ceftazidima e/ou amicacina diminuída na presença do inibidor CCCP, totalizando 56 isolados (15 de efluente e 41 clínicos).

Os isolados foram considerados resistentes ao quaternário de amônio quando suas concentrações inibitórias mínimas foram superiores a 0,001%¹⁵. Dos 15 isolados de efluente testados, 11 apresentaram resistência ao desinfetante (73,3%), e dos 41 isolados clínicos testados, 29 foram resistentes, o que corresponde a 70,7% (Tabela 2). Somando-se todos os isolados de *Acinetobacter* spp. testados para o quaternário de amônio, o percentual de resistência foi igual a 71%. Com os isolados resistentes (n=40), foi realizado o teste de concentração inibitória mínima na presença do inibidor de bomba de próton CCCP. Frente a este inibidor, 82% dos isolados de efluente e 59% dos isolados clínicos apresentaram diminuição de pelo menos duas vezes nas suas CIM.

Através do teste de CIM para o digluconato de clorexidina, pôde-se observar que a maioria dos isolados mostrou-se sensível ao desinfetante, sendo que apenas três isolados clínicos foram resistentes. Os isolados que apresentaram a CIM superior a 0,006% foram considerados resistentes¹⁵. É importante ressaltar que dois destes três isolados também foram resistentes ao quaternário de amônio. Com os três isolados

resistentes foi realizado o teste de CIM na presença do CCCP, e observou-se que suas concentrações inibitórias mínimas diminuíram mais de mil vezes na presença do inibidor (Tabela 2).

Após a realização dos testes fenotípicos para a detecção de bombas de efluxo, utilizando o inibidor de bomba próton CCCP, foi realizada a detecção do gene *adeA*. A princípio, o PCR foi realizado somente para os 56 isolados (15 de efluente e 41 clínicos) considerados “possíveis candidatos” quanto à presença do gene, uma vez que tiveram a concentração inibitória mínima de um ou mais antimicrobianos (amicacina, ceftazidima, imipenem, digluconato de clorexidina e quaternário de amônio) diminuída na presença do CCCP. Foi verificada a presença do gene *adeA* em 36 dos 56 isolados, destes, 10 eram de efluente e 26 eram isolados clínicos. Posteriormente, a técnica de PCR foi realizada com o restante dos isolados, aqueles que não obtiveram diminuição da CIM na presença do inibidor (n=51), totalizando 35 isolados clínicos e 16 de efluente. A presença do gene foi detectada em 34 dos 51 isolados, onde 23 são clínicos e 11 de efluente.

Considerando todos os 107 isolados de *Acinetobacter* spp. testados no presente trabalho, verificou-se a presença do gene *adeA* em 70 isolados (49 clínicos e 21 de efluente), o que corresponde a 65%.

Foi realizado o teste estatístico de McNemar para comprovar a concordância entre as duas metodologias utilizadas no trabalho, a fenotípica e a molecular, na detecção de bombas de efluxo em *Acinetobacter* spp. Apenas 37 isolados que foram testados em todos os testes e com todos os antimicrobianos entraram na análise. A partir de uma tabela de contingência, pôde-se verificar que o resultado positivo no teste

fenotípico está significativamente relacionado com presença do gene *adeA*, o qual codifica a proteína transmembrana, do sistema de efluxo AdeABC ($p < 0,01$).

1.5. DISCUSSÃO

Acinetobacter spp. são micro-organismos responsáveis por numerosas Infecções Associadas à Assistência à Saúde ocorridas em diversas partes do mundo. Acredita-se que a extrusão ativa de compostos, por meio de bombas de efluxo seja um dos fatores responsáveis pela multirresistência desses micro-organismos¹⁹.

Estudos demonstram que a inibição farmacológica dessas bombas de efluxo pode ser uma importante estratégia para reverter a resistência a determinadas drogas em espécies de *Acinetobacter*, e com isso, melhorar as opções de terapia. Até hoje, poucos inibidores de bombas foram descritos, dentre eles, o fenil-arginina- β -naftilamina (PA β N), o 1-(1-naftilmetil)-piperazina (NMP) e o carboxilciadina m-clorofenilhidrazona (CCCP)^{1,4}.

Os aminoglicosídeos estavam entre as poucas classes de antimicrobianos que não haviam demonstrado resistência pela extrusão ativa de compostos através de bombas de efluxo, porém este quadro modificou-se quando foi descoberto o sistema AmrAB-OprA em *Burkholderia pseudomallei*. Mais tarde, outros sistemas de extrusão de aminoglicosídeos foram descobertos, como o MexXY-OprM em *Pseudomonas aeruginosa*, o AcrD em *Escherichia coli* e o AdeABC em *A. baumannii*^{4,19}.

Com a análise dos resultados deste estudo, pode-se perceber que há indicação de bomba de extrusão de aminoglicosídeos para os isolados de *Acinetobacter* spp. testados, pois verificou-se que 29% dos isolados clínicos e 16% dos isolados de efluente apresentaram diminuição de sua concentração inibitória mínima, quando submetidos ao

teste com amicacina, na presença do inibidor CCCP. A baixa porcentagem de isolados positivos para bomba de efluxo no teste realizado com amicacina provavelmente se deve ao fato de 88,8% dos isolados terem apresentado perfil de sensibilidade a este antimicrobiano na determinação da Concentração Inibitória Mínima, o que contraria os resultados segundo a técnica de disco difusão, uma vez que, considerando esta técnica, todos os isolados apresentaram resistência. A diferença dos resultados pode estar associada a erros de leitura do halo de inibição, na técnica de disco difusão. Porém, ao realizar o teste molecular, verificou-se que 80% dos isolados clínicos, e 40% dos isolados de efluente, daqueles em que a CIM diminuiu com o inibidor, apresentaram o gene *adeA*. Entretanto, Pannek S *et al* (2006)⁴ observam que houve diminuição da concentração inibitória mínima de aminoglicosídeos, com a adição de um outro inibidor, o NMP, somente em isolados mutantes, onde o gene *adeB* estava superexpresso. Um outro estudo, utilizando a cepa de *A. baumannii* BM4454, demonstrou que os aminoglicosídeos canamicina e amicacina são transportados pelo sistema AdeABC com menos eficácia do que outros compostos. Isto pode estar associado à alta hidrofobicidade destes dois antimicrobianos, por possuírem um grande número de hidroxilas, e assim serem transportados com maior dificuldade⁷.

Muitos agentes antimicrobianos têm se mostrado substrato para o sistema de efluxo AdeABC em *Acinetobacter* spp, no entanto, o efeito desse sistema sobre os antimicrobianos β -lactâmicos não é muito claro, visto que ceftazidima e amoxicilina não parecem ser afetadas por esta bomba¹⁸. Em contrapartida, de acordo com a análise dos dados deste trabalho, mais da metade dos isolados apresentaram diminuição da concentração inibitória mínima quando submetidos ao teste na presença do CCCP frente ao antibiótico ceftazidima, e destes isolados, 70% apresentaram o gene *adeA*. Com os

dados obtidos neste trabalho, pode-se inferir que há indicativo de bomba de efluxo conferindo resistência ao imipenem, pois verificou-se que 67% dos isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. apresentaram diminuição de pelo menos quatro vezes na sua concentração inibitória mínima na presença do CCCP, quando testados para o imipenem. Com a realização do teste molecular, o gene mostrou-se presente em 47% daqueles isolados cuja CIM diminuiu na presença do inibidor. Este resultado encontrado pode estar associado ao alto uso deste antimicrobiano na prática clínica para o tratamento de infecções causadas por *Acinetobacter* spp. Em um experimento realizado por Hu WS *et al* (2007)²⁰, cepas mutantes de *A. baumannii* tiveram sua resistência a imipenem diminuída de quatro a oito vezes, e meropenem diminuída pela metade quando adicionado o CCCP no teste de concentração inibitória mínima.

Enquanto numerosos estudos focam no surgimento de cepas multirresistentes aos antimicrobianos, poucos examinam a possibilidade da emergência de cepas resistentes a antissépticos e desinfetantes como as responsáveis por surtos de infecções hospitalares, uma vez que estas cepas podem se manter no ambiente hospitalar e nos equipamentos médicos e se disseminar, aumentando as ocorrências de surtos nas Unidades de Tratamento Intensivo²¹.

Os mecanismos moleculares de *A. baumannii* que determinam a sensibilidade diminuída a desinfetantes ainda permanecem desconhecidos. O estudo de Rajamohan G. *et al* (2010)²² demonstrou o papel da extrusão ativa e o envolvimento do sistema de efluxo AdeABC na diminuição da suscetibilidade a biocidas em *A. baumannii*. Para isto, foi testado o efeito do CCCP em isolados clínicos, verificando que a adição do composto diminuiu a concentração inibitória mínima de vários biocidas, incluindo compostos quaternário de amônio e digluconato de clorexidina, de duas a doze vezes.

Os três isolados resistentes a digluconato de clorexidina encontrados neste estudo apresentaram diminuição de mais de mil vezes na sua concentração inibitória mínima, na presença do inibidor CCCP. A presença do gene *adeA* foi verificada nestes três isolados, o que confirma a hipótese de que a clorexidina é um substrato para a bomba de efluxo. Neste trabalho também verificou-se que 46% dos isolados resistentes a quaternário de amônio apresentaram diminuição de sua CIM na presença do CCCP, e que 69% destes apresentavam o gene *adeA*. Estudos em bactérias Gram negativas mostram que as bombas de efluxo possuem um papel importante na resistência intrínseca a desinfetantes, incluindo compostos quaternários de amônio²².

O gene *adeA* foi o escolhido para este estudo porque segundo Ruzin A. *et al* (2010)²³, os três genes *adeA*, *adeB* e *adeC* são cotranscritos e a expressão do gene *adeA* reflete a expressão de todo o sistema de efluxo AdeABC. No presente trabalho, o gene *adeA* foi testado para os 107 isolados de *Acinetobacter* spp. e 65% dos isolados foram positivos para sua presença. Através dos testes fenotípicos pode-se inferir que este gene está sendo expresso e se relaciona com a resistência de *Acinetobacter* spp. frente aos antimicrobianos amicacina, ceftazidima, imipenem, quaternário de amônio e digluconato de clorexidina.

De acordo com os estudos de Wong EW *et al* (2009)²⁴ a ruptura dos genes *ade* resultam em redução da CIM de ceftazidima, cefotaxima, gentamicina, amicacina, ciprofloxacina, amoxicilina e meropenem, para isolados de *Acinetobacter* spp, exceto quando se trata do gene *adeC*, o qual não está relacionado com a resistência a esses antimicrobianos. No presente trabalho foi visto que, ao inibir a bomba de efluxo, utilizando o CCCP, a CIM dos antimicrobianos ceftazidima, amicacina e imipenem, além dos desinfetantes digluconato de clorexidina e quaternário de amônio, foi

diminuída. Pela análise de McNemar, verificou-se que estes testes fenotípicos estão estatisticamente relacionados ($p < 0,01$) à presença do gene *adeA* nos isolados testados.

Magnet S *et al* (2001)⁷ analisaram a ruptura do gene *adeB*, o qual codifica a proteína transportadora, em *A. baumannii* BM4454, e foi verificado que essa proteína é a que confere resistência aos aminoglicosídeos, contribuindo também para o fenótipo de multirresistência aos antibióticos nessas cepas. Entretanto, os resultados de Bratu S. *et al* (2008)¹⁶ sugerem que a expressão do gene *adeB* não é um contribuinte importante para a resistência aos aminoglicosídeos em isolados endêmicos de *Acinetobacter*, em Nova Iorque, EUA. Também foi visto que a expressão do gene não está relacionada com a resistência a carbapenênicos e aztreonam, em contrapartida, pode-se associar esta expressão à suscetibilidade a tigeciclina.

1.6 CONCLUSÕES

Analisando os dados obtidos, pode-se concluir que os isolados de *Acinetobacter* spp. utilizados no presente estudo possuem bombas de efluxo como um dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos amicacina, ceftazidima imipenem, digluconato de clorexidina e quaternário de amônio, pois o gene *adeA*, que codifica a proteína transmembrana do sistema de efluxo AdeABC, foi detectado por testes moleculares em 65% dos isolados de *Acinetobacter* spp. Dessa forma, conclui-se também que o gene *adeA* está sendo expresso, já que no teste fenotípico a inibição da bomba de efluxo pelo CCCP diminuiu a concentração inibitória mínima dos antimicrobianos testados. A presença de bomba de efluxo foi observada tanto em isolados clínicos como de efluente, o que significa que isolados multirresistentes portadores deste mecanismo de resistência

estão sendo liberados no meio ambiente e podem estar contribuindo para a disseminação da resistência neste ambiente.

1.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Opazo AC, Mella SM, Domínguez MY, Bello HT, González GR. Bombas de expulsión multidrogas en *Acinetobacter baumannii* y resistencia a antimicrobianos. Rev Chil Infect. 2009; 26 (6): 499-503.
2. Montefour K *et al.* *Acinetobacter baumannii*: An Emerging Multidrug-Resistant Pathogen in critical care. Critical care nurse. 2008; 28: 15-25.
3. Abbo A, Navon-Venezia S, Hammer-Muntz O, Krichali T, Siegman-Igra Y, Carmeli Y. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Emerging infectious diseases. 2005; 11: 22-29.
4. Pannek S *et al.* Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-b-naphthylamide. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2006; 57: 970-974.
5. Kawamura-Sato K, Wachino J, Kondo T, Ito H, Arakawa Y. Correlation between reduced susceptibility to disinfectants and multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* species. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2010; 65: 1975-1983.
6. Baquero F, Martínez JL, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. Curr. Opin. Biotechnol. 2008; 19: 260-265.
7. Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 3375-3380.
8. Peleg A, Seifert H, Paterson D. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev. 2008; 21 (3): 538-582.

9. Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*. 2004; 62 (2): 159-204.
10. Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007; 59: 1210-1215.
11. Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, Lambert T. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3298-3304.
12. Lin L, Ling BD, Li XZ. Distribution of the multidrug efflux pump genes, *adeABC*, *adeDE* and *adeIJK*, and class 1 integron genes in multiple-antimicrobial-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* complex. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33 (1): 27-32.
13. Moreira MAS, Oliveira JA, Teixeira LM, Moraes CA. Detection of chloramphenicol efflux system in *Escherichia coli* isolated from poultry carcasses. *Veterinary Microbiology*. 2005; 109: 75-81.
14. Ferreira AE. Caracterização molecular e detecção de genes de resistência em isolados de *Acinetobacter* spp. de amostras clínicas e de efluente hospitalar. Tese de doutorado apresentada no Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2010.
15. Vessoni Penna TC, Gava Mazzola P, Silva Martins AM. The efficacy of chemical agents in cleaning and disinfection programs. *BioMed Central Infectious Diseases*. 2001; 1:16.

16. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 15th Informational Supplement., Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
17. Misbah S, Hassan H, Yusof MY, Hanifah YA, AbuBakar S. Genomic species identification of *Acinetobacter* of clinical isolates by 16S rDNA sequencing. *Singapore Med J.* 2005; 46: 461-464.
18. Bratu S, Landman D, Martin DA, Georgescu C, Quale J. Correlation of antimicrobial resistance with β -lactamases, the OmpA-like porin, and efflux pumps in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* endemic to New York City. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008; 52: 2999-3005.
19. Rajamohan G, Srinivasan VB, Gebreyes WA. Molecular and functional characterization of a novel efflux pump, AmvA, mediating antimicrobial and disinfectant resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemother.* 2010; 65: 1919–1925.
20. Hu WS, Yao SM, Fung CP, Hsieh YP, Liu CP, Lin JF. An OXA-66/OXA-51-like carbapenemase and possibly an efflux pump are associated with resistance to imipenem in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 51:3844–3852.
21. Martró E *et al.* Assessment of *Acinetobacter baumannii* susceptibility to antiseptics and disinfectants. *Journal of Hospital Infection.* 2003; 55, 39-46.
22. Rajamohan G, Srinivasan VB, Gebreyes WA. Novel role of *Acinetobacter baumannii* RND efflux transporters in mediating decreased susceptibility to biocides. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65: 228-232.

23. Ruzin A, Immermann FW, Bradford PA. RT-PCR and Statistical Analyses of adeABC Expression in Clinical Isolates of Acinetobacter calcoaceticus–Acinetobacter baumannii Complex. *Microbial Drug Resistance*. 2010; 16(2): 87-89.
24. Wong EW, Yusof MY, Bt Mansor M, Anbazhagan D, Ong SY, Sekaran SD. Disruption of adeB gene has a greater effect on resistance to meropenems than adeA gene in Acinetobacter spp. isolated from University Malaya Medical Centre. *Singapore Med J*. 2009; 50(8): 822-826.

1.8. ANEXOS

1.8.1. Tabela 1: Diminuição da Concentração Inibitória Mínima de amicacina, ceftazidima e imipenem, na presença do inibidor de bomba CCCP.

Isolado	AMICACINA		CEFTAZIDIMA		IMIPENEM	
	CIM	CIM+CCCP	CIM	CIM+CCCP	CIM	CIM+CCCP
IC 6	64	32	64	64	16	<1
IC 23	<1	<1	128	32	64	<1
IC 103	<1	<1	8	2	256	2
IC 104	64	16	4	2	128	64
IC 117	32	32	8	<1	64	4
IC 122	<1	<1	8	8	256	128
IC 123	2	<1	256	256	64	<1
IC 133	16	8	64	64	2	2
IC 146	16	16	512	512	128	64
IC 186	<1	<1	4	<1	256	16
IC 190	<1	<1	128	8	256	8
IC 194	16	8	64	16	256	128
IC 199	4	4	128	128	256	64
IC 202	4	<1	512	<1	128	32
IC 205	<1	<1	64	<1	16	<1
IC 254	16	4	64	64	2	2
IC 255	128	128	64	64	2	2
IC 264	2	2	8	8	8	<1
IC 269	256	128	128	128	16	<1
IC 270	<1	<1	8	<1	64	32
IC 273	<1	<1	16	<1	64	64
IC 274	8	8	>512	>512	2	2

1.8.1. Continuação: Tabela 1: Diminuição da Concentração Inibitória Mínima de amicacina, ceftazidima e imipenem, na presença do inibidor de bomba CCCP.

Isolado	AMICACINA		CEFTAZIDIMA		IMIPENEM	
	CIM	CIM+CCCP	CIM	CIM+CCCP	CIM	CIM+CCCP
IC 279	16	16	16	<1	64	64
IC 280	64	32	128	128	16	2
IC 282	64	16	64	64	32	32
IC 283	8	4	>512	>512	32	32
IC 284	8	8	>512	>512	32	16
IC 298	<1	<1	>512	256	256	16
IC 304	<1	<1	256	256	32	<1
IC 306	<1	<1	32	<1	128	<1
IC 311	<1	<1	4	<1	32	<1
IC 312	<1	<1	32	<1	64	<1
IC 317	16	8	128	64	64	4
IC 322	16	16	64	64	256	16
A117h*	16	8	8	8	128	128
C22h*	<1	<1	8	<1	32	32
O17*	<1	<1	32	<1	16	8

Ponto de corte para resistência: Amicacina: $\geq 64 \mu\text{g/ml}$; Ceftazidima: $\geq 32 \mu\text{g/ml}$; Imipenem: $\geq 16 \mu\text{g/ml}$.

Legenda: CIM: Concentração Inibitória Mínima; CCCP: carboxilciadina m-clorofenilhidrazona; IC: isolado clínico; *isolados de efluente.

1.8.2. Tabela 2: Diminuição da Concentração Inibitória Mínima dos desinfetantes Quaternário de amônio e Digluconato de clorexidina, na presença do inibidor CCCP.

Isolados	QA		DC	
	CIM	CIM+CCCP	CIM	CIM+CCCP
IC 6	0,0078	0,0039	0,0016	NT
IC 23	0,0005	NT	<0,0003	NT
IC 28	0,0078	0,0019	0,0016	NT
IC 53	0,0078	0,0078	0,0016	NT
IC 70	0,0078	0,0039	<0,0003	NT
IC 103	0,0078	0,0039	0,0016	NT
IC 104	0,0078	0,0039	0,0008	NT
IC 117	0,0078	0,0009	<0,0003	NT
IC 122	0,0019	<0,0001	<0,0003	NT
IC 123	0,0156	<0,0001	<0,0003	NT
IC 133	0,0078	0,0078	<0,0003	NT
IC 146	0,0156	0,0156	<0,0003	NT
IC 147	0,0039	0,0039	<0,0003	NT
IC 186	0,0009	NT	>0,2	<0,0003
IC 188	0,0039	0,0009	0,0016	NT
IC 190	0,0078	0,0078	<0,0003	NT
IC 194	0,0078	0,0078	0,0008	NT
IC 199	0,0078	0,0078	<0,0003	NT
IC 202	0,0009	NT	<0,0003	NT
IC 204	<0,0001	NT	<0,0003	NT

1.8.2. Continuação tabela 2: Diminuição da concentração inibitória mínima dos desinfetantes Quaternário de amônio e Digluconato de clorexidina, na presença do inibidor CCCP.

Isolados	QA		DC	
	CIM	CIM+CCCP	CIM	CIM+CCCP
IC 205	0,0019	<0,0001	<0,0003	NT
IC 254	0,0078	0,0039	0,0016	NT
IC 261	<0,0001	NT	<0,0003	NT
IC 264	0,0078	0,0039	<0,0003	NT
IC 266	0,0039	0,0039	0,0008	NT
IC 269	0,0078	0,0039	0,0016	NT
IC 270	0,0005	NT	<0,0003	NT
IC 273	0,0039	<0,0001	>0,2	<0,0003
IC 279	0,0009	NT	<0,0003	NT
IC 280	0,0078	0,0039	0,0016	NT
IC 282	0,0009	NT	<0,0003	NT
IC 283	0,0156	0,0156	>0,2	<0,0003
IC 284	0,0009	NT	<0,0003	NT
IC 297	<0,0001	NT	<0,0003	NT
IC 298	0,0019	<0,0001	<0,0003	NT
IC 304	0,0039	0,0039	0,0031	NT
IC 306	0,0005	NT	<0,0003	NT
IC 311	0,0039	<0,0001	<0,0003	NT
IC 312	0,0009	NT	<0,0003	NT
IC 317	0,0039	0,0039	<0,0003	NT
IC 322	0,0156	0,0156	0,0016	NT
A16*	0,0039	<0,0001	<0,0003	NT

1.8.2. Continuação Tabela 2: Diminuição da Concentração Inibitória Mínima dos desinfetantes Quaternário de amônio e Digluconato de clorexidina, na presença do inibidor CCCP.

Isolados	QA		DC	
	CIM	CIM+CCCP	CIM	CIM+CCCP
A26*	0,0039	<0,0001	<0,0003	NT
A81*	0,0078	0,0078	0,0016	NT
A117h*	0,0078	0,0039	0,0016	NT
C22h*	0,0019	<0,0001	<0,0003	NT
G9*	0,0019	<0,0001	<0,0003	NT
G12*	0,0039	<0,0001	<0,0003	NT
G14*	0,0002	NT	<0,0003	NT
G35*	<0,0001	NT	<0,0003	NT
G47h*	0,0002	NT	<0,0003	NT
O3*	0,0078	0,0078	0,0016	NT
O6*	0,0019	<0,0001	<0,0003	NT
O17*	0,0019	<0,0001	<0,0003	NT
O18*	0,0019	<0,0001	<0,0003	NT
O33*	0,0009	NT	<0,0003	NT

Ponto de corte para resistência: QA: $\geq 0,001\%$; DC: $\geq 0,006\%$.

Legenda: QA: quaternário de amônio; DC: digluconato de clorexidina; CIM: concentração inibitória mínima; CCCP: carboxilciadina m-clorofenilhidrazona; IC: isolado clínico; *isolados de efluente; NT: isolados não testados (os isolados com a CIM na faixa da sensibilidade não foram testados frente ao inibidor).

1.8.3. Normas para publicação:

Formatação de Artigo Original

O manuscrito deve ser preparado usando *software* padrão de processamento de textos e deve ser impresso (fonte *times new Roman* tamanho 12) com espaço duplo em todo o texto, legendas para as figuras e referências, margens com pelos menos 3cm. O limite de palavras é de 6.000 com até 5 inserções (figuras e tabelas). O manuscrito deve ser dividido nas seguintes seções: Carta de envio, endereçada ao editor chefe, resumo estruturado, palavras-chaves, introdução, métodos, resultados, discussão, conclusões, agradecimentos e referências. Abreviações devem ser usadas com moderação.

Página de Título: deve incluir o nome dos autores na ordem direta e sem abreviações, graduações mais elevadas possuídas, afiliações em instituições com endereço acadêmico do autor correspondente e todos os co-autores e apoio financeiro.

Título: deve ser conciso, claro e o mais informativo possível, não deve conter abreviações e não deve exceder a 200 caracteres, incluindo espaços.

Título Corrente: com no máximo 70 caracteres.

Resumo Estruturado: deve condensar os resultados obtidos e as principais conclusões de tal forma que um leitor, não familiarizado com o assunto tratado no texto, consiga entender as implicações do artigo. O resumo não deve exceder 250 palavras (100 palavras no caso de comunicações breves) e abreviações devem ser evitadas. Deve ser subdividido em: Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões.

Palavras-chaves: três a seis itens devem ser listados imediatamente abaixo do resumo estruturado.

Introdução: deve ser curta e destacar os propósitos para o qual o estudo foi realizado. Apenas quando necessário citar estudos anteriores de relevância.

Métodos: devem ser suficientemente detalhados para que os leitores e revisores possam compreender precisamente o que foi feito e permitir que seja repetido por outros. Técnicas-padrões precisam apenas ser citadas.

Ética: em caso de experimentos em seres humanos, indicar se os procedimentos realizados estão em acordo com os padrões éticos do comitê de experimentação humana responsável (institucional, regional ou nacional) e com a Declaração de Helsinki de 1964, revisada em 1975, 1983, 1989, 1996 e 2000. Quando do relato de experimentos em animais, indicar se seguiu um guia do conselho nacional de pesquisa, ou qualquer lei sobre o cuidado e uso de animais em laboratório foram seguidas.

Resultados: devem ser um relato conciso e impessoal da nova informação. Evitar repetir no texto os dados apresentados em tabelas e ilustrações.

Discussão: deve relacionar-se diretamente com o estudo que está sendo relatado. Não incluir uma revisão geral sobre o assunto, evitando que se torne excessivamente longa.

Agradecimentos: devem ser curtos, concisos e restritos aqueles realmente necessários, e, no caso de órgãos de fomento não usar siglas.

Conflito de Interesse: todos os autores devem revelar qualquer tipo de conflito de interesse existente durante o desenvolvimento do estudo.

Referências: devem ser numeradas consecutivamente, na medida em que aparecem no texto. Listar todos os autores quando houver até seis. Para sete ou mais, listar os seis primeiros, seguido por "et al". Digitar a lista de referências com espaçamento duplo em folha separada. Referências de comunicações pessoais, dados não publicados ou manuscritos "em preparação" ou "submetidos para publicação" não devem constar da lista de referência. Se essenciais, podem ser incorporados em local apropriado no texto, entre parênteses da seguinte forma: (AB Figueiredo: Comunicação Pessoal, 1980); (CD

Dias, EF Oliveira: dados não publicados). Citações no texto devem ser feitas pelo respectivo número das referências, acima da palavra correspondente, separado por vírgula (Ex.: Mundo.1,2,3; Vida.30,42,44-50). As referências no fim do manuscrito devem estar de acordo com o sistema de requisitos uniformes utilizado para manuscritos enviados para periódicos biomédicos (Consulte: <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>). Os títulos dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no "Index Medicus" (Consulte: <http://ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals&TabCmd=limits>).

Alguns exemplos de referências:

1. Russell FD, Coppel AL, Davenport AP. *In vitro* enzymatic processing of radiolabelled big ET-1 in human kidney as a food ingredient. *Biochem Pharmacol* 1998;55:697-701.
2. Porter RJ, Meldrum BS. Antiepileptic drugs. *In: Katzung BG, editor. Basic and clinical pharmacology*. 6th ed. Norwalk (CN): Appleton and Lange; 1995. p. 361-80.
3. Blenkinsopp A, Paxton P. Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

Figuras: devem preferencialmente ser submetidas em alta resolução no formato **TIFF**. As figuras devem ser colocadas em arquivos separados, nomeados apenas com o número das figuras (ex.: Figura 1; Figura 2). Certifique-se que as mesmas têm uma resolução mínima de 300dpi.

Fotografias: devem ser enviadas com boa resolução (mínimo de 300dpi) no formato **TIFF**, preferencialmente, preparadas utilizando o *Adobe Photoshop*.

Gráficos: criados usando *Microsoft Word* ou *Excel*, devem ser salvos com a extensão original (**.doc** ou **.xls**). **Eles não devem ser copiados ou colados** de um programa para o outro.

Mapas e Ilustrações: devem ser vetorizadas (desenhados) profissionalmente utilizando os *softwares CorelDraw* ou *Illustrator* em alta resolução, e suas dimensões não devem ter mais que 21,5 x 28,0cm.

Imagens: produzidas em *software* estatístico devem ser convertidas para o formato *Excel* ou *PowerPoint*. Caso não seja possível, converter o arquivo para o formato **TIFF** com resolução de 300dpi, e enviar juntamente com o arquivo no formato original.

Legendas: nas figuras, as legendas devem ser digitadas juntas com espaçamento duplo em uma folha separada.

Ilustrações Coloridas: devem ser aprovadas pelos editores e as despesas extras para confecção de fotolitos coloridos serão de responsabilidade dos autores.

Tabelas: devem ser digitadas com espaçamento duplo, com um título curto e descritivo e submetido *online* em um arquivo separado. Legendas para cada tabela devem aparecer no rodapé da mesma página que a tabela. Todas as tabelas devem ter numeração arábica, citadas no texto, consecutivamente. Tabelas não devem ter linhas verticais, e linhas horizontais devem ser limitadas ao mínimo, com notas de rodapé logo abaixo. Tabelas devem ter no máximo 17cm de largura.

