RPDI
Maio > Agosto 2010 / Vol. 6 > N.º 2

ARTIGO DE REVISÃO / *REVIEW ARTICLE*

Bombas de efluxo em *Pseudomonas aeruginosa*

Importância clínica na terapêutica

Pseudomonas aeruginosa efflux pumps

Clinical relevance on therapy

/ C. Caneiras[1] / C. Marcos[1] / T. Ferreira[2] / T. Hanscheid[3] / J. Melo-Cristino[3] / A. Duarte[1]

[1] iMed, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa
[2] Laboratório de Microbiologia, Hospital S^to António dos Capuchos, Lisboa
[3] Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa

Correspondência:

Aida Duarte
Laboratório de Microbiologia
Faculdade de Farmácia. Av. Forças Armadas
1649-019 Lisboa

Telefone: +351 21 7946440
Fax: +351 21 7934212

/ Resumo

As infecções severas causadas por *Pseudomonas aeruginosa* têm assumido na última década um papel de destaque, dado tratar-se de um microrganismo de difícil erradicação e com elevada resistência intrínseca e adquirida. Em *P. aeruginosa* foram caracterizados sete sistemas de bombas de efluxo, os quais contribuem para o desenvolvimento de fenótipos de multirresistência às classes de antibióticos clinicamente mais relevantes. Dado que a terapêutica seleccionada pode actuar como indutora e originar eventos mutacionais que promovem a hiperexpressão das bombas de efluxo, o tratamento destas infecções constitui um grande desafio terapêutico e impõe um conhecimento actualizado desta temática. Esta revisão foi assim desenvolvida com o intuito de rever a contribuição da hiperexpressão dos sistemas de bombas de efluxo em *P. aeruginosa*, na multirresistência aos antibióticos. Pretendeu-se também avaliar a possibilidade da utilização destes sistemas como alvos terapêuticos de modo a restabelecer a susceptibilidade aos antibióticos disponíveis.

Palavras-chave: Bombas de Efluxo, Multirresistência, *Pseudomonas aeruginosa*.

/ Abstract

The severe infections caused by Pseudomonas aeruginosa have taken over the last decade an important role because it is a micro-organism difficult to eradicate and presents high intrinsic and acquired resistance. In P. aeruginosa were characterized seven systems of efflux pumps, which have a significant role in the development of multidrug resistance phenotypes to clinically more relevant classes of antibiotics. Since the selected therapy may act to induce and lead to mutational events that promote the overexpression of efflux pumps, the treatment of these infections is a major therapeutic challenge and requires an updated knowledge of this subject. This review was developed with the aim of reviewing the contribution of overexpression systems for efflux pumps in P. aeruginosa, in multidrug resistance to antibiotics. Intention was also to evaluate the possibility of using these systems as therapeutic targets in order to restore the susceptibility to antibiotics available.

Key-words: *Efflux pumps, Multidrug resistance, Pseudomonas aeruginosa.*



/ Introdução

A espécie *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria de Gram negativo frequentemente isolada em infecções associadas aos cuidados de saúde, nomeadamente em pneumonias, infecções do tracto urinário e bacteriémias, associada a elevados valores de mortalidade e morbilidade (27-48%)[1]. Particularmente frequente em unidades de cuidados intensivos[2], é uma bactéria de difícil erradicação, cujas infecções estão associadas a um elevado nível de resistência intrínseca e adquirida[3].

Em Portugal são escassos os dados bibliográficos de âmbito epidemiológico, clínico e microbiológico. Em 1999, Hanberger *et al.* compararam isolados de unidades de cuidados intensivos de cinco países da União Europeia, e verificaram que Portugal era o país em que este patógeneo era mais frequentemente isolado e apresentava maior percentagem de resistência aos antimicrobianos[4]. Em 2007, Cardoso *et al.*, num estudo que compreendeu 1009 isolados de *P. aeruginosa* de diferentes serviços hospitalares e da comunidade, descrevem uma multirresistência em 9,1% dos isolados, em que 20% destes apresentavam resistência a todos os antibióticos estudados (piperacilina/tazobactam, ceftazidima, imipenemo, meropenemo, ciprofloxacina, amicacina e gentamicina)[5].

Estudos recentes sugerem que a hiperexpressão de sistemas de bombas de efluxo se encontra maioritariamente envolvida nos fenómenos de multirresistência, dada a sua habilidade de expulsão dos antimicrobianos da célula bacteriana[1]. Podem actuar isoladamente ou em sinergia com outros mecanismos: diminuição da permeabilidade da membrana externa[6], produção de enzimas hidrolíticas ou modificação de alvos terapêuticos[7].

/ Bombas de efluxo em *P. aeruginosa*

As infecções por *P. aeruginosa* são normalmente tratadas com ceftazidima, ciprofloxacina, imipenemo, gentamicina, tobramicina, ticarcilina-clavulanato, ou piperacilina-tazobactam em combinação ou isoladamente. Alguns destes antibióticos são substratos para as bombas de efluxo. Em *P. aeruginosa* foram caracterizados sete sistemas de bombas de efluxo[8], os quais têm contribuído para o desenvolvimento de fenótipos de multirresistência às classes de antibióticos clinicamente mais relevantes: fluoroquinolonas, *β*-lactâmicos e aminoglicosídeos[1].

A sequenciação do genoma da *P. aeruginosa* demonstrou a existência de genes que codificam para doze presumíveis transportadores RND (resistance-nodulation-division)[9]. No entanto, até ao momento, foram apenas caracterizados sete sistemas de bombas de efluxo: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY, MexGHI-OpmD, MexJK e MexVW[10]. Estes apresentam uma organização estrutural tripartida que permite a expulsão rápida e directa de substractos para o ambiente extracelular[1], acção que pode desencadear a diminuição da susceptibilidade aos antibióticos pela hiperexpressão destes sistemas[1, 9, 11].

A regulação das bombas de efluxo do tipo Mex em *P.aeruginosa* é complexa e estabelecida por uma cascata hierárquica de regulação[8]. Adewoye *et al.* sugerem que mutações pontuais no gene *mexR*, gene regulador do operão de efluxo do sistema MexAB-OprM, poderão originar a rotura do sistema das bombas de efluxo e consequentemente um aumento da susceptibilidade aos antibióticos[12]. Estes estudos encontram-se em concordância com outros[13], embora a evidência da hiperexpressão destes sistemas proteicos na resistência a *P. aeruginosa* tenha essencialmente sido obtida por mutantes laboratoriais. Lomovskaya *et al.* descrevem que mutações nas bombas de efluxo Mex-AB-OprM, MexCD-OprJ e MexEF-OprN promovem uma redução da concentração mínima inibitória (CMI) aos antibióticos da classe das fluoroquinolonas (CMI=0,25 µg/mL para <0,02µg/mL). Simultaneamente, verificaram uma diminuição da taxa de mutação de $2x10^{-7}$ para $<10^{-11}$ nas enzimas DNA girase e topoisomerase IV[14], também responsáveis pela diminuição da susceptibilidade às fluoroquinolonas. Os antimicrobianos podem actuar como indutores e originar eventos mutacionais que promovem a hiperexpressão das bombas de efluxo, hipótese defendida por vários autores em que a exposição a concentrações subterapêuticas de antibióticos apresenta como consequência a selecção de estirpes mutantes[8, 15]. Estes resultados realçam a importância de monitorização farmacocinética da terapêutica, embora estudos adicionais devam ocorrer em contexto clínico e com maior número de isolados.

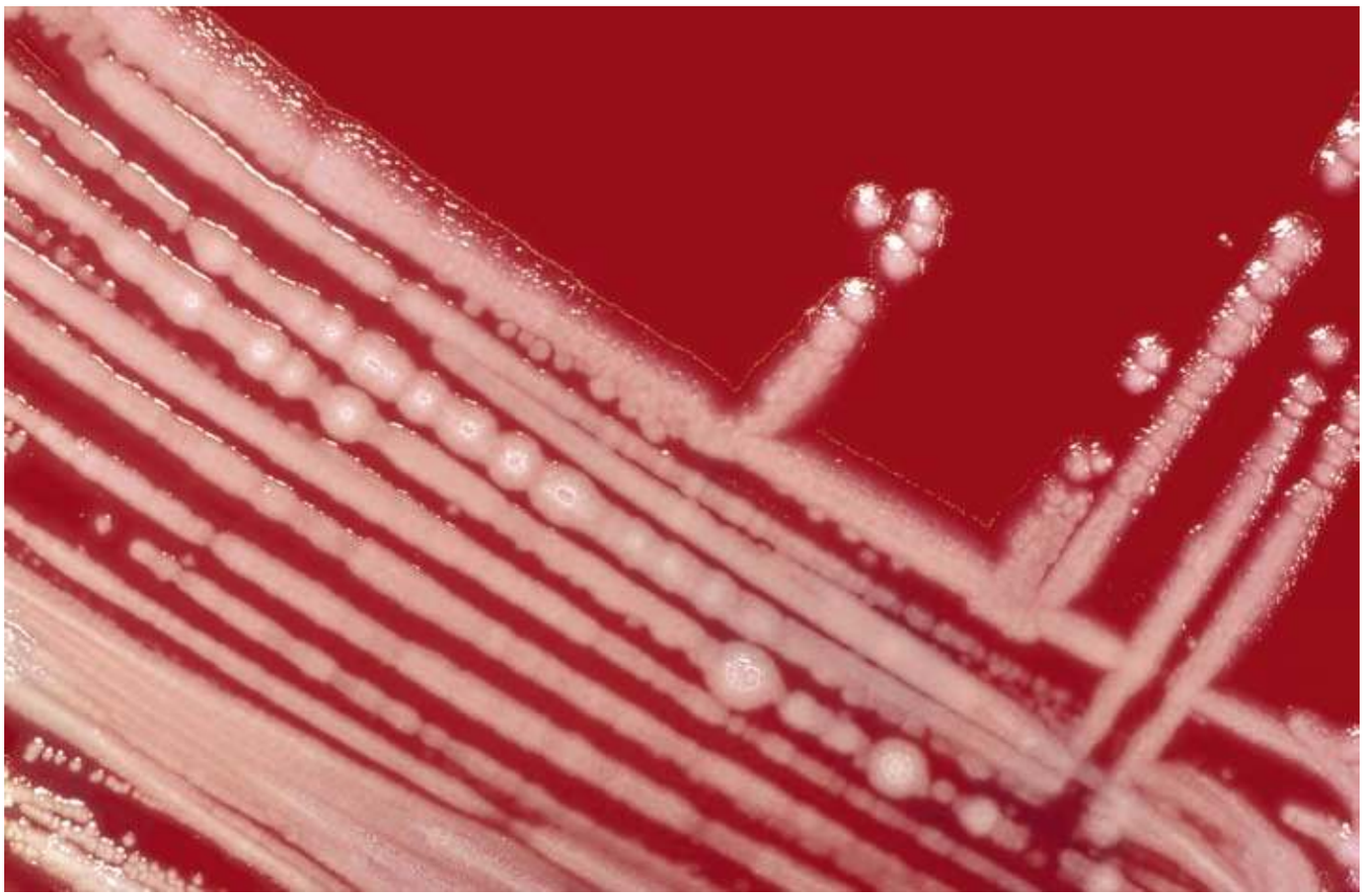
/ Fenótipo de multirresistência

A bomba de efluxo MexAB-OprM confere resistência basal a ß-lactâmicos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, macrólidos, cloranfenicol, trimetoprim e sulfametoxazole[13]. Também a indução do sistema MexXY por aminoglicosídeos, tetraciclinas e macrólidos, aumenta a expressão da porina OprM[16], promovendo a resistência a estes agentes antimicrobianos[10]. Assim, diferentes transportadores reconhecem diferentes classes de antibióticos pelo que, quando expressos simultâneamente[17], podem originar resistência cruzada[1, 18]. Apesar da existência de especificidade no reconhecimento do substracto pela bomba de efluxo[18], algumas têm as fluoroquinolonas como substracto principal. Masuda *et al.* estudaram estirpes mutantes de *P.aeruginosa* PAO1 que apresentavam alteração dos sistemas MexAB-OprM, MexCD-OprJ e MexXY. A rotura da proteína OprM do sistema MexAB promoveu uma diminuição da concentração mínima inibitória da ciprofloxacina (CMI=0,008µg/mL) comparativamente à estirpe *wild type* PAO1 (CMI=0,12µg/mL). Por sua vez, a hiperexpressão do sistema MexAB-OprM aumentou a CMI da ciprofloxacina para 0,25 µg/mL, o que veio confirmar que o aumento da expressão deste sistema pode estar na origem de fenótipos de resistência[18]. Também Llanes *et al.*, descreveram que a existência de mutações em MexAB-OprM e MexXY (CMI=8-16µg/mL) torna os isolados clínicos mais resistentes à cefepime (cefalosporina de 4.ª geração) com valores de CMI entre 8 e 16µg/mL, enquanto nos mutantes que apenas hiperexpressam um dos sistemas a CMI decresceu para 4µg/mL[17]. Os resultados podem ser de difícil interpretação, uma vez que nem sempre os valores das CMIs são clinicamente significativos.

/ Prevalência em isolados clínicos

A emergência de hiperexpressão das bombas de efluxo em isolados clínicos com fenótipo de multirresistência tem sido documentada por vários autores[1, 13, 17]. Ziha-Zarifi *et al.* estudaram 11 isolados multirresistentes que emergiram durante a terapêutica, demonstrando a hiperexpressão do sistema MexAB-OprM através da análise da expressão da OprM e de mutações no gene *mexR*[19]. Oh *et al.* referem que 17 de 20 isolados hiperexpressam quatro sistemas[14], enquanto Wolter *et al.* descrevem que 6 de 7 isolados resistentes à gentamicina hiperexpressavam o sistema MexXY[20]. Apesar do limitado número de estudos *in vivo* e da reduzida amostra, estes dados sugerem que a resistência em isolados clínicos pode estar associada à hiperexpressão de uma ou mais bombas de efluxo.

Em Portugal, embora a presença de bombas de efluxo em isolados clínicos provenientes de hospitais portugueses não tenha sido documentada, a expressão de metalo-*ß*-lactamases não têm sido prevalente, nomeadamente VIM-2 [21] e IMP-5 [22] relativamente ao número total de estirpes multirresistentes identificadas em unidades hospitalares. Do estudo efectuado no Hospital de S.to António dos Capuchos, durante quatro anos, apenas 9% dos isolados de *Pseudomonas* spp. eram produtores da enzima metalo--*ß*-lactamase VIM-2, enquanto em 76% das estirpes com resistência às oximinocefalosporinas (cefalosporinas de 3.ª geração), imipenemo, meropenemo e ciprofloxacina, não foi identificada a presença de genes codificantes para *ß*-lactamases de espectro alargado (ESBLs) e/ou metalo- *ß*-lactamases. No entanto, nestas estirpes verificou-se um aumento da susceptibilidade à ciprofloxacina, na presença do composto naftilamida fenilalanina arginina (Pa*ß*N), o qual potencia a actividade das fluorquinolonas como inibidor de bombas de efluxo. Também, Kriengkauykiat *et al.* utilizaram Pa*ß*N, como potenciador da actividade da levofloxacina, e verificaram que a prevalência do fenótipo de hiperexpressão decresceu na presença do inibidor e foi mais prevalente nas estirpes resistentes à levofloxacina e em frequência variável entre 27 e 86% nas estirpes com resistência cruzada a outros antibióticos. O inibidor reduziu 16 vezes o valor da CMI para a levofloxacina nas estirpes em que a CMI era de 128 µg/mL[23]. Num estudo recente, Tohidpour *et al.* verificaram que o aumento da expressão de bomba de efluxo estava



presente em 35% dos isolados resistentes às fluoroquinolonas, e em frequência variável nos isolados com resistência cruzada a outros antimicrobianos: gentamicina (31%), ceftazidima (29%) e imipenemo (18%). Em conjunto, estes resultados indicam que o PAβN poderá ser eficaz em procedimentos clínicos para restaurar a susceptibilidade às fluoroquinolonas[24].

/ Terapêutica antimicrobiana

A terapêutica antimicrobiana é usualmente empírica, tendo em conta a susceptibilidade local do microrganismo, e inclui as classes das fluoroquinolonas, β-lactâmicos e aminoglicosídeos, em monoterapia ou em terapêutica combinada[18]. A associação de um β-lactâmico com um inibidor das β-lactamases, como a piperacilina/tazobactam (PIP/TAZ), é também uma opção amplamente utilizada[1].

Lodise *et al.* estudaram isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes em 351 doentes com infecções do tracto respiratório. Os autores verificaram que 48,1% dos isolados tinham tido exposição prévia a antimicrobianos e que a terapêutica com carbapenemos (≥3 dias) e fluoroquinolonas (4 dias) se associava a um desenvolvimento mais rápido da resistência, enquanto a terpêutica com PIP/TAZ (≥12 dias) retardou o aparecimento de microrganismos resistentes[3]. Segundo Vicent *et al.* a PIP/TAZ é um fármaco com grande potencial no tratamento de *Pseudomonas* spp. multirresistentes dado o elevado valor de susceptibilidade a este antimicrobiano (83%). No entanto, alertam para a possibilidade de selecção de isolados com resistência intermédia e para a revisão de protocolos terapêuticos, assim como dos critérios de interpretação da concentração mínima inibitória para a piperacilina/tazobactam[25].

/ Novas abordagens terapêuticas

Considerando os antibióticos aprovados pela FDA de 1998 até 2005, verifica-se que, de forma comum, a maioria apresenta baixa actividade em *P. aeruginosa* [11]. A tigeciclina foi desenvolvida considerando as resistências dos seus antecessores estruturais, nomeadamente a sua expulsão pelo sistema de efluxo Tet[1], sendo no entanto reconhecida pelo sistema MexXY-OprM [26].

A utilização clínica de inibidores de bombas de efluxo que actuem em sinergia com o antibiótico parece ser promissora[11]. Lomovskaya, *et al.* estudaram a potenciação do efeito da levofloxacina, substracto de quatro sistemas de bombas de efluxo. Dos 200.000 compostos naturais e sintéticos estudados foi identificado o MC-207,110, que aumentou 64 vezes a susceptibilidade à levofloxacina, comparativamente à estirpe *wild type*[15]. Apesar de

terem sido descritos parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos desfavoráveis[11] os estudos permitiram o desenvolvimento de compostos análogos, com propriedades optimizadas[9].
O desenvolvimento de novos compostos requer um conhecimento exaustivo das bombas de efluxo, de modo a permitir a inibição simultânea das bombas e uma acção selectiva na célula procariota.

/ Conclusão

As infecções severas causadas por *P. aeruginosa* têm assumido na última década um papel de destaque. A sua elevada resistência intrínseca e adquirida parece ser maioritariamente causada por sistemas de efluxo.

Isolados clínicos com hiperexpressão destas bombas apresentam sérios desafios terapêuticos, devendo a terapêutica administrada ser adequada a esta nova realidade. É imperativo o conhecimento dos microorganismos existentes nas unidades hospitalares, nomeadamente o seu ambiente genético e perfil de susceptibilidade, assim como a promoção da importância de monitorização farmacocinética da terapêutica em doentes mais susceptíveis.

Impõe-se a necessidade de desenvolver novas estratégias alternativas, como a utilização clínica de inibidores de bombas de efluxo. A investigação nesta área deve ser promovida, dado que estudos *in vitro* sugerem que a inibição efectiva das bomba de efluxo pode resultar em hipersensibilização da *Pseudomonas aeruginosa* a níveis de reconhecida eficácia, podendo também inferferir no retardamento do desenvolvimento de novas resistências.

/ Bibliografia

1. Poole K. "Efflux-mediated antimicrobial resistance". *J Antimicrob Chemother* 2005;56(1):20-51.
2. Strateva T, Yordanov D. "*Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance". *J Med Microbiol* 2009;58(Pt 9):1133-48.
3. Lodise TP, Miller CD, Graves J, et al. "Clinical prediction tool to identify patients with *Pseudomonas aeruginosa* respiratory tract infections at greatest risk for multidrug resistance". *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(2):417-22.
4. Hanberger H, J. A. Garcia-Rodriguez, M. Gobernado, H. Goossens, L. E. Nilsson, and M. J. Struelens. "Antibiotic susceptibility among aerobic gram-negative bacilli in intensive care units in 5 European countries. French and Portuguese ICU Study Groups". *Jama* 1999;281:67-71.
5. Cardoso O, Alves AF, Leitao R. "Surveillance of antimicrobial susceptibility of Pseudomonas aeruginosa clinical isolates from a central hospital in Portugal". *J Antimicrob Chemother* 2007;60(2):452-4.
6. Li XZ, L. Zhang, and K. Poole. "Interplay between the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*". *J Antimicrob Chemother* 2000;45:433-6.
7. Deplano A, Denis O, Poirel L, et al. "Molecular characterization of an epidemic clone of panantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*". *J Clin Microbiol* 2005;43(3):1198-204.
8. Piddock LJ. "Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria". *Clin Microbiol Rev* 2006;19(2):382-402.
9. Lynch AS. "Efflux systems in bacterial pathogens: an opportunity for therapeutic intervention? An industry view". *Biochem Pharmacol* 2006;71(7):949-56.
10. Hocquet D, Nordmann P, El Garch F, Cabanne L, Plesiat P. "Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*". *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(4):1347-51.
11. Lomovskaya O, and K. A. Bostian. "Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic - A vision for applied use". *Biochemical Pharmacology* 2006;71:910-8.
12. Adewoye L, Sutherland A, Srikumar R, Poole K. "The mexR repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of mutations compromising activity". *J Bacteriol* 2002;184(15):4308-12.
13. Srikumar R, Paul CJ, Poole K. "Influence of mutations in the mexR repressor gene on expression of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*". *J Bacteriol* 2000;182(5):1410-4.
14. Lomovskaya O, A. Lee, K. Hoshino, H. Ishida, A. Mistry, M. S. Warren, E. Boyer, S. Chamberland, and V. J. Lee. "Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*". *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1340-6.
15. Oh H, Stenhoff J, Jalal S, Wretlind B. "Role of efflux pumps and mutations in genes for topoisomerases II and IV in fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains". *Microb Drug Resist* 2003;9(4):323-8.
16. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. "Contribution of the MexX-MexY-oprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*". *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(9):2242-6.
17. Llanes C, Hocquet D, Vogne C, Benali-Baitich D, Neuwirth C, Plesiat P. "Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously". *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(5):1797-802.
18. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. "Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*". *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(12):3322-7.
19. Ziha-Zarifi I, Llanes C, Kohler T, Pechere JC, Plesiat P. "In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM". *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(2):287-91.
20. Wolter DJ, Smith-Moland E, Goering RV, Hanson ND, Lister PD. "Multidrug resistance associated with mexXY expression in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Texas hospital". *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;50(1):43-50.
21. Cardoso O, Leitão R, Figueiredo A, Sousa JC, Duarte A, Peixe LV. "Metallo-beta--lactamase VIM-2 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Portugal". *Microb Drug Resist.* 2002 Summer;8(2):93-7.
22. Brízio A, Conceição T, Pimentel M, Da Silva G, Duarte A. "High-level expression of IMP-5 carbapenemase owing to point mutation in the -35 promoter region of class 1 integron among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates". *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2006; 27: 27–31.
23. Kriengkauykiat J, E. Porter, O. Lomovskaya, and A. Wong-Beringer. "Use of an efflux pump inhibitor to determine the prevalence of efflux pump-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*". *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:565-70.
24. Tohidpour A, Peerayeh NS, Jalil FM, Hadi RY. "Determination of the Efflux Pump-Mediated Resistance Prevalence in *Pseudomonas aeruginosa*, Using an Efflux Pump Inhibitor". *Current Microbiology* 2009;59(3):352-355.
25. Vincent JL. "Microbial resistance: lessons from the EPIC study. European Prevalence of Infection". *Intensive Care Med* 2000;26 Suppl 1:S3-8.
26. Dean CR, Visalli MA, Projan SJ, Sum PE, Bradford PA. "Efflux-mediated resistance to tigecycline (GAR-936) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1". *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(3):972-8.