



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

VALDEMIR VICENTE DA SILVA JÚNIOR

**USO DE PONTOS QUÂNTICOS PARA ANÁLISE DA ATIVIDADE *in vitro* DO
INIBIDOR DE BOMBA DE EFLUXO CARBONIL CIANETO-3-
CLOROFENILHIDRAZONA SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILME E PERFIL DE
SUSCEPTIBILIDADE DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa***

Orientadora: Profa. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes

**Recife - PE
2018**

VALDEMIR VICENTE DA SILVA JÚNIOR

**USO DE PONTOS QUÂNTICOS PARA ANÁLISE DA ATIVIDADE *in vitro* DO
INIBIDOR DE BOMBA DE EFLUXO CARBONIL CIANETO-3-
CLOROFENILHIDRAZONA SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILME E PERFIL DE
SUSCEPTIBILIDADE DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa***

Tese de doutorado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical.

Orientadora

Prof.: Dra. Maria Amélia Vieira Maciel

Professora Associada do Departamento de Medicina Tropical do CCS/UFPE

Coorientadora

Prof.: Dra. Ana Catarina de Souza Lopes

Professora Adjunta do Departamento de Medicina Tropical do CCS/UFPE

**Recife – PE
2018**

Catálogo na fonte:
Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

S586u Silva Júnior, Valdemir Vicente da.
Uso de pontos quânticos para análise da atividade *in vitro* do inibidor de bomba de efluxo carbonil cianeto-3-clorofenilhidrazona sobre a formação de biofilme e perfil de susceptibilidade de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* / Valdemir Vicente da Silva Júnior. – 2018.
112f. il.; 30 cm.

Orientadora: Maria Amélia Vieira Maciel.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical. Recife, 2018.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. Carbonil cianeto m-clorofenil hidrazona. 3. Farmacorresistência bacteriana múltipla. 4. Pontos quânticos. I. Maciel, Maria Amélia Vieira (orientadora). II. Título.

616.988

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2018 - 214)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

VALDEMIR VICENTE DA SILVA JÚNIOR

**ANÁLISE DA ATIVIDADE *in vitro* DO INIBIDOR DE BOMBA DE EFLUXO
CARBONIL CIANIDO-3-CLOROFENILIDRAZONA FRENTE A ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical.

Aprovado em: 28/02/2018.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Célia Maria Machado Barbosa de Castro (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Paulo Sérgio Ramos de Araújo (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Paulo Euzébio Cabral Filho (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Isabella Macário Ferro Cavalcanti (Examinadora Externa)
Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão (CAV/UFPE)

Prof^a. Dr^a. Marcelle Aquino Rabelo (Examinadora Externa)
Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO-PE)

Dedico

A Deus, fonte de sabedoria, soberania e amor eternos.

À minha esposa Nara Lins, companheira, amiga, auxiliadora idônea, meu grande amor.

Aos meus pais, Sr. Valdemir e D. Ivanete por me criarem e serem provedores do que necessitei durante minha juventude.

“se procurar a sabedoria como se procura a prata e buscá-la como quem busca um tesouro escondido, então você entenderá o que é temer ao Senhor e achará o conhecimento de Deus.” (Provérbios 2: 4-5)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por Seu Amor, Proteção, Sustento, Paz e Sabedoria que me foram concedidos.

A minha esposa, Nara Lins de Melo, pelo companheirismo, cumplicidade e amor por todos os dias da nossa caminhada;

Aos meus pais, Valdemir e Ivanete, por terem me educado desde criança para que hoje eu possa estar concluindo mais esta etapa da minha vida;

A minha orientadora, Profa. Dra. Amélia Maciel, por me acolher de maneira especial, por todo o aprendizado desde a graduação, e me proporcionar o prazer de poder trabalhar com minhas queridas *Pseudomonas aeruginosa*.

A minha coorientadora Profa. Dra. Ana Catarina Lopes, por ter ajudado de forma crucial na execução desse projeto, sempre atenciosa e gentil.

Ao Prof. Dr. Paulo Euzébio, juntamente com a Profa. Dra. Adriana Fontes do laboratório de Biofísica Química- UFPE, por todas as contribuições prestadas a este trabalho.

Aos meus colegas de graduação (Aline, Thiago, Fábio, Antônio e Maria da Conceição) que me acompanharam durante os quatro anos do curso de Biomedicina;

A todos os colegas de laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular da UFPE, Lilían, Marcelle, Paula, Jussy, Gabriela, Armando e Jaílton.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, em especial, Walter Leite.

A todos os que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa responsável por causar infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos. Os sistemas de efluxo multidroga são importantes para o surgimento de fenótipos multidroga-resistentes (MDR), que tem dificultado o tratamento das infecções por *P. aeruginosa*. O presente estudo teve como objetivo analisar a ação do inibidor de bomba de efluxo carbonil cianeto-3-clorofenilhidrazona (CCCP) frente a isolados clínicos de *P. aeruginosa* multidroga-resistentes provenientes de hospitais pernambucanos. Oito isolados MDR foram selecionados para o estudo, obtidos dos laboratórios de bacteriologia de três hospitais diferentes: um Hospital Universitário (UH), um Hospital terciário (TH) e um Hospital oncológico (CH), entre 2006 e 2017. Os isolados foram estocados no Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular (LBBM) do Departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco. Reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada para pesquisa dos genes *mexA* e *mexE* codificantes da proteína canal dos sistemas de efluxo MexAB-OprM e MexEF-OprN, além dos genes codificantes de enzimas beta-lactamases *bla*_{KPC}, *bla*_{SPM} e *bla*_{GES}. O método de disco-difusão determinou os perfis de susceptibilidade para sete antimicrobianos diferentes na ausência e na presença de CCCP. As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para amicacina, meropenem e polimixina B foram obtidas através de microdiluições na ausência e na presença de CCCP. Um isolado foi selecionado para realização de microscopia de fluorescência após incubação com um bioconjugado de pontos quânticos de CdTe/meropenem na ausência e na presença do CCCP. Encontramos os genes *mexA* e *mexE* simultaneamente em todos os isolados analisados. Os genes *bla*_{KPC}, *bla*_{SPM-1} e *bla*_{GES} também foram detectados (dois, um e três isolados, respectivamente) não havendo simultaneidade desses genes numa mesma bactéria. A adição do CCCP ocasionou aumento do halo de inibição em dois isolados, o primeiro para o imipenem (12 mm para 22 mm), o segundo isolado para ticarcilina/clavulanato e aztreonam (0 mm para 10 mm e 10 mm para 18 mm, respectivamente). Um terceiro isolado apresentou colônias crescidas no interior dos halos de inibição indicativas da presença do fenômeno de heterorresistência, essas colônias supostamente heterorresistentes desapareceram após a adição do CCCP para os antibióticos cefepime, aztreonam, gentamicina e ciprofloxacina. Após adição do CCCP dois isolados alteraram as CIMs para amicacina (128 µg/mL para 64 µg/mL e mais de 256 µg/mL para 32 µg/mL), para meropenem, um isolado diminuiu a CIM (32 µg/mL para 16 µg/mL) e outro aumentou (8 µg/mL para 16 µg/mL). Quanto à polimixina B todos os isolados tiveram as CIMs diminuídas na presença do inibidor sendo quatro isolados de 4 µg/mL para 2 µg/mL, três de 8 µg/mL para 4 µg/mL e um de 4 µg/mL para 1 µg/mL. A análise através de microscopia de fluorescência do bioconjugado de pontos quânticos com meropenem demonstrou diminuição na formação de biofilme e alteração no perfil de marcação da bactéria após adição de CCCP. Esses resultados sugerem que o CCCP pode ser apontado como um novo potencial agente usado em sinergia com os antibióticos para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa*, além de poderem ser determinantes de resistência antimicrobiana através de sistemas de efluxo.

Palavras-Chave: *Pseudomonas aeruginosa*. Carbonil Cianeto m-Clorofenil Hidrazona. Biofilmes. Farmacorresistência Bacteriana Múltipla. Pontos Quânticos.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative bacterium responsible by causing opportunistic infections in immunocompromised patients. Multidrug efflux systems are important for emergence of multidrug-resistant (MDR) phenotypes which has been hindered treatment of *P.aeruginosa* infections. The present study aimed to analyze the action of carbonyl cyanide-3-chlorophenylhydrazone efflux pump inhibitor (CCCP) against multidrug-resistant *P. aeruginosa* clinical isolates from hospitals in Pernambuco. Eight MDR isolates were selected for study, collected from bacteriology laboratories from different hospitals: a University Hospital (UH), a Tertiary Hospital (HT) and a Cancer Hospital (CH) between 2006 and 2017. The isolates were stored in Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular (LBBM) do Departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco. Polymerase chain reaction (PCR) was performed to investigate *mexA* and *mexE* genes codifying channel-protein on MexAB-OprM and MexEF-OprN efflux systems, besides to beta-lactamase enzyme coding by *bla*_{KPC}, *bla*_{SPM-1} and *bla*_{GES}. The susceptibility profiles for seven different antimicrobials were determined by disk-diffusion method in the absence and presence of CCCP. Minimum inhibitory concentrations (MICs) for amikacin, meropenem and polymyxin B were obtained by microdilution in the absence and presence of CCCP. A single isolate was selected to fluorescence microscopy analysis after incubation with CdTe quantum dots / meropenem bioconjugate in the absence and presence of CCCP. The *mexA* and *mexE* genes were detected, simultaneously in all analyzed isolates. The *bla*_{KPC}, *bla*_{SPM-1} and *bla*_{GES} genes were also detected (in two, one and three isolates, respectively), these genes were no identified in the same bacterium. The CCCP addition caused an increase in inhibition halo for two isolates, the first for imipenem (12 mm for 22 mm), the second for ticarcillin/clavulanate and aztreonam (0 mm for 10 mm and 10 mm for 18 mm, respectively). A third isolate presented colonies grown within the inhibition halos indicative of presence of heteroresistance phenomenon, these supposedly heteroresistant colonies disappeared after the CCCP addition to antibiotics cefepime, aztreonam, gentamicin and ciprofloxacin. After CCCP addition, two isolates changed the MICs for amikacin (128 µg/ mL to 64 µg/ mL and > 256 µg / mL to 32 µg / mL), for meropenem one isolate decreased MIC (32 µg / mL for 16 µg / mL) and another increased (8 µg / mL to 16 µg / mL). Concerning to polymyxin B, all isolates had MICs decreased in the presence of inhibitor: four isolates from 4 µg / mL to 2 µg / mL, three from 8 µg / mL to 4 µg / mL and one from 4 µg / mL to 1 µg / mL. Fluorescence microscopy of quantum dot bioconjugates with meropenem showed a decrease in biofilm formation and a change in the labeling profile of bacteria after CCCP addition. These results demonstrate that CCCP can be identified as a new potential agent used in synergy with antibiotics for treatment of *P.aeruginosa* infections, and may be determinants of antimicrobial resistance by efflux systems.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*. Carbonyl Cyanide m-Chlorophenyl Hydrazone. Biofilms. Drug Resistance, Multiple, Bacterial. Quantum dots.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Representação do genoma de <i>P.aeruginosa</i>	19
Figura 2-	Percentual de resistência antimicrobiana na América latina e no Brasil.....	20
Figura 3-	Esquema do sistema de efluxo MexAB-OprM em <i>P.aeruginosa</i>	24
Figura 4-	Mecanismo de desrepressão do operon MexAB-OprM.....	25
Figura 5-	Formação e dispersão de Biofilme em <i>P.aeruginosa</i>	26
Figura 6-	Representação dos seis mecanismos de ação dos EPIs sobre o sistema de efluxo MexAB-OprM em <i>P.aeruginosa</i>	28
Figura 7-	Representação esquemática do procedimento de extração de DNA total bacteriano utilizando o Brazol.....	32
Figura 8-	Representação de placa com discos de anticorbianos com semeio em tapete de <i>P.aeruginosa</i> após 18h de incubação.....	36
Figura 9-	Representação de placa de 96 poços de microdiluição em <i>P.aeruginosa</i> revelada pela rezasurina após 20h de incubação.....	37
Figura 1-	Ocorrência de heterorresistência para CPM no isolado P16TH e ausência do fenômeno após adição do CCCP. Notar a presença de colônias no interior do halo de inibição (A). Desaparecimento das colônias após a adição do CCCP (B).....	48

Figura 1- Absorção (linha contínua) e emissão (linha tracejada) do Meropenem. $\lambda_{exc} = 300$ nm.....57

Figura 2- Espectros de absorção dos QDs e conjugados QD-MPM. Em (a) podemos observar a absorção (linha contínua) e a emissão (linha tracejada) dos QDs sozinhos, já em (b) podemos observar a emissão do QD sozinho (linha contínua) e do QD-MPM (linha tracejada). $\lambda_{exc} = 488$ nm.....58

Figura 3- Imagens de microscopia de fluorescência do isolado P118 incubado com o conjugado QD-MPM. Em (A) imagem de fluorescência com emissão no filtro vermelho BP 645/75 nm e em (B) sobreposição da emissão do filtro vermelho com o contraste de fase. Barra de escala: 25 μ m.....59

Figura 4- Imagens de microscopia de fluorescência do isolado P118 incubado com excesso de MPM e o conjugado QD-MPM. Barra de escala: 25 μ m.....59

Figura 5- Imagens de microscopia de fluorescência da ATCC Pa27853 incubada com excesso de MPM e o conjugado QD-MPM. Em (A) imagem de fluorescência com emissão no filtro vermelho BP 645/75 nm e em (B) sobreposição da emissão do filtro vermelho com o contraste de fase. Barra de escala: 25 μ m.....60

Figura 6- Imagens de microscopia de fluorescência do isolado P118+CCCP incubados com o conjugado QD-MPM. Em (A) imagem de fluorescência com emissão no filtro vermelho BP 645/75 nm e em (B) sobreposição da emissão do filtro vermelho com o contraste de fase. Barra de escala: 25 μ m.....61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. *Primers* usados para pesquisa dos genes de efluxo *mexA*, *mexE*, *bla*_{GES} *bla*_{KPC} e *bla*_{SPM-1}.....33

Tabela 1. *Primers* usados na pesquisa dos genes de efluxo *mexA* e *mexE* e de beta-lacmases *bla*_{GES} *bla*_{KPC}, *bla*_{SPM-1}.....43

Tabela 2. Características dos isolados *P. aeruginosa* MDR em relação ao tipo de amostra clínica, departamento de internação, gene identificado e perfil de resistência.....45

Tabela 3. Resultados das CIMs para polimixina B em isolados de *P.aeruginosa* MDR na ausência e na presença de CCCP.....46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIM	Australian imipenemase
BHI	Brain Heart Infusion
<i>bla</i>	Gene codificante de beta-lactamase
<i>bla</i>IMP	beta-lactamase imipenemase
BP	“Passa banda”
CCCP	Carbonil cianeto-3-clorofenilhidrazona
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DIM	Dutch imipenemase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPI	Inibidor de bomba de efluxo
ESBL	Beta lactamase de espectro estendido
GIM	German imipenemase
KHM	Kyorin health science metallo-beta-lactamase
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> -Carbapenemase
LB	Luria-Bertani
LBBM	Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular
MBL	Metalo-Beta-lactamase
MDR	Multidroga resistente
NDM	New Delhi metallo-beta-lactamase

PAβN	Fenilalanina arginil β naftilamida
PDR	Pan-droga resistente
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
RND	“Resistance-Nodulation-Cell Division”
SIM	Seoul imipenemase
SPM	São Paulo metallo-betalactamase
QD	Quantum dot
QS	“Quorum-sensing”
RT-PCR	Reação da Transcriptase reversa PCR
TMB	Tripoli Metallo-beta-lactamase
TSB	Caldo triptona de soja
UFC	Unidades formadoras de colônia
VIM	Verona integron encoded metallo-beta-lactamase
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV	Ultra violeta
XDR	“Extensivamente droga-resistente”

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
2.2	<i>P.aeruginosa</i> Multidroga-resistentes no Brasil	19
2.3	Mecanismos de Resistencia Intrínsecos	20
2.4	Beta-lactamases e enzimas tipo KPC	21
2.5	Bombas de Efluxo Multidroga	23
2.6	Biofilmes	25
2.7	Inibidores de bombas de efluxo	26
2.8	Pontos quânticos e suas aplicabilidades na Biomedicina	29
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo geral	30
3.2	Objetivos específicos	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	Desenho do estudo	30
4.2	Local do estudo	31
4.3	Isolados bacterianos	31
4.4	Padronização das técnicas empregadas	31
4.4.1	Armazenamento dos isolados bacterianos	31
4.4.2	Extração de DNA total bacteriano	31
4.4.3	Condições para detecção dos genes <i>mexA</i> e <i>mexE</i> através de PCR	32
4.4.4	Condições para identificação do gene <i>bla_{GES}</i> através de PCR	34
4.4.5	Condições para identificação dos genes <i>bla_{KPC}</i> e <i>bla_{SPM-1}</i> através PCR	34
4.4.6	Determinação do perfil de susceptibilidade através do método de disco-difusão	35
4.4.7	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela técnica de microdiluição	36
4.4.8	Inibição das bombas de efluxo com CCCP	37
4.4.9	Síntese e caracterização dos pontos quânticos de CdTe	38
4.4.10	Conjugação de QDs ao Meropenem	38
4.4.11	Preparação de inóculos bacterianos e incubação com os pontos quanticos de CdTe	39
5	RESULTADOS	40
6	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS	66

APÊNDICE A- ARTIGO 1 VERSÃO EM INGLÊS	78
APÊNDICE B- ARTIGO 2 VERSÃO EM INGLÊS	90
ANEXO A- REGISTRO NO COMITÊ DE ÉTICA Nº 009/11	106
ANEXO B- ADENDO DO REGISTRO NO COMITÊ DE ÉTICA Nº 009/11.....	107
ANEXO C- PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA HOSPITAL DO CÂNCER DE PERNAMBUCO.....	108
ANEXO D- CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 1 NA REVISTA JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY	111
Anexo E- CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 2 REVISTA JOURNAL OF BIOMEDICAL SCIENCE.....	112

1 INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno oportunista que acomete humanos, outros animais, plantas e eucariotos inferiores (SCHUSTER et al., 2003), juntamente com outras espécies bacterianas está bastante relacionada com infecções em pacientes oncológicos (JÁCOME et al., 2016), provenientes de centro de queimados (DE ALMEIDA SILVA et al., 2017) e também nas UTIs (SILVA JÚNIOR et al., 2017). Além disso, vários tipos de infecções estão associados a esse micro-organismo, como por exemplo: pneumonias, infecções da corrente sanguínea e do trato urinário (KRIENGKAUYKIAT et al., 2005).

A produção de beta-lactamases é um dos principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos por causa da grande diversidade de enzimas existentes que apresentam atividade contra os antimicrobianos beta-lactâmicos (JÁCOME et al., 2016).

Além disso, a membrana externa das bactérias Gram-negativas se constitui como uma complexa barreira de proteção contra agentes tóxicos. Os sistemas de efluxo controlam a concentração intracelular de várias moléculas. Antimicrobianos e biocidas são substratos para esses sistemas, cuja superexpressão muitas vezes resulta no aparecimento de isolados multidroga resistentes (MDR) configurando-se como um problema de saúde pública (KRIENGKAUYKIAT et al., 2005; BOLLA et al., 2011).

A atividade da membrana externa das bactérias Gram-negativas compreende tanto mecanismos de influxo quanto de efluxo, e diferentes estratégias vem sendo usadas para anular essas atividades no intuito de restaurar a atividade dos antimicrobianos contra bactérias resistentes (BOLLA et al., 2011).

A escassez de opções terapêuticas no tratamento das infecções por *P.aeruginosa* MDR e Pan-resistentes (PDR) tem incentivado a busca por novos agentes antimicrobianos. Dentre essas estratégias, os inibidores dos sistemas de bombas de efluxo são potenciais fármacos para o uso em sinergismo com os agentes antimicrobianos já existentes para o tratamento das infecções. (KRIENGKAUYKIAT et al, 2005; MAHAMOUD et al, 2007; MISRA & BRAVO, 2009; SINGH et al, 2011).

Um dos inibidores de efluxo que vem sendo utilizado em testes com bactérias Gram-negativas, incluindo a *P.aeruginosa* é o carbonil cianeto-3-clorofenilhidrazona (CCCP), uma molécula que inibe a força próton motriz necessária para o

funcionamento das bombas de efluxo pertencentes à família RND (IKONOMIDIS et al., 2008).

Estudo *in vitro* utilizando isolados de *P.aeruginosa* verificou aumento da susceptibilidade ao meropenem tanto no teste de diluição em ágar quanto na difusão em disco quando o CCCP adicionado ao meio de cultura, demonstrando sinergismo entre as drogas (POURNARAS et al, 2005).

Os isolados testados nesse estudo apresentaram negatividade para a pesquisa de genes codificantes de metalo beta-lactamases (MBL), no entanto carreavam os genes *mexB* e *mexY* responsáveis pela codificação de duas proteínas pertencentes aos sistemas de efluxo MexAB-OprM e MexXY-OprM, respectivamente. A técnica de *Reverse Transcriptase*-PCR (RT-PCR) demonstrou a superexpressão dos genes *mexB* e *mexY* (POURNARAS et al, 2005).

O uso do CCCP em isolados de *Klebsiella pneumoniae*, foi capaz de reduzir de duas a quatro vezes o valor da concentração inibitória mínima (CIM) para ciprofloxacina (ZHONG et al, 2013).

A interferência do CCCP na formação de biofilmes em *P.aeruginosa* já foi avaliada, demonstrando que o composto ocasionou uma diminuição na densidade óptica de isolados que foram submetidos à presença do inibidor (IKONOMIDIS et al., 2008). Esse achado também foi verificado em *Salmonella typhimurium* não apenas com o CCCP, mas também com clorpromazine e Fenil-arginina- β -Naftilamida (PA β N) (BAUGH et al, 2014).

Diversas técnicas podem ser aplicadas como novas ferramentas em estudos biológicos afim de melhor compreendermos alguns processos. Uma dessas é o uso de pontos quânticos ou *Quantum dots* (QD) que são nanocristais fluorescentes geralmente sintetizados a partir de calcogenetos de Cádmio (HOLZINGER; LE GOFF; COSNIER, 2014). Os QDs são nanomateriais com aplicabilidades em diversos campos da pesquisa, como por exemplo, células cancerígenas e bactérias (CABRAL FILHO et al., 2016; GALDIERO et al., 2016). A utilização de QDs conjugados a antimicrobianos usados na clínica com o intuito de estudar mecanismos de resistência aos antimicrobianos e formação de biofilme é um fato inédito nos estudos microbiológicos.

No presente estudo, buscamos obter informações acerca da ação do inibidor de efluxo CCCP sobre o perfil de susceptibilidade e da formação de biofilme em *P.aeruginosa*, através de microdiluição e dos testes de disco-difusão. Os QDs

bioconjugados ao meropenem foram utilizados para realizar marcação das células de *P.aeruginosa* e, desta forma, também avaliar a ação do CCCP.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas compreende um gênero de bacilos Gram-negativos, aeróbios, com motilidade unipolar que possui cerca de 140 espécies onde a maioria são saprófitas, e se desenvolvem no solo, pântanos e ambientes marinhos costeiros, bem como em plantas e tecidos animais. (STOVER et al, 2000; NADEEM et al, 2009). Dentre o gênero *Pseudomonas* a emergência da espécie *P. aeruginosa* como um patógeno oportunista deve-se a sua capacidade de resistência aos antibióticos e desinfetantes que conseguiriam eliminar outras espécies de bactérias ambientais (STOVER et al, 2000). Além disso, esse patógeno adquiriu a capacidade de infectar diversos sítios do corpo de um indivíduo susceptível, e isso leva os pacientes internados nas unidades de terapia intensiva (UTI) a serem frequentemente os mais acometidos por esse micro-organismo (PIRES et al, 2009).

Quando comparada as bactérias da família *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* ainda possui maior versatilidade em relação à capacidade de adquirir resistência por vários mecanismos, sejam eles intrínsecos ou por aquisição de determinantes genéticos de resistência transferíveis. Muitas vezes essa resistência é adquirida durante o tratamento da infecção, algo que muitas vezes é inevitável por ser inerente a espécie (NEVES et al., 2011; TIAN et al., 2011; BEGUM et al., 2013). Nos hospitais, *P.aeruginosa* tem sido uma bactéria isolada de diferentes superfícies abióticas como equipamentos de ventilação assistida e intubação, lentes de contato (MORALES et al., 2012).

P. aeruginosa possui um genoma com 6.300.000 pares de bases (6,3 Mpb) que é significativamente maior que a maioria dos genomas bacterianos, e apresenta cerca de 5.570 códigos abertos de leitura (ORFs -“Open reading frames”), o que torna sua complexidade genética próxima de um simples eucarioto como *Saccharomyces cerevisiae*, cujo genoma pode codificar cerca de 6.200 proteínas (STOVER et al., 2000) (**Figura 1**).

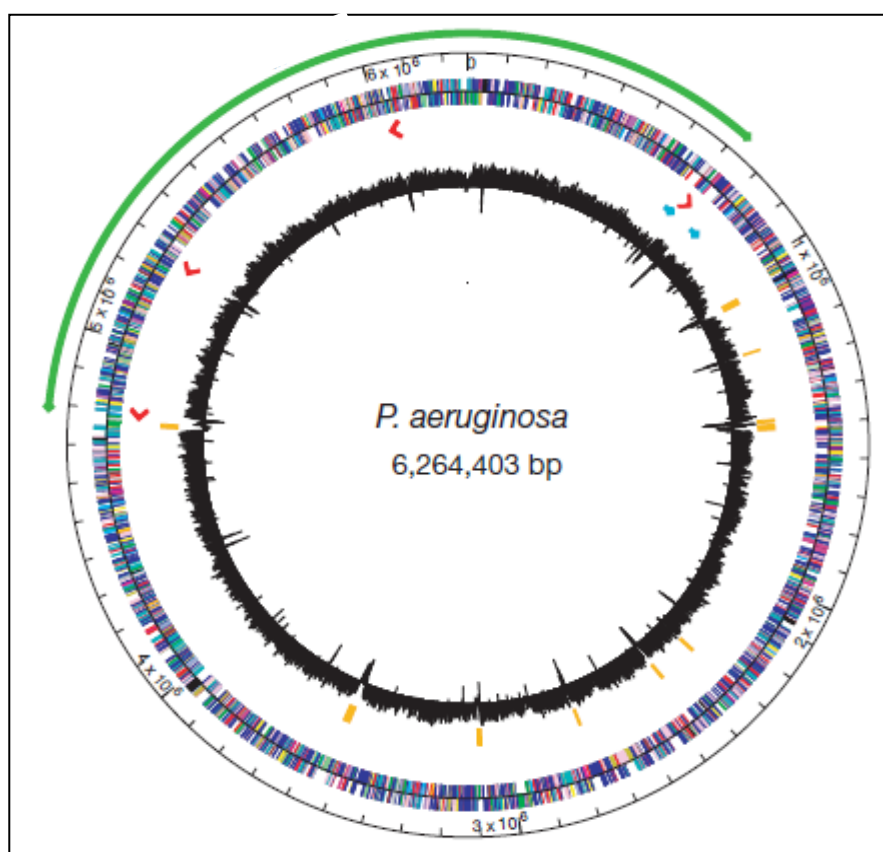


Figura 1- Representação do genoma de *P.aeruginosa*. Fonte: STOVER et al. (2000).

Essa espécie está incluída num grupo dos patógenos chamado “ESKAPE” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, espécies de *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*) conhecido como as mais importantes ameaças emergentes deste século e tem desenvolvido uma susceptibilidade reduzida a uma ampla quantidade de moléculas antimicrobianas (KANJ & KANAFANI, 2011; ESPOSITO & SIMONE, 2017).

2.2 *P. aeruginosa* Multidroga-resistentes no Brasil

A endemicidade de isolados clínicos de *P. aeruginosa* MDRs vem sendo relatada mundialmente aliada a elevados níveis de morbidade/mortalidade, com destaque para a resistência ao imipenem que vem aumentando drasticamente nos últimos anos (NEVES et al, 2011) (**Figura 2**). No Brasil, *P.aeruginosa* é um dos principais agentes causadores de infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAS) onde os diversos estudos apontam para uma disseminação clonal da espécie (SADER et al, 1993; DE FREITAS & BARTH, 2002; GALES et al, 2004). Também é

importante salientar a disseminação de clones de alto risco denominados como extensivamente droga-resistentes (XDR) (CABOT et al, 2012).

Tabela 1 Índice de resistência em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolada no Brasil						
Antibióticos	Resistência (%)					
	América Latina			Brasil		
	SENTRY ⁽³⁾	SENTRY ⁽⁹³⁾	MYSTICY ⁽³²⁾	Região Centro-Oeste ⁽¹²¹⁾	Região Sudeste ⁽⁸¹⁾	Região Sul ⁽²⁸⁾
Imipenem	37,8	30,2	36,6	58,3	38,3	82,7
Meropenem	35,6	25,6	33,9	50,0	30,4	–
Amicacina	34,6	30,5	33,8	57,6	35,6	78,7
Ceftazidima	43,7	34,3	36,0	48,7	36,5	90,7
Ciprofloxacino	50,1	41,3	48,3	59,5	43,0	93,7

Figura 2- Percentual de resistência antimicrobiana na América latina e no Brasil. Fonte: Adaptado de NEVES et al. (2011).

Os principais mecanismos relacionados com fenótipos MDR em *P. aeruginosa* são: a produção de metalo beta-lactamase (MBL) do tipo SPM-1, presença de metilase 16S rRNA RmtD, perda de porinas do tipo OprD e superexpressão dos sistemas de bombas de efluxo; que podem explicar os altos índices de resistência a carbapenêmicos e aminoglicosídeos (NEVES et al, 2011). É importante destacar a presença de genes de resistência que inicialmente foram encontrados em outras bactérias, mas que atualmente podem ser detectados em *P.aeruginosa*, como *bla_{GES}* e *bla_{KPC}* (JÁCOME et al, 2016; SILVA JÚNIOR et al, 2017).

2.3 Mecanismos de Resistencia Intrínsecos

P.aeruginosa é intrinsecamente resistente a uma variedade de antimicrobianos e pode adquirir resistência durante a terapia anti-pseudomonas comprometendo o tratamento das infecções causadas por esse micro-organismo (POOLE, 2011). Esse patógeno possui expressão constitutiva da beta-lactamase cromossomal do tipo AmpC e sistemas de bombas de efluxo, combinados com a diminuição de permeabilidade da membrana externa (STRATEVA & YORDANOV, 2009).

Beta-lactamases do tipo AmpC são cefalosporinases que não são substratos dos inibidores de beta-lactamases (e.g.: sulbactam, tazobactam e clavulanato), seus genes são de origem cromossomal, no entanto podem apresentar superexpressão

induzível (MELETIS & BAGKERI, 2013). Por exemplo, a enzima AmpC é normalmente produzida em baixos níveis na ausência de antibióticos beta-lactâmicos, mas quando a bactéria está na presença desses fármacos sua expressão pode aumentar cerca de 100 a 1000 vezes, através de um mecanismo de desrepressão mutacional, que pode ser causada por mutações como a sequência de inserção (IS1669) localizada na região do gene repressor *ampD*. (CHEN, YUAN & LIVERMORE, 1995; BAGGE *et al*, 2002).

Em *P.aeruginosa*, os sistemas de efluxo contribuem para o fenótipo de resistência a diversos antimicrobianos de importância clínica, mas não apenas isso, pois acredita-se que alguns sistemas de efluxo também estejam envolvidos com a patogenicidade, ou seja, na colonização e sobrevivência da célula bacteriana dentro do hospedeiro (PIDDOCK, 2006; LAMERS, CAVALLARI & BURROWS, 2013).

As porinas são proteínas presentes na membrana externa das bactérias Gram-negativas que controlam a entrada de substâncias para o interior da célula, essas proteínas formam canais constituídos de água em seu interior que permitem a difusão passiva de solutos hidrofílicos (NIKAIDO, 1994). Diferentes tipos de porinas podem ser encontradas na membrana externa de *P. aeruginosa*, como OprC, OprD, OprE e OprF, onde cada uma desempenha sua função (NEVES, *et al* 2011). A porina OprD, também conhecida como porina D2, vem sendo bastante estudada, pois observou-se que a sua ausência ou até mesmo a diminuição da expressão do gene *oprD* codificante da porina OprD, tem importante contribuição para a resistência aos carbapenêmicos, principalmente meropenem (LIVERMORE, 2002; LIU *et al*, 2013).

2.4 Beta-lactamases e enzimas tipo KPC

A aquisição de beta-lactamases da classe A (beta lactamases de espectro estendido-ESBLs) e classe B (metalo beta-lactamases-MBLs) por isolados clínicos de *P.aeruginosa* é prejudicial para a terapia antimicrobiana em pacientes hospitalizados (PICÃO *et al*, 2009).

Desde 2002, isolados de *P.aeruginosa* produtores de MBL vem sendo descritos no Brasil, contribuindo para um aumento das taxas de resistência aos carbapenêmicos, essas enzimas degradam todos os beta-lactâmicos incluindo aqueles que estão associados aos inibidores de beta-lactamases. As MBLs têm como principais representantes as enzimas imipenemase (IMP), Verona integron

encoded metallo-beta-lactamase (VIM), Seoul imipenemase (SIM), German imipenemase (GIM), São Paulo metallo-beta-lactamase (SPM), Australian imipenemase (AIM), Kyorin health science metallo-beta-lactamase (KHM), New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM), Dutch imipenemase (DIM) e Tripoli Metallo-beta-lactamase (TMB) (NEVES et al, 2011).

Em *P.aeruginosa*, podemos destacar as enzima SPM, que há algum tempo vem apresentando importante contribuição para o aumento da resistência a carbapenêmicos no Brasil, inclusive com a disseminação de clones epidêmicos desse patógeno carregando o gene *bla*_{SPM-1} (GALES et al., 2003).

Outra enzima que pode ser encontra em *P.aeruginosa* é a GES (Beta-lactamase de espectro estendido da Guiana) que é uma ESBL que não pertence a superfamília das beta-lactamases de espectro restrito SHV e TEM (WELDHAGEN, 2006). Mutações no gene *bla*_{GES} podem ampliar o espectro hidrolítico da enzima para ter os carbapenêmicos como substratos, o que aconteceu com a variante GES-2 que apresentando a mutação de apenas um aminoácido teve aumento na capacidade hidrolítica para o imipenem (POIREL et al., 2001).

A enzima KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) é originalmente uma enzima restrita às enterobactérias, mas o gene *bla*_{KCP} também já foi detectado em *P.aeruginosa*. Inicialmente o gene *bla*_{KPC} havia sido reportado em outras bactérias (principalmente *K.pneumoniae*) em vários lugares do mundo. Na Colômbia, foram identificados os primeiros isolados de *P.aeruginosa* positivos para o gene *bla*_{KCP}, logo após o relato da presença do gene em *K.pneumoniae* no país. Esse fato demonstra a capacidade de aquisição de genes de resistência por parte da *P.aeruginosa* (VILLEGAS et al, 2007). E mais recentemente, em 2012, esse gene foi identificado em *P.aeruginosa* no Brasil. Os dois isolados foram obtidos de amostras de secreção traqueal provenientes de dois pacientes distintos internados em unidade de terapia intensiva (UTI). Esses isolados apresentaram o mesmo perfil clonal através da técnica de ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intergenic consensus-based PCR) e foram classificados como isolados MDR. (JÁCOME et al, 2012).

2.5 Bombas de Efluxo Multidroga

A resistência a várias classes de antimicrobianos bem como aos agentes quimioterápicos é muitas vezes mediada pelos sistemas de efluxo (KOURTESI et al., 2013). Os sistemas de bomba de efluxo multidroga são proteínas transportadoras da membrana e geralmente são divididos em 5 classes: 1) SMR (“small drug resistance”); 2) MFS (“major facilitator superfamily”); 3) RND (resistance nodulation cell division); 4) MATE (“multidrug and toxic compound extrusion”) e 5) ABC (“ATP-binding cassette”). Todos esses sistemas funcionam na forma de transporte ativo, obtendo energia de diferentes fontes, sendo prótons H^+ no caso dos sistemas RND, SMR e MFS; e hidrólise de ATP para a classe ABC, já o sistema MATE é Na^+ -dependente (PIDDOCK, 2006; MISRA & BRAVO, 2009). As bombas de efluxo tipo RND funcionam através de um sistema contra-transporte (antiporte) de prótons no qual o gradiente de prótons através da membrana é usado para gerar a força de efluxo da bomba, trocando um íon H^+ por uma molécula do fármaco (PIDDOCK, 2006).

Um único micro-organismo pode expressar mais de um tipo de bomba de efluxo pertencente à mesma família. Por exemplo, *P.aeruginosa* pode expressar mais de um tipo de bomba de efluxo MeX, e *Escherichia coli* pode expressar mais de uma bomba de efluxo Acr (PIDDOCK, 2006).

Em *P.aeruginosa*, o sistema de bombas de efluxo consiste de três proteínas: 1) uma bomba energia-dependente localizada na membrana citoplasmática; 2) uma porina localizada na membrana externa; 3) uma proteína ligadora (canal) que une os dois componentes das membranas (LAMBERT, 2002).

De acordo com Meletis & Bagkeri oito diferentes sistemas de efluxo já foram relatados em *P.aeruginosa*; são eles: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM, AmrAB-OprA (pertencentes à família RND); PmpM (pertencente a família MATE); Mef(A) (pertencente à família MFS); e ErmE_{PAF} (pertencente a família SMR), podemos observar que a *P.aeruginosa* não possui apenas sistemas de efluxo pertencentes a família RND, apesar de este ser o principal tipo (WESTBROK-WADMAN et al, 1999; KOHLER et al, 2001; LI, POOLE & NIKAIDO, 2003; POOLE, 2005; MELETIS & BAGKERI, 2013). Além desses, há relatos de um sistema de efluxo denominado MexGHI-OpmD que confere resistência ao metal vanádio além de estar envolvido no crescimento bacteriano e na virulência através

da comunicação célula-célula (“quorum-sensing”-QS) quinolona-dependente. (AENDEKERK et al, 2002; AENDEKERK et al, 2005).

A primeira bomba de efluxo da família RND caracterizada em *P.aeruginosa* foi MexAB-OprM (POOLE et al, 1993). Como todas as bombas do tipo MeX (“multidrug efflux pump”), a MexAB-OprM é constituída por três proteínas, sendo a MexB (MexF no sistema MexEF-OprN) a proteína dependente de energia; MexA (MexE no sistema MexEF-OprN) a proteína ligadora; e OprM (OprN no sistema MexEF-OprN) a porina da membrana externa (ASKOURA et al, 2011). O esquema dessas proteínas é representado na **figura 3** a seguir.

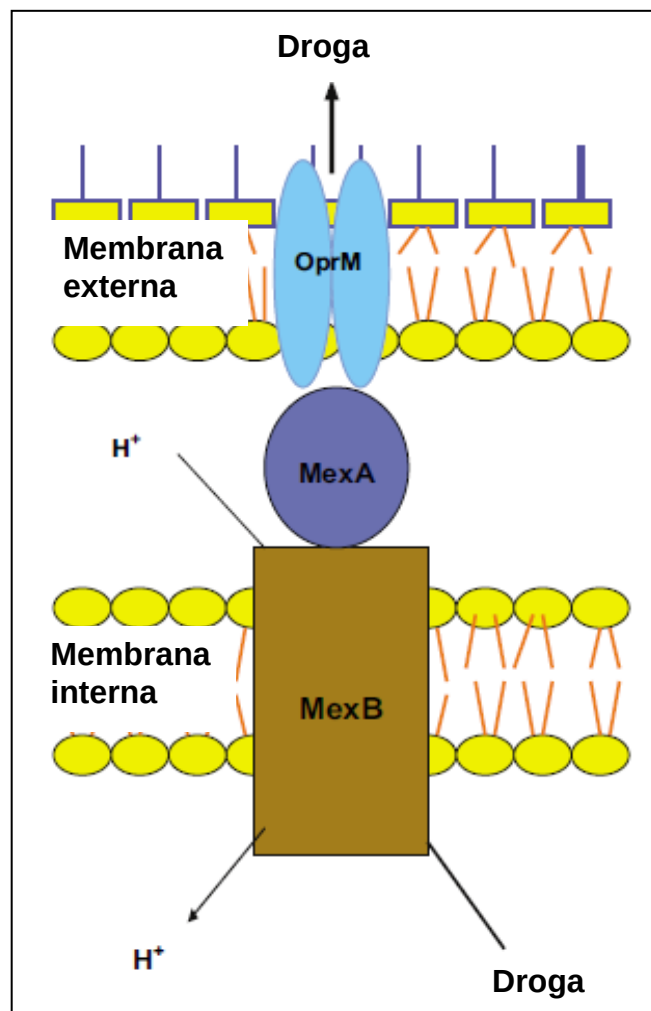


Figura 3- Esquema do sistema de efluxo MexAB-OprM em *P.aeruginosa*.
Fonte: ASKOURA et al. (2011).

Os sistemas Mex diferem entre si quanto à regulação gênica, por exemplo, a expressão do sistema MexGHI-OprD é dependente da densidade celular que é

indicada pelo QS (AENDEKERK et al, 2005), já o MexXY-OprM é induzível e tem expressão acentuada na presença de antimicrobianos (MASUDA et al, 2000).

MexR é uma proteína que regula negativamente a expressão dos sistemas de efluxo em *P. aeruginosa*. Essa proteína é um repressor transcricional, ou seja, mantém-se ligada ao promotor do DNA, quando acontece oxidação dessa proteína, a mesma se desliga do DNA levando a desrepressão do operon MeXAB-OprM (**figura 4**) aumentando a resistência antimicrobiana (CHEN et al, 2008).

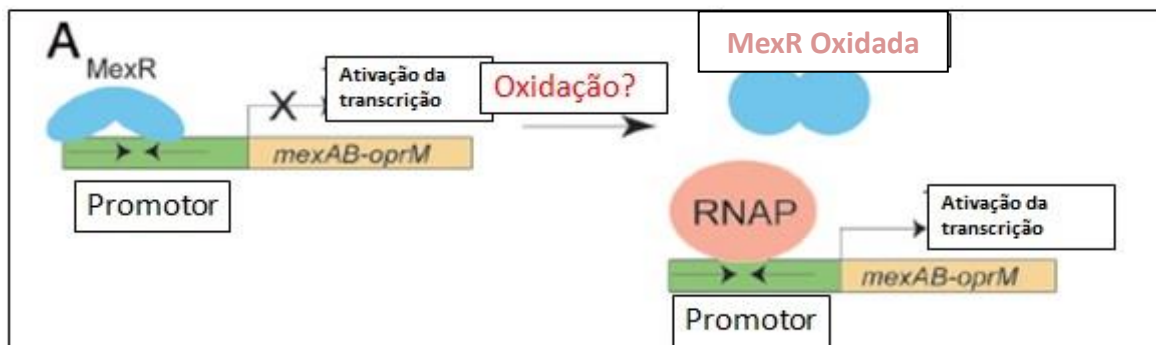


Figura 4- Mecanismo de desrepressão do operon MexAB-OprM. Fonte: CHEN et al. (2008).

2.6 Biofilmes

Biofilmes são comunidades de micro-organismos onde as células se unem umas às outras e frequentemente aderem a uma superfície. As células aderentes permanecem envoltas por uma matriz extracelular de substância polimérica produzida por elas mesmas (SKARIYACHAN et al., 2018). As bactérias que permanecem no interior do biofilme apresentam características peculiares quando comparadas com as células planctônicas no tocante a sua fisiologia e aos altos níveis de resistência às ações do sistema imune do hospedeiro e aos antimicrobianos. Essas características fazem com que o biofilme propicie o desenvolvimento de micro-organismos causadores de infecções crônicas e persistentes (WEI; MA, 2013).

As células associadas ao biofilme apresentam tolerância elevada aos antimicrobianos, esta tolerância é multifatorial e atribuída a algumas características: 1) penetração restrita dos antimicrobianos; 2) crescimento restrito à baixa tensão de oxigênio; 3) expressão de genes específicos no interior do biofilme; 4) presença de

células persistentes (CIOFU et al., 2017). A seguir podemos observar uma representação de um biofilme em *P.aeruginosa* (**Figura 5**).

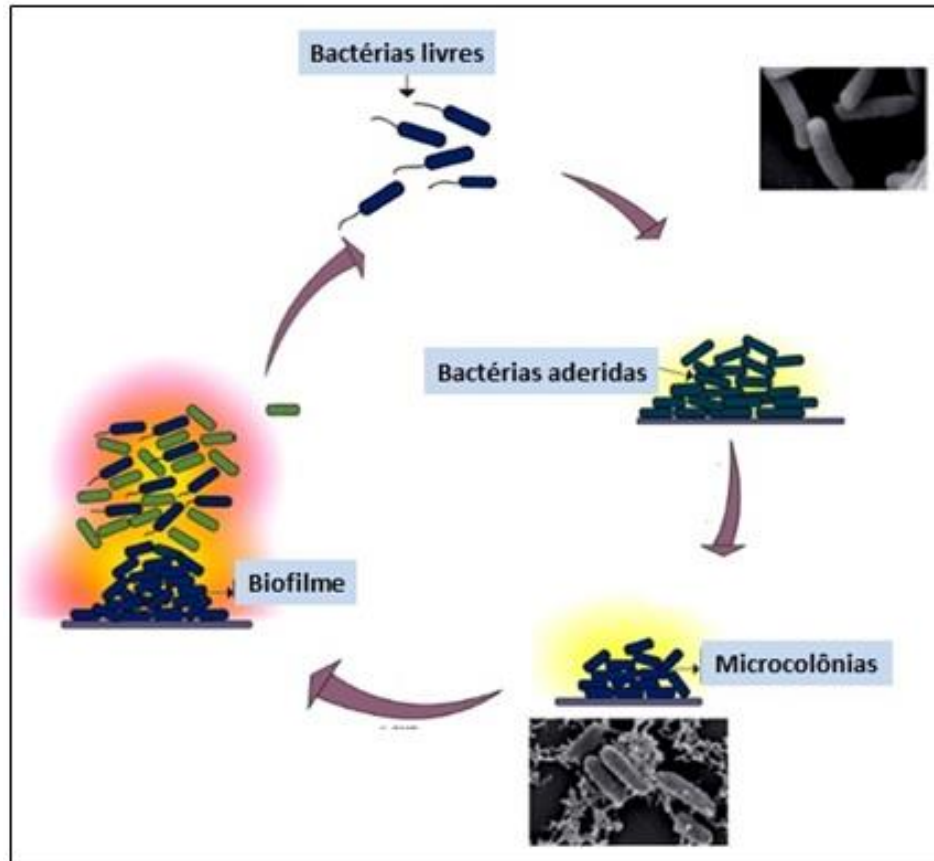


Figura 5- Formação e dispersão de Biofilme em *P.aeruginosa*.

Fonte: Adaptado de SKARIYACHAN et al. (2008).

2.7 Inibidores de Bombas de Efluxo

Inibidores de bombas de efluxo ou EPIs (“Efflux pumps inhibitors”) são substâncias que inibem o fluxo de moléculas mediadas pelos sistemas de bombas de efluxo (SOTO, 2013). Os sistemas de efluxo estão sendo considerados como potenciais novos alvos dos agentes dos antimicrobianos para desenvolvimento de estratégias no tratamento de infecções usando inibidores de bomba de efluxo em combinação com os antimicrobianos convencionais com o intuito de restaurar a atividade destes (LOMOVSKAYA et al, 2001; MARQUEZ, 2005). Além disso, os inibidores de bomba de efluxo se mostraram capazes de reprimir a transcrição dos componentes da matriz dos biofilmes, de algumas bactérias: *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas*

aeruginosa; e até em fungos como *Candida albicans* (BAUGH et al., 2014). A importância dos inibidores dos sistemas de efluxo está sendo tão relevante para o descobrimento de novos antimicrobianos que inclusive compostos naturais são alvo de pesquisa quanto a presença de propriedades inibidoras de efluxo (NEGI et al, 2014; OHENE-AGYEI et al., 2014).

A inibição da atividade dos sistemas de bomba de efluxo em bactérias gram-negativas pode ser realizada de diferentes formas (**figura 6**):

- 1) Alteração dos mecanismos regulatórios necessários para a expressão da bomba de efluxo;
- 2) Desmembramento dos componentes funcionais que compõem a bomba de efluxo;
- 3) Bloqueio da proteína canal da membrana externa (geralmente TolC ou OprM);
- 4) Colapso no fornecimento de energia para funcionamento do efluxo da bomba;
- 5) Inibição competitiva ou não-competitiva do antimicrobiano que serve de substrato para a bomba através de outras moléculas;
- 6) Modificação da estrutura bioquímica do antimicrobiano, diminuindo assim sua afinidade com a proteína reconhecedora da bomba (e.g.: MexB ou MexF) (PAGES & AMARAL, 2009)

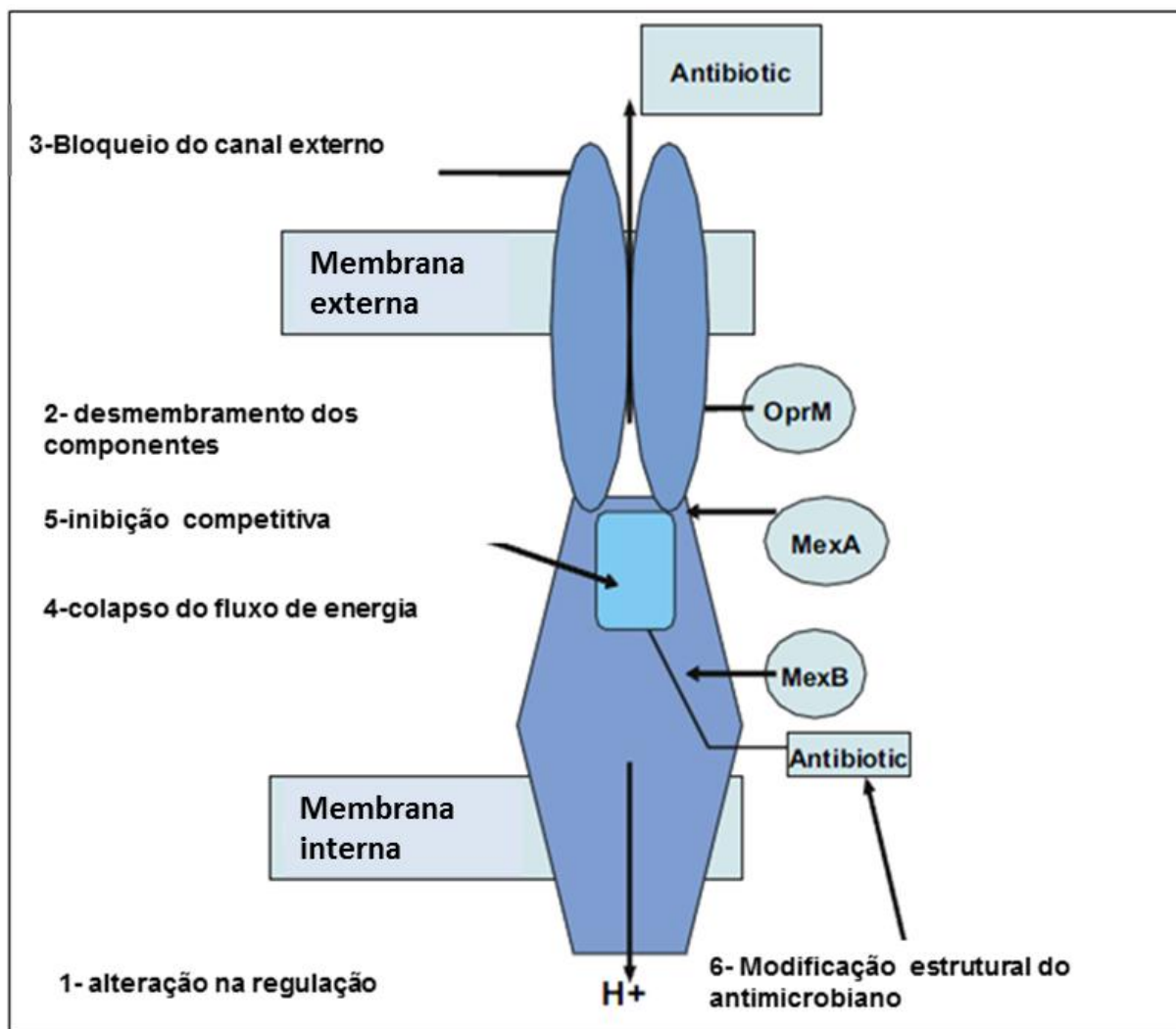


Figura 6- Representação dos seis mecanismos de ação dos EPIs sobre o sistema de efluxo MexAB-OprM em *P.aeruginosa*. Fonte: ASKOURA et al. (2011).

Dentre os diversos EPIs estudados experimentalmente como determinantes de presença de mecanismos de efluxo, podemos destacar dois deles, o fenilalanina arginil beta-naftilamida (PA β N ou MC 207,110) e o carbonil cianeto-3-clorofenilhidrazona (CCCP) (LAMERS, CAVALLARI & BURROWS, 2013; SOTO et al, 2013).

O PA β N é um composto peptidomimético que age nas bombas de efluxo através da inibição competitiva, onde a bomba de efluxo deixa de reconhecer o antimicrobiano passando a expulsar as moléculas de PA β N ao invés dele. Isso faz com que haja aumento da concentração intracelular do antimicrobiano e consequentemente morte do micro-organismo (ASKOURA et al, 2011). Outros compostos derivados do PA β N como, por exemplo, o MC 20,124 tem demonstrado menores níveis de toxicidade e melhor estabilidade em fluidos biológicos e mais atividade contra *P. aeruginosa* (WATKINS et al, 2003).

O CCCP é um desacoplador de fosforilação oxidativa que interrompe o gradiente de prótons através das membranas, destruindo a força próton motriz necessária para o funcionamento da bomba de efluxo e tem sido usado em laboratório para abolir completamente os sistemas de efluxo de antimicrobianos (PAGES & AMARAL, 2009; ZHONG *et al*, 2013; ARDEBILI *et al.*, 2014). Recentemente, o CCCP demonstrou uma diminuição de pelo menos 64 vezes das CIMs para colistina de todos os isolados de *Acinetobacter baumannii* testados, fato que não aconteceu com o PA β N (PARK; KO, 2015). Uma redução de mais que duas vezes a CIM após a adição de CCCP indica que a bomba de efluxo possui capacidade de expulsar antibióticos (ZHONG *et al*, 2013).

2.8 Pontos quânticos e suas aplicabilidades na Biomedicina

Pontos quânticos ou *Quantum dots* (QD) são nanocristais semicondutores luminescentes, um tipo de nanomaterial que vem sendo usado para estudos bioanalíticos (HOLZINGER; LE GOFF; COSNIER, 2014). Algumas propriedades peculiares são atribuídas aos QD como alta resistência a fotodegradação e superfície ativa que propicia a bioconjugação com proteínas e até mesmo fármacos. (FONTES *et al*, 2012; KUMAR; SHARMA; DEEP, 2014; GALDIERO *et al.*, 2016)

Os QDs mais estudados são sintetizados a base de calcogenetos de Cádmio, nos quais se destacam os calcogênios Enxofre (S), Selênio (Se) e Telúrio (Te), estes apresentam um grande espectro de absorção e um estreito espectro de emissão tamanho-dependente (MURRAY; NORRIS; BAWENDI, 1993).

Os QDs possuem inúmeras aplicabilidades na nanomedicina através da conjugação a biomoléculas são capazes de identificar moléculas-alvo em células e tecidos com o intuito de investigar processos celulares em tempo real. Além de serem utilizados para o entendimento a nível celular de diversas patologias (CABRAL FILHO *et al.*, 2016; MOCAN *et al.*, 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a ação do inibidor de bomba de efluxo carbonil cianeto-3-clorofenilhidrazona (CCCP) sobre o perfil de resistência e a formação de biofilme em isolados clínicos de *P. aeruginosa* utilizando bioconjugação com QDs.

3.2 Objetivos específicos

- Detectar os genes codificantes de sistema de efluxo *mexA* e *mexE*, e os genes codificantes para beta-lactamases *bla*_{KPC}, *bla*_{SPM-1} e *bla*_{GES-1}.
- Investigar as alterações dos perfis de susceptibilidade e a concentração inibitória mínima (CIM) para os antimicrobianos antes e após o uso do CCCP.
- Realizar a bioconjugação dos pontos quânticos de CdTe com o meropenem (QD-MPM) e caracterizá-los.
- Avaliar a ação do CCCP sobre a formação do biofilme em *P. aeruginosa* através da microscopia de fluorescência após a marcação com QD-MPM.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo descritivo de base laboratorial, no qual foram realizadas técnicas fenotípicas, moleculares e nanobiotecnológicas para avaliar a contribuição dos sistemas de bombas de efluxo no perfil de resistência e formação de biofilme em isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Além disso, foram utilizadas técnicas moleculares para avaliação da presença de genes relacionados a outros mecanismos de resistência (beta-lactamases) que poderiam interferir nos testes realizados para a avaliação dos sistemas de efluxo.

4.2 Local do estudo

A fase de análise fenotípica dos sistemas de efluxo e a pesquisa dos genes de resistência a beta-lactâmicos e de bombas de efluxo foram realizadas no laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular do Departamento de Medicina Tropical- UFPE. A síntese dos pontos quânticos bem como a conjugação ao meropenem foram realizadas no Laboratório de Biofísica-química do Departamento de Biofísica-UFPE.

4.3 Isolados Bacterianos

Isolados de *P.aeruginosa* MDRs provenientes de pacientes internados em três hospitais localizados em Recife-PE: um hospital universitário, um hospital oncológico e um hospital terciário. Os pacientes foram acometidos por infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS) que desenvolveram a infecção em período superior às 48h da admissão hospitalar.

4.4 Padronização das técnicas empregadas

4.4.1 Armazenamento dos isolados bacterianos

Um total de oito isolados de *P.aeruginosa* foram selecionados de três diferentes hospitais e estavam armazenados em BHI com glicerol a 20% numa temperatura de -20°C no Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular (LBBM) do Departamento de Medicina Tropical UFPE. Os estoques congelados foram incubados em caldo BHI, após a incubação em estufa a 37°C durante 18 a 24 horas, os isolados foram semeados em meio Ágar Cetrimide, que é seletivo para o isolamento de *P.aeruginosa*, neste meio de cultura observamos as características fenotípicas dessa bactéria, como a produção de pigmentos (pioverdina e piocianina), a morfologia da colônia e odor característico. Os isolados de *P. aeruginosa*, portanto, foram posteriormente estocados em microtubos com caldo Triptona de soja (TSB) contendo glicerol a uma concentração final de 20% a -20°C.

4.4.2 Extração de DNA total bacteriano

A partir de colônias isoladas de *P.aeruginosa*, foram preparados inóculos em meio Luria Bertani (LB) que permaneceram sob incubação durante 24 horas, a extração do DNA total bacteriano foi realizada utilizando o Brazol (LGC-

Biotecnologia), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, como mostra o esquema abaixo na **figura 7**.

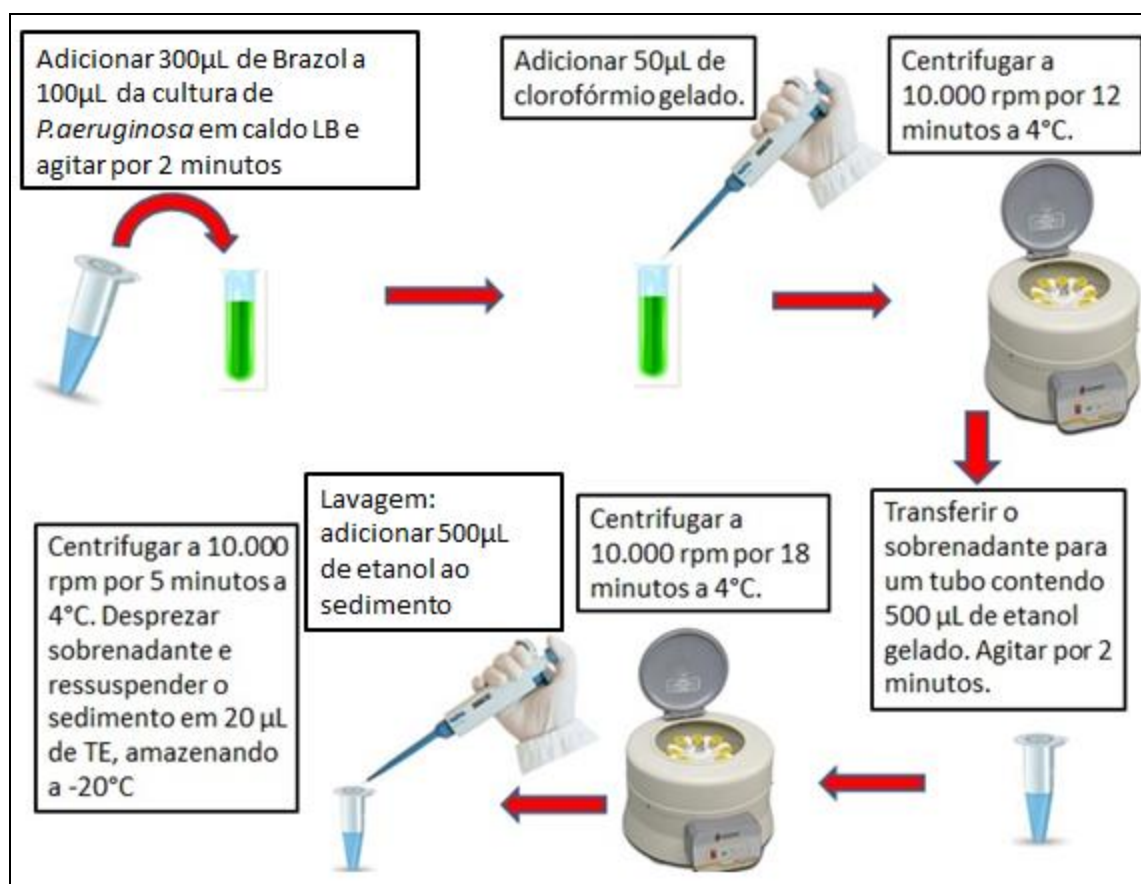


Figura 7- Representação esquemática do procedimento de extração de DNA total bacteriano utilizando o Brazol. Fonte: O autor. (2015).

O DNA bacteriano foi devidamente quantificado através de espectrofotometria pelo aparelho NanoDrop 2000 numa faixa de comprimento de onda entre 260 a 280 nm.

4.4.3 Condições para detecção dos genes *mexA* e *mexE* através de PCR

A técnica de PCR foi empregada para pesquisa molecular dos genes codificantes das proteínas ligantes (*mexA* e *mexE*) dos sistemas de bomba de efluxo: MexAB-OprM e MexEF-OprN. Os primers utilizados estão dispostos na **tabela 1** a seguir, e a técnica foi realizada de acordo com Ozer e colaboradores (OZER et al, 2012). A reação foi preparada para atingir um volume total de 25 µl, contendo 10 ng de DNA genômico, 10 pmol dos *primers*, Tampão 1x (concentração final), 200 µM do dNTPs (Ludwig), 2 mM de MgCl₂ e 1U de *Taq* DNA polimerase (Promega, USA).

A mistura foi levada ao termociclador (Biosystems) e, após aquecimento prévio (94°C por 1 min), seguiram-se 35 ciclos de 1 min a 94°C, 45 segundos na temperatura de anelamento específica para cada “primer” (tabela 1) e 45 segundos a 72 °C para extensão. A última extensão foi de 10 min a 72°C, após o término dos 35 ciclos. O produto da reação aplicado em gel de agarose a 1% e os fragmentos foram visualizados sob luz U.V. Cada reação conteve o DNA das cepas controle *P.aeruginosa* PAO1 e Pa27853 e o controle negativo não conteve DNA.

Tabela 1. *Primers* usados para pesquisa dos genes de efluxo *mexA*, *mexE*, *bla_{GES}*, *bla_{KPC}* e *bla_{SPM-1}*.

Gene	Sequência (5´ - 3´) (F- Forward, R- Reverse)	Temperatura de anelamento/ Referência
<i>mexA</i>	(F) CGACCAGGCCGTGAGCAAGCAC (R) GGAGACCTTCGCCGCGTTGTCGC	71°C /Ozer et al, 2012
<i>mexE</i>	(F) CCAGGACCAGCACGAACTTCTTGC (R) CGACAACGCCAAGGGCGAGTTCAC	69°C/ Ozer et al, 2012
<i>bla_{GES}</i>	(F) ATGCGCTTCATTACGCAC (R) CTATTTGTCCGTGCTCAGG	55°C/ Wang et al, 2006
<i>bla_{KPC}</i>	(F) TGTCACTGTATCGCCGTC (R) CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	58°C/ Yigit et al, 2001
<i>bla_{SPM-1}</i>	(F) CCTACAATCTAACGGCGACC (R) TCGCCGTGTCCAGGTATAAC	40°C/ Gales et al, 2003

4.4.4 Condições para identificação do gene *bla_{GES}* através de PCR

A realização da PCR para o gene *bla_{GES}* utilizou primers específicos previamente usados por Wang e colaboradores (2006) (**Tabela 1**). As reações de amplificação foram preparadas para um volume total de 25 µL por tubo, compreendendo 10 ng de DNA genômico, 10 pmol de cada *primer*, tampão 1X, 200 µM de desoxirribonucleotídeo trifosfato (Ludwig Biotec), 1,5 mM de MgCl₂ e 2U Taq DNA polimerase (Promega).

Os parâmetros do ciclo foram os seguintes: 93°C por 3 min, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 93°C por 1 min, anelamento a 55°C por 1 min; extensão a 72°C por 1 min e uma extensão final a 72°C por 7 min. Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose a 1%, corados com o corante Blue dye (Jena Bioscience) e submetidos a eletroforese. Foi utilizado um marcador de 100 pb (Amresco) como o peso molecular padrão. Após a eletroforese, o fragmento correspondente ao gene (846 pares de bases) foi visualizado sob luz ultravioleta (U.V) e devidamente fotodocumentado. A cepa P118 (pertencente ao próprio LBBM-UFPE) foi usada como controle por já possuir sequência *bla_{GES}* depositada no GenBank (numero de acesso: KF679347)

4.4.5 Condições para identificação dos genes *bla_{KPC}* e *bla_{SPM-1}* através PCR

Os genes para beta-lactamases *bla_{SPM-1}* e *bla_{KPC}* foram investigados utilizando primers específicos. Para cada gene, as reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 25 µL por tubo contendo: 25 ng de DNA genômico, 10 pmol de cada primer, 1 × buffer, 100 µM de desoxirribonucleotídeo trifosfato (Ludwig Biotec), 1,5 mM de MgCl₂, e 1.0 U Taq DNA polimerase (Promega) foram utilizados. Amplificação por PCR foi realizada em um termociclador (Biosystems) como se segue: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos (*bla_{SPM-1}*) ou 35 ciclos (*bla_{KPC}*) de desnaturação a 95°C por 1 min, de acordo com a temperatura de anelamento descrita anteriormente (**Tabela 1**) por 1 min e extensão a 72°C por 1 min e, então uma extensão final de 10 min a 72°C.

Os produtos de PCR foram corados com o corante azul (Jena Bioscience), submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão Tris/borato/EDTA (TBE), visualizados sob luz U.V e fotodocumentados. A cepa controle positivo para o gene *bla_{SPM-1}* (*P. aeruginosa* PSA319), foi fornecida pelo Laboratório Alerta,

Universidade Federal de São Paulo; a cepa controle positivo para o gene *bla*_{KPC} (*P. aeruginosa* P22A) foi obtida a partir da coleção de culturas do LBBM-UFPE e o DNA de ambas foi utilizado nas reações.

4.4.6 Determinação do perfil de susceptibilidade através do método de disco-difusão

Os isolados de *P.aeruginosa* foram cultivados em agar *Brain Heart Infusion* (BHI agar) e os inóculos bacterianos foram preparados em caldo TSB e ajustados até atingirem uma turbidez relativa a escala 0,5 de McFarland, que corresponde a aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC/mL). Com ajuda de um *swab* foram realizados “semeios em tapete” de forma que não houvesse falta de preenchimento na superfície das placas de Petri contendo agar Mueller-Hinton. Em seguida foram adicionados assepticamente os discos impregnados com os antimicrobianos. Sete discos de antimicrobianos foram usados: imipenem 10 µg (IPM), ticarcilina/ácido clavulânico 75/10 µg (TAC), ciprofloxacina 5 µg (CIP), aztreonam 30 µg (ATM), gentamicina 10 µg (GEN), amicacina 30 µg (AMI) e cefepime 30 µg (CPM). Os semeios foram mantidos em estufa bacteriológica por 18h a 37°C. O procedimento foi realizado de acordo com o CLSI 2017. Os testes foram realizados em duplicata (**Figura 8**).



Figura 8- Representação de placa com discos de antibióticos com semente em tapete de *P.aeruginosa* após 18h de incubação. Fonte: O autor. (2018)

4.4.7 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela técnica de microdiluição.

Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foram utilizados inóculos de *P. aeruginosa* em meio caldo Mueller-Hinton cátion ajustado (CMHCA), numa suspensão equivalente a escala de turbidez padrão 0,5 de McFarland, provenientes de cultura prévia em placa de Agar Cetrimide incubadas por 18 a 24 horas para obtenção de colônias características e livres de contaminação. Uma vez preparados e devidamente ajustados quanto à turbidez, os inóculos foram transferidos com a ajuda de uma pipeta multicanal para placas de 96 poços de fundo chato já contendo 100 microlitros de CMHCA onde foram realizadas as diluições dos antimicrobianos meropenem (MPM), amicacina e polimixina B (POL). A solução dos antimicrobianos foi previamente preparada para uma concentração de 1 mg/mL em H₂O milliQ. Foi realizada uma sequência de 8 microdiluições, cuja maior concentração correspondeu a quatro vezes o valor de concentração considerada como resistente para *P.aeruginosa* conforme o CLSI (2017). As concentrações

para cada primeiro poço da microdiluição foram de 32 $\mu\text{g/mL}$ para POL (resistente= 8 $\mu\text{g/mL}$), 256 $\mu\text{g/mL}$ para AMI (resistente= 64 $\mu\text{g/mL}$) e 32 $\mu\text{g/mL}$ para MPM (resistente= 8 $\mu\text{g/mL}$). O teste foi realizado em triplicata. Para a leitura, foram usados 20 μL de rezasurina em todos os poços, inclusive nos controles negativos que não continham inóculos bacterianos. A rezasurina é um corante indicador de viabilidade celular que tem coloração azul, os metabólitos provenientes do crescimento celular promovem a mudança na sua coloração apresentando uma tonalidade lilás/roseada (**Figura 9**).

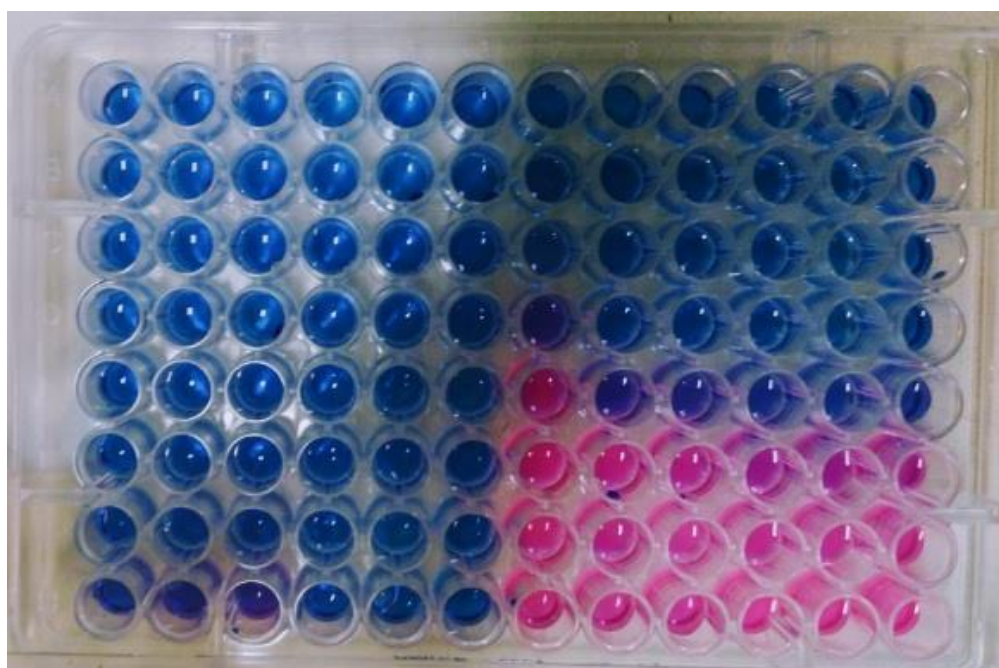


Figura 9- Representação de placa de 96 poços de microdiluição em *P.aeruginosa* revelada pela rezasurina após 20h de incubação. Fonte: o Autor (2018)

4.4.8 Inibição das bombas de efluxo com CCCP

A solução de CCCP (Sigma Aldrich) foi preparada a partir da substância em pó. A mesma foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) a fim de atingir uma concentração de 100 mM e mantida sob proteção da luz, de acordo com as instruções do fabricante. Para realizar a inibição do efluxo, a solução de CCCP foi adicionada a uma concentração final de 12,5 μM aos meios de cultura utilizados

para os testes de análise da inibição do efluxo: caldo LB, CMHCA e agar mueller Hinton (adaptado de Pournaras et al., 2005).

4.4.9 Síntese e caracterização dos pontos quânticos de CdTe

A síntese de QDs de Telureto de Cádmio (CdTe) funcionalizadas com o ácido 3-mercaptopossuccínico (MSA) já foi previamente descrita por CABRAL FILHO et al. 2016. A síntese foi realizada em duas etapas simultâneas: em uma primeira etapa, preparou-se uma solução de Cd^{2+} /MSA, formada a partir dos precursores de cádmio (CdCl_2 - 0,5 mmol) e do agente funcionalizante/estabilizante da reação, o ácido mercaptopossuccínico (MSA 0,6 mmol), em pH de aproximadamente 10,5, elevado com NaOH (2 M). Na segunda etapa, ocorre à redução do telúrio (0,1 mmol), por ação do agente redutor, o boridreto de sódio (NaBH_4 - 3 mmol), em atmosfera inerte e em pH básico através de ação do NaOH 2 M. Após a redução, o Te^{2-} é adicionado na solução de Cd^{2+} /MSA para formação das nanopartículas, permanecendo por 4 horas, sob agitação e aquecimento (90 - 100 °C), tendo uma proporção molar de 5:1:6 de Cd:Te:MSA.

Os QDs foram caracterizados opticamente, através da aquisição de espectros de absorção e emissão, utilizando, respectivamente, o espectrofotômetro UV-Vis 1800 (Shimadzu) e o espectrofluorímetro LS55 (PerkinElmer).

4.4.10 Conjugação de QDs ao Meropenem

O pH do QD (0,8 μM) foi ajustado para aproximadamente 5,5 utilizando MSA (4,9% m/v). Após o ajuste, foram adicionados o N-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC - 1,0 mM) e o sal de sódio de N-hidroxissulfosuccinimida (Sulfo-NHS - 1,2 mM) para promover a conjugação covalente entre o QD e o Meropenem trihidratado (MPM - 383.5 Daltons - [10 μM]) em uma razão de 1:500 QD:MPM. Após a adição do MPM o sistema QDs-MPM foi mantido sob agitação por 30 min (rotação a 360° - Minirotator) e em seguida armazenados em geladeira (4-8 °C) por 4 dias. Após a conjugação, os QD-MPM foram caracterizados por espectroscopias de emissão e absorção e foram comparados com os QDs sozinhos.

4.4.11 Preparação de inóculos bacterianos e incubação com os pontos quanticos de CdTe.

As colônias crescidas de *P. aeruginosa* P118 e ATCC Pa27853 em agar Cetrimide e livres de contaminação foram inoculadas em 2 mL de caldo Luria-Bertani (LB) e deixadas na estufa a 37 °C por 24 h.

Para todos os procedimentos de marcação das bactérias e avaliação da formação de biofilmes os conjugados foram bloqueados com TRIS Base de acordo com bloqueios realizados por Cabral Filho et al. 2016, com algumas modificações. Para isso, 500 µL de QDs-MPM foram bloqueados com 25 µL de TRIS (15 mg/mL).

Inicialmente para avaliar a efetividade do conjugado na formação de biofilme, foram utilizados 50 µL do inóculo de P118 e 50 µL de QDs-MPM, o sistema foi mantido sob agitação constante por 1 h a 25 °C, após o período de incubação foram realizadas duas lavagens através de centrifugação do sistema a 1400 xg por 5 min. Após a retirada do sobrenadante as bactérias foram diluídas em solução de NaCl (0,9 % m/v) e observadas sob microscópio de fluorescência convencional Leica (DMI4000B) com magnitude de 630x. A fluorescência foi observada excitando-se as amostras com um filtro do tipo passa banda (BP) a 560/40 nm e um filtro de emissão BP a 645/75 nm.

Para aumentar a produção de biofilme e verificar uma maior diferença entre as cepas resistentes e sensíveis foram adicionados às bactérias um excesso de MPM. Para isso, foram incubados 50 µL do inóculo P118 ou ATCC Pa27853 com 50 µL de MPM (1 mg/mL) e 50 µL do QD-MPM por 1 h a 25 °C, após o período de incubação foram seguidos os mesmos procedimentos de lavagens e ressuspensão das células feitas no procedimento anterior.

5 RESULTADOS

Alteração do Perfil de Susceptibilidade para Polimixina B em *Pseudomonas aeruginosa* Multidroga Resistente com a Utilização do Inibidor de Bomba Efluxo do Carbonil Cianeto-3-Clofenilhidrazona.

Valdemir V. Silva Júnior¹, Jussyêgles N.P Pereira¹, Jaílton L.C Lima¹, Paulo S. R. Araújo², Ana C. S. Lopes¹, Maria A. V. Maciel¹

¹Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

²Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz, Pernambuco, Brasil.

Resumo

A resistência antimicrobiana tem aumentado nos últimos anos e representam um problema de saúde pública. *P.aeruginosa* tem se destacado como um patógeno oportunista com elevados níveis de resistência. Isolados multidroga resistentes possuem inúmeros mecanismos de resistência, dentre os quais se destacam os sistemas de efluxo. Oito isolados clínicos de *P.aeruginosa* foram submetidos à pesquisa molecular dos genes *mexA* e *mexE*, relacionados às bombas de efluxo MexAB-OprM e MexEF-OprN, respectivamente. *Bla*_{GES}, *bla*_{SPM-1} e *bla*_{KPC}, codificantes de beta-lactamases, também foram pesquisados. Os testes de disco-difusão e microdiluição determinaram perfis de susceptibilidade aos fármacos. Os testes foram realizados na presença e na ausência do inibidor de efluxo Carbonil Cianeto-3-Clofenilhidrazona (CCCP) que demonstrou efeitos de redução da resistência aos antimicrobianos testados, sobretudo à polimixina B, cujas concentrações inibitórias mínimas diminuíram para todos os isolados. Um perfil de heterorresistência também sofreu inibição após a adição do CCCP. Verificamos que o inibidor de efluxo CCCP pode contribuir para a redução do fenótipo resistente em *P.aeruginosa* para alguns antimicrobianos, inclusive para a polimixina B. Portanto, o uso de inibidores de efluxo poderá ser adotado, após estudos mais aprimorados de redução de toxicidade, em sinergismo com os fármacos já usados na prática clínica com o intuito de restaurar a sua atividade antimicrobiana.

INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo não fermentador que tem sido frequentemente isolado de diversas amostras clínicas e está relacionado com várias infecções nos países em desenvolvimento. Esse patógeno oportunista tem apresentado perfis de resistência a diversos antimicrobianos nos últimos anos (TALEBI-TAHER et al., 2016). Sendo relacionado no grupo de patógenos multidroga resistentes (MDR) denominados pelo acrônimo “ESKAPE” formado por *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter* spp,

Pseudomonas aeruginosa e *Enterobacter* spp que são responsáveis por grande percentual da farmacoresistência dentre as bactérias e representam uma causa comum em infecções nos pacientes acometidos com desfecho clínico desfavorável(ESPOSITO; SIMONE, 2017).

A resistência bacteriana nos últimos anos tende a aumentar e a indústria farmacêutica não vem produzindo novos agentes antimicrobianos para substituir os existentes na prática clínica atual (CODJOE; DONKOR, 2017). *P. aeruginosa* possui inúmeros mecanismos responsáveis pela ineficácia dos antimicrobianos usados no tratamento de infecções, esses mecanismos podem ser intrínsecos ou adquiridos, que juntos tornam o patógeno um verdadeiro problema de saúde pública (NEVES et al., 2011). Dentre os mecanismos adquiridos destacam-se as enzimas beta-lactamases de espectro estendido (SILVA JÚNIOR et al., 2017), as metalo-beta lactamases(MAGALHÃES et al., 2005) e as enzimas KPC (JÁCOME et al., 2012) que conferem resistência a todos os antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos que são considerados de última escolha, restando apenas as polimixinas (Polimixina B e colistina) como opção terapêutica (PICÃO; GALES, 2007).

Com relação aos mecanismos intrínsecos, destacamos principalmente os sistemas de efluxo multidrogas e a redução da permeabilidade da membrana externa da parede celular (redução da expressão de porinas) (POOLE, 2011).

Os sistemas de bombas de efluxo são responsáveis pela expulsão de múltiplos fármacos, diminuindo a concentração intracelular do antimicrobiano e tornando-o ineficaz. Em *P. aeruginosa* os principais sistemas de efluxo pertencem à família RND (Resistance-Nodulation-Division) composto por um conjunto tripartite de proteínas associadas que unidas transpõem a membrana celular e parede celular da bactéria, sendo capaz de realizar a extrusão de drogas, metais pesados, detergentes e outras substâncias nocivas que estejam tanto no citosol quanto no periplasma da célula (NIKAIDO; TAKATSUKA, 2009).

A fonte de energia para o funcionamento das bombas de efluxo tipo RND e consequente expulsão de moléculas nocivas é a força próton motriz na qual há uma troca de íons H^+ para o interior da célula por uma molécula que deseja expulsar(PIDDOCK, 2006).

O sistema MeXAB-OprM é um dos tipos bombas de efluxo presentes em *P. aeruginosa* mais estudados, onde MeXB é a proteína mais interna, MeXA é a proteína ligante e OprM é a porina externa do sistema tripartite(ASKOURA et al., 2011).Sabemos que há uma escassez de antimicrobianos para o combate de infecções por micro-organismo MDR, dentre as alternativas que vem sendo estudadas as moléculas conhecidas como inibidores de bomba de efluxo vêm ganhando destaque(LAMERS; CAVALLARI; BURROWS, 2013).

O carbonil cianeto-3-clorofenilhidrazonaCCCP é um desacoplador da força próton motriz que realiza um sequestro dos íons H^+ requeridos para o funcionamento do sistema de efluxo, essa ação pode restaurar a atividade antimicrobiana uma vez que eleva a concentração intracelular do fármaco.(IKONOMIDIS et al., 2008)(MOMBESHORA; MUKANGANYAMA, 2017)

Diante disso, o presente estudo avaliou o CCCP como molécula inibidora do sistema de efluxo para verificar as alterações no perfil de susceptibilidade em isolados de *P. aeruginosa* multidroga resistentes portadores dos genes *mexA* e *mexE*, além de *bla*_{GES}, *bla*_{SPM-1} e *bla*_{KPC}.

METODOLOGIA

Isolados bacterianos

Oito isolados de *P.aeruginosa* MDR foram selecionados para o estudo. Os mesmos foram provenientes de amostras clínicas de três hospitais localizados em Recife, Brasil e coletados entre 2006 e 2017. A identificação foi realizada tanto pelo sistema automatizado VITEK® (bioMérieux, France) quanto por técnicas microbiológicas padronizadas (WINN et al, 2008). Os perfis de susceptibilidade por disco difusão e microdiluição foram obtidos de acordo como o CLSI 2017. As cepas ATCC Pa27853 e Pa01 foram usadas como controle. As bactérias permaneceram estocadas em caldo Triptona de soja (TSB) com glicerol a 20% a -20°C para análises subsequentes.

Extração de DNA bacteriano

Os isolados bacterianos foram incubados a uma temperatura de 37° entre 18 a 24 horas em tubos contendo caldo Luria Bertani (LB). Após o crescimento, o processo de extração de DNA foi realizado usando o Brazol (LGC-Biotecnologia, Brasil) segundo as instruções do fabricante. O DNA extraído foi ressuspenso em solução de Tris-ácido etileno diaminotetraacético (EDTA) e quantificado por espectrofotometria no aparelho NanoDrop 2000 a um comprimento de onda de 260 nm.

Reação em cadeia da polimerase para os genes *mexA* e *mexE*

A Reação em cadeia da polimerase (PCR) para pesquisa dos genes codificantes das proteínas ligadoras MexAe MexE dos sistemas de bomba de efluxo MexAB-OprM e MexEF-OprN foi realizada utilizando os primers dispostos na **tabela 1** de acordo Ozer et al, 2012.(OZER et al., 2012) A reação foi preparada para um volume total de 25µL por tubo, contendo 10ng de DNA genômico, 10 pmol dos "primes", Tampão 1x (concentração final), 200 µM do dNTPs (Ludwig Biotec), 2 mM de MgCl₂ e 1U de *Taq* DNA polimerase (Promega, USA).

A reação foi levada ao termociclador (Biosystems) e seguiram-se os ciclos: aquecimento prévio (94°C por 1 min), 35 ciclos (94°C por 1min- desnaturação), 45 segundos na temperatura de anelamento específica para cada "primer" (**tabela 1**) e 45 segundos a 72°C de extensão. A extensão final será de 10 min a 72°C, após o termino dos 35 ciclos. Cada reação conteve o DNA das cepas controle *P.aeruginosa* PAO1 e Pa27853.

Tabela 1. Primers usados na pesquisa dos genes de efluxo *mexA* e *mexE* e de beta-lactamases *bla_{GES}*, *bla_{KPC}*, *bla_{SPM-1}*.

Gene	Sequência (5´ - 3´) (F- Forward, R- Reverse)	Temperatura de anelamento/ Referência
<i>mexA</i>	(F) CGACCAGGCCGTGAGCAAGCAC (R) GGAGACCTTCGCCGCGTTGTCGC	71°C /Ozer et al, 2012
<i>mexE</i>	(F) CCAGGACCAGCACGAACTTCTTGC (R) CGACAACGCCAAGGGCGAGTTCAC	69°C/ Ozer et al, 2012
<i>bla_{GES}</i>	(F) ATGCGCTTCATTACGCAC (R) CTATTTGTCCGTGCTCAGG	55°C/ Wang et al, 2006
<i>bla_{KPC}</i>	(F) TGTCAGTGTATCGCCGTC (R) CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	58°C/ Yigit et al, 2001
<i>bla_{SPM-1}</i>	(F) CCTACAATCTAACGGCGACC (R) TCGCCGTGTCCAGGTATAAC	40°C/ Gales et al, 2003

PCR para gene *bla_{GES}*

O gene *bla_{GES}* foi identificado usando primers específicos (tabela 1). As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µL por tubo, compreendendo 10 ng de DNA genômico, 10 pmol de cada "primer", tampão 1X, 200 µM de desoxirribonucleotídeo trifosfato (Ludwig Biotec), 1,5 mM de MgCl₂ e 2U Taq DNA polimerase (Promega). Os parâmetros do ciclo foram os seguintes: 93°C por 3 min, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 93°C por 1 min, anelamento a 55°C por 1 min; extensão a 72°C por 1 min, e uma extensão final a 72°C por 7 min. Os produtos de reação em cadeia da polimerase (PCR) foram colocados em gel de agarose a 1% para eletroforese. Foi utilizado um marcador de 100 pb (Amresco) como o peso molecular padrão. Após a eletroforese, o fragmento correspondente ao gene foi visualizado sob luz ultravioleta e foi devidamente fotodocumentado.

PCR para os genes *bla_{KPC}*, *bla_{SPM-1}*

Os genes para beta-lactamases *bla_{SPM-1}* e *bla_{KPC}* foram investigados utilizando “primers” específicos. Para cada gene, as reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 25 µL por tubo: Para os genes *bla_{SPM-1}* e *bla_{KPC}*, 25ng de DNA genômico, 10 pmol de “primer”, 1 × buffer, 100µM de desoxirribonucleotídeo trifosfato (Ludwig Biotec), 1,5 mm de MgCl₂, e 1.0 U Taq DNA polimerase (Promega) foram utilizados. Amplificação por PCR foi realizada em um termociclador (Biosystems) como se segue: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos (*bla_{SPM-1}*) ou 35 ciclos (*bla_{KPC}*) de desnaturação a 95°C por 1 min, de acordo com a temperatura de anelamento descrita anteriormente (**tabela 1**) por 1 min, e extensão a 72°C por 1 min e, então uma extensão final de 10 min a 72°C.

Os produtos de PCR foram corados com o corante azul (Jena Bioscience), submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão Tris/borato/EDTA, visualizados sob luz ultravioleta, e fotodocumentados. Cepa controle positivo para o gene *bla_{SPM-1}* (*P. aeruginosa* PSA319), foi fornecida pelo Laboratório Alerta, Universidade Federal de São Paulo. Uma cepa controle positivo para o gene *bla_{KPC}* (*P. aeruginosa* P22A) foi obtida a partir da coleção de culturas do Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco.

Teste de susceptibilidade *in vitro*

Para o método de disco-difusão utilizamos sete antimicrobianos: imipenem 10 µg (IPM), ticarcilina/ácido clavulânico 75/10 µg (TAC), ciprofloxacina 5 µg (CIP), aztreonam 30 µg (ATM), gentamicina 10 µg (GEN), ampicilina 30 µg (AMI) e cefepime 30 µg (CPM). O procedimento foi realizado de acordo com o CLSI 2017 na ausência e na presença de CCCP incorporado ao meio de cultura ágar Mueller-Hinton numa concentração final de 12,5 µM. O teste foi realizado em duplicata.

Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foram utilizados inóculos de *P.aeruginosa* em meio caldo Mueller-Hinton cátion ajustado (CMHCA) suspensão equivalente a escala de turbidez padrão 0,5 de McFarland, provenientes de cultura prévia em placa de Agar Cetrimide incubadas por 18 a 24 horas para obtenção de colônias características e livres de contaminação. Uma vez preparados, os inóculos foram transferidos para placas de 96 poços de fundo chato já contendo 100 microlitros de CMHCA onde foram realizadas as diluições dos antimicrobianos meropenem, ampicilina e polimixina B.O mesmo foi realizado com a presença de CCCP no meio cultura a uma concentração final de 12,5µM(POURNARAS et al., 2005).

Foi realizada uma sequência de 8 microdiluições, cuja maior concentração correspondeu a quatro vezes o valor de concentração considerada como resistente para *P.aeruginosa* conforme o Clinical and Laboratory Standards Institute 2017(CLSI, 2017).

O procedimento foi realizado em triplicata e para leitura do teste de microdiluição foi utilizada a rezasurina, um corante indicador de viabilidade celular.

RESULTADOS

Os isolados de *P.aeruginosa* MDR selecionados para o estudo apresentavam resistência a três ou mais classes de antimicrobianos e foram provenientes diferentes setores de três hospitais em Recife, Brasil (**tabela 2**).

Tabela 2. Características dos isolados *P. aeruginosa* MDR em relação ao tipo de amostra clínica, departamento de internação, gene identificado e perfil de resistência.

Número do isolado/gene identificado	Setor de internação	Tipo de amostra clínica	Perfil de resistência antimicrobiana por disco-difusão
P118UH/ <i>bla</i> _{GES} , <i>mexA</i> , <i>mexE</i>	Clínica médica	Fragmento de pé direito	CPM, IMP, ATM, GEN, AMI, CIP, TAC
P868CH/ <i>bla</i> _{KPC} , <i>mexA</i> , <i>mexE</i>	Unidade de terapia intensiva	Sangue	CPM, IMP, ATM, GEN, AMI, CIP, TAC
P1398CH/ <i>bla</i> _{KPC} , <i>mexA</i> , <i>mexE</i>	Unidade de terapia intensiva	Secreção traqueal	CPM, IMP, ATM, GEN, AMI, CIP, TAC
P8TH/ <i>bla</i> _{GES} , <i>mexA</i> , <i>mexE</i>	Unidade de terapia intensiva	Secreção traqueal	CPM, IMP, ATM, GEN, AMI, CIP, TAC
P16TH/ <i>mexA</i> , <i>mexE</i>	Unidade de terapia intensiva	Sangue	CPM, ATM, GEN, AMI, CIP, TAC
P31TH/ <i>mexA</i> , <i>mexE</i>	Unidade de terapia intensiva	Secreção traqueal	ATM, GEN, AMI, CIP, TAC
P123TH/ <i>bla</i> _{GES} , <i>mexA</i> , <i>mexE</i>	Centro cirúrgico	Ferida cirúrgica	CPM, IMP, ATM, GEN, AMI, CIP, TAC
P277TH/ <i>bla</i> _{SPM-1} , <i>mexA</i> , <i>mexE</i>	Unidade de terapia intensiva	Ponta de catéter venoso central	CPM, IMP, ATM, GEN, AMI, CIP, TAC

*bla*_{GES}: Beta-lactamase GES; *bla*_{SPM-1}: metalo beta-lactamase SPM-1; *bla*_{KPC}: beta-lactamase KPC; **UH**: Hospital Universitário; **CH**: Hospital Oncológico; **TH**: Hospital Terciário; **CPM**: cefepime; **IMP**: imipenem; **CIP**: ciprofloxacina; **Int.**: intermediário; **ATM**: aztreonam; **TAC**: ticarcilina/clavulanato; **GEN**: gentamicina; **AMI**: amicacina;

A maioria dos isolados foi proveniente do setor de UTI (6/8) e o tipo de amostra mais prevalente foi a secreção traqueal (3/8) seguido de amostras de sangue (2/8).

Encontramos os genes *mexA* e *mexE* simultaneamente em todos os isolados. O gene *bla_{KPC}* foi detectado em ambos os isolados provenientes do hospital oncológico. Apenas um único isolado do hospital terciário carregava o gene *bla_{SPM-1}*, por outro lado o gene *bla_{GES}* foi detectado em três isolados, sendo oriundos de dois hospitais diferentes: hospital universitário (P118UH) e hospital terciário (P8TH e P123TH) não houve simultaneidade dos genes codificantes de beta-lactamases numa mesma bactéria.

Dois isolados bacterianos apresentaram aumento do halo de inibição quando submetidos a presença do CCCP numa concentração de apenas 12,5µM. No isolado P118UH ocorreu uma alteração de 12 mm para 22 mm no halo de inibição do IMP. Dois antimicrobianos tiveram o diâmetro do halo afetado no isolado P277TH: TAC (0mm para 10mm) e ATM (10mm para 18mm). Na análise do resultado do antibiograma do isolado P16TH foram visualizadas colônias no interior do halo de inibição para CPM, ATM, GEN e CIP, e as mesmas desapareceram após a adição do CCCP.

A concentração de 12,5µM de CCCP associado a diferentes antimicrobianos também foi usada para testes de microdiluição. Houve alteração das CIMs para AMI em dois isolados. P123TH (128 µg/mL para 64 µg/mL) e P31TH (>256 µg/mL para 32 µg/mL). Para o meropenem (MPM), P8TH alterou a CIM de 32 µg/mL para 16 µg/mL, mesmo carregando o gene *bla_{GES}*; P16TH aumentou a CIM de 8 µg/mL para 16 µg/mL após a adição do inibidor.

Para polimixina B (POL) todos os isolados tiveram as CIMs reduzidas na presença 12,5µM de CCCP (**tabela 3**).

Tabela 3. Resultados das CIMs para polimixina B em isolados de *P.aeruginosa* MDR na ausência e na presença de CCCP.

Número do isolado	CIM (µg/mL)/ Perfil de susceptibilidade antimicrobiana	CIM (µg/mL) + CCCP 12,5µM / Perfil de susceptibilidade antimicrobiana
P118UH	4/ Intermediário	2/ Susceptível
P868CH	4/ Intermediário	1 / Susceptível
P1398CH	4/ Intermediário	2 / Susceptível
P8TH	4/ Intermediário	2 / Susceptível
P16TH	8/ Resistente	4/ Intermediário
P31TH	8/ Resistente	4/ Intermediário
P123TH	8/ Resistente	4/ Intermediário
P277TH	4/Intermediário	2 / Susceptível

DISCUSSÃO

Os efeitos causados pela inibição dos sistemas de efluxo nas bactérias Gram-negativas vem sendo cada vez mais estudados com a pretensão de poderem ser utilizados no tratamento das infecções com linhagens bacterianas MDR em sinergia com os antimicrobianos já utilizados na terapêutica racional ou empírica (SINHA et al., 2017). O CCCP já obteve resultados promissores na alteração do perfil de resistência frente a antimicrobianos importantes, como por exemplo o meropenem (POURNARAS et al., 2005).

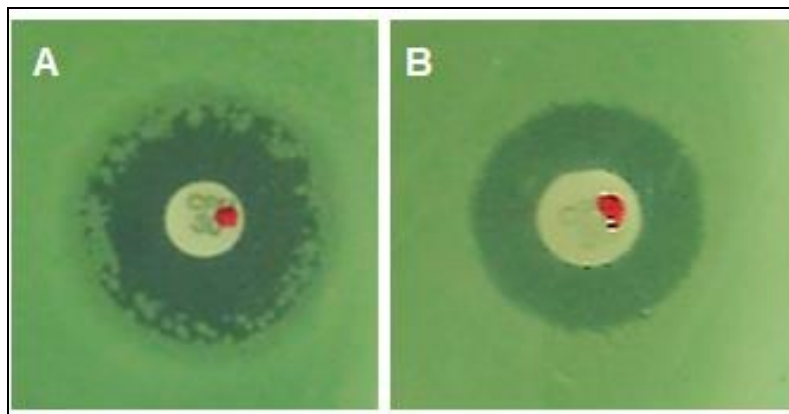
Em nosso estudo, encontramos os genes *mexA* e *mexE* simultaneamente em todos os isolados analisados, demonstrando integridade na composição das bombas de efluxo MexAB-OprM e MexEF-OprN, uma vez que esses genes codificam a proteína ligante do sistema tripartite, corroborando com outros achados (ASKOURA et al., 2011)(ADABI et al., 2015; TALEBI-TAHER et al., 2016).

Verificamos alteração no fenótipo do perfil de susceptibilidade detectado através do teste de disco-difusão para o IMP com a utilização do CCCP. O isolado P118UH (*bla*_{GES} positivo) teve um aumento de 10mm no diâmetro halo de inibição para o IMP tornando-se sensível ao fármaco na presença deste inibidor. Em 2016, Talebi-taher et al, descreveram reversão do perfil de susceptibilidade para o IMP em 4% dos isolados de *P.aeruginosa* coletadas de um centro de queimados no Iran. No entanto, a presença do gene *bla*_{GES} pode conferir aumento na atividade hidrolítica da enzima passando a degradar carbapenêmicos (BONTRON; POIREL; NORDMANN, 2015).

Outra alteração no perfil de susceptibilidade foi observada no isolado P277TH para o ATM, no qual o isolado que antes era resistente a este fármaco apresentou perfil intermediário após adição do CCCP. Detectamos o gene *bla*_{SPM-1}, que pode justificar a não alteração tanto do IMP (na disco-difusão) quanto para o MPM (na microdiluição) (MAGALHÃES et al., 2005).

Durante a realização do antibiograma do isolado P16TH colônias cresceram no interior dos halos de inibição para CPM, ATM, GEN e CIP. Após à adição do CCCP, essas colônias desapareceram (**figura 1**). Mei et al., 2015 detectaram *P.aeruginosa* heterorresistentes a IMP e verificaram altos níveis de superexpressão de MexAB do isolado resistente quando comparado ao isolado sensível. O fenômeno da heterorresistência é relatado desde 1947 em *Haemophilus influenza*, e ainda necessita de estudos adicionais para ser melhor elucidado (ALEXANDER; LEIDY, 1947; EL-HALFAWY; VALVANO, 2015).

Figura 1- Ocorrência de heterorresistência para CPM no isolado P16TH e ausência do fenômeno após adição do CCCP. Notar a presença de colônias no interior do halo de inibição (A). Desaparecimento das colônias após a adição do CCCP (B).



Na microdiluição os isolados P123TH e P31TH apresentaram diminuição das CIMs para AMI, porém apenas P31TH demonstrou alteração no perfil de susceptibilidade de resistente para intermediário. Dados adicionais sobre a presença de enzimas modificadoras de aminoglisídeos ou RNA metiltransferases poderiam esclarecer mais acerca desse achado (MICHALSKA et al., 2014).

Dois isolados tiveram alterações inversas nas CIMs para MPM. P8TH-1 (*bla_{GES}* positivo) diminuiu sua CIM, porém manteve o perfil resistente. Por outro lado, P16TH aumentou a CIM. O aumento da CIM de 8 µg/mL para 16 µg/mL já foi constatado por Pouranaras et al, 2005 em isolado não produtores de metallo-beta lactamases. Isso pode ser explicado pela diminuição da expressão do gene *OprD*, que está relacionada a resistência aos carbapenêmicos (ARABESTANI et al, 2015).

A polimixina B é um antimicrobiano polipeptídico com potente ação contra as Gram-negativas. No entanto, devido sua toxicidade (principalmente a nefrotoxicidade) teve uma restrição no seu uso por volta da década de 1970 (MENDES; BURDMANN, 2009). O aumento da resistência antimicrobiana tem levado ao retorno do uso da polimixina B ou da colistina para o tratamento de infecções por Gram-negativos MDR (ESPOSITO; SIMONE, 2017).

Nosso estudo demonstrou uma redução da CIM para todos isolados de *P.aeruginosa* analisados pela microdiluição. Recentemente esse efeito foi observado com a colistina em enterobacterias. CCCP interagiu com a colistina, alterando a CIM com uma média de 193.12 vezes (SEKYERE; AMOAKO, 2017). No entanto, nosso estudo apresentou diminuição média da CIM de duas vezes. Esse achado merece uma pesquisa mais aprofundada para elucidar a dinâmica da expressão dos genes relacionados aos sistemas de efluxo e quanto a despolarização da membrana plasmática bacteriana pelo CCCP (NI et al, 2016; PARK; KO, 2015). Segundo Mohamed et al, 2016 os efeitos da colistina na parede celular são similares aos causados pelos beta-lactâmicos (MOHAMED et al., 2016).

Concluimos que CCCP apresentou ações diversas nos isolados estudados, ressaltando a diminuição do fenótipo resistente para fármacos de diferentes classes. Apesar de ser uma molécula tóxica, quimicamente pode-se formular um composto derivado ou semelhante para que aja possibilidade de uso clínico afim de restaurar a ação de antimicrobianos já existente. A inibição dos

sistemas de efluxo em *P.aeruginosa* pode estar relacionada com a redução da heterorresistência e com a reversibilidade do perfil polimixina B resistente, no entanto, necessitam ser efetuados estudos adicionais para melhor elucidar esses fenômenos.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer a equipe de microbiologia nos hospitais participantes por sua assistência no isolamento e classificação de amostras clínicas e a equipe do Comitê Consultivo de Práticas de Controle de Infecção (ICPAC) pela ajuda na coleta dos dados clínicos e terapêuticos dos pacientes.

REFERÊNCIAS

ADABI, M. et al. Spread of Efflux Pump Overexpressing-Mediated Fluoroquinolone Resistance and Multidrug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by using an Efflux Pump Inhibitor. **Infection and Chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 98–104, 2015.

ALEXANDER, B. Y. H. E.; LEIDY, G. mode of action of streptomycin on type b *H. influenzae*. **Journal of experimental medicine**, v. 85, p. 607–621, 1947.

ARABESTANI, M.R, et al Expression of Efflux Pump MexAB-OprM and OprD of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Clinical Samples using qRT-PCR **Arquivos of Iranian Medicine**, v. 18, n. 2, p. 102–108, 2015.

ASKOURA, M. et al. Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. **Libyan Journal of Medicine**, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2011.

BONTRON, S.; POIREL, L.; NORDMANN, P. In vitro prediction of the evolution of GES-1 β -lactamase hydrolytic activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 3, p. 1664–1670, 2015.

CLSI (**Clinical and Laboratory Standards Institute**) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; CLSI supplement M100. Wayne, P.A., v.27, n.1, janeiro 2017.

CODJOE, F.; DONKOR, E. Carbapenem Resistance: A Review. **Medical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 1, 2017.

EL-HALFAWY, O. M.; VALVANO, M. A. Antimicrobial heteroresistance: An emerging field in need of clarity. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 1, p. 191–207, 2015.

ESPOSITO, S.; SIMONE, G. DE. Update on the main MDR pathogens : prevalence and treatment options. **Le Infezioni in Medicina**, v. 4, p. 301–310, 2017.

GALES, A. C. et al. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 699–702, 2003.

IKONOMIDIS, A. et al. Effect of the proton motive force inhibitor carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone (CCCP) on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 298–302, 2008.

JÁCOME, P. R. L. D. A. et al. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 9, p. 4990, set. 2012.

LAMERS, R. P.; CAVALLARI, J. F.; BURROWS, L. L. The efflux inhibitor phenylalanine-arginine beta-naphthylamide (PA β N) permeabilizes the outer membrane of gram-negative bacteria. **PloS one**, v. 8, n. 3, jan. 2013.

MAGALHÃES, V. et al. Metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in hospitals in Recife , pe , brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 123–125, 2005.

MEI, S. et al. Research of the heteroresistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 4, p. 6129–6132, 2015.

MENDES, C. A. C.; BURDMANN, E. A. Polimixinas - revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. **Rev Assoc Med Bras**, v. 55, n. 6, p. 752–759, 2009.

MICHALSKA, A. D. et al. Prevalence of resistance to aminoglycosides and fluoroquinolones among *Pseudomonas aeruginosa* strains in a University Hospital in Northeastern Poland. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1455–1458, 2014.

MOHAMED, Y. F. et al. Membrane permeabilization of colistin toward pan-drug resistant gram-negative isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 381–388, 2016.

MOMBESHORA, M.; MUKANGANYAMA, S. Development of an accumulation assay and evaluation of the effects of efflux pump inhibitors on the retention of chlorhexidine digluconate in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **BMC Research Notes**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2017.

NEVES, P. R. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 409–420, ago. 2011.

NI, W., et al. Effects of efflux pump inhibitors on Resistance in Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 3215–3218, 2016.

NIKAIDO, H.; TAKATSUKA, Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1794, n. 5, p. 769–81, maio 2009.

OZER, B. et al. Efflux pump genes and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lower respiratory tract infections acquired in an intensive care unit. **The Journal of Antibiotics**, v. 65, n. 1, p. 9–13, 2012.

PARK, Y. K.; KO, K. S. Effect of carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) on killing *Acinetobacter baumannii* by colistin. **Journal of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 53–59, 2015.

PICÃO, R. C.; GALES, A. C. Beta-Lactamases de Espectro Ampliado (ESBL) em *Pseudomonas aeruginosa*: Pesadelo ou só Imaginação? **Prática Hospitalar INFECTOLOGIA**, n. 49, p. 79–84, 2007.

PIDDOCK, L. J. V. Multidrug-resistance efflux pumps — not just for resistance. **Nature Publishing Group**, v. 4, n. August, p. 629–636, 2006.

POOLE, K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. **Frontiers in microbiology**, v. 2, p. 65, jan. 2011.

POURNARAS, S. et al. Spread of efflux pump-overexpressing, non-metallo- β -lactamase-producing, meropenem-resistant but ceftazidime-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* in a region with blaVIMendemicity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 761–764, 2005.

SEKYERE, J. O.; AMOAKO, D. G. Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine (CCCP) reverses resistance to colistin, but not to Carbapenems and tigecycline in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. FEB, 2017

SILVA JÚNIOR, V. V. DA et al. Detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* harboring bla GES-1 and bla GES-11 in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 6, p. 764–768, 2017.

SINHA, D. et al. Synergistic efficacy of Bisbenzimidazole and Carbonyl Cyanide 3-Chlorophenylhydrazone combination against MDR bacterial strains. **Scientific Reports**, v. 7, n. October 2016, p. 1–14, 2017.

TALEBI-TAHER, M. et al. Role of efflux pump inhibitor in decreasing antibiotic cross-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in a burn hospital in Iran. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, n. 6, p. 600–604, 2016.

Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing betalactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. 2001;45(4): 1151-61.

WANG, C. et al. *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum beta-lactamase. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 1261–2, jun. 2006.

Winn, J. R. W. C., Allen, S. D., Janda, W. M., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P. C. & Woods, G. (2008). As Enterobacteriaceae e bacilos Gram-negativos não-fermentadores. In **Koneman Diagnóstico, Microbiológico, Texto E Atlas Colorido**, 6th edn, pp. 208–386. Brazil: Guanabara Koogan.

Avaliação do efeito de carbonil cianeto-3-clorofenilhidrazona na inibição de bombas de efluxo e formação de biofilme em *Pseudomonas aeruginosa* através de pontos quânticos conjugados ao meropenem

Valdemir V. Silva Jr.¹, Bruno L. Raposo², Ana C. S. Lopes¹, Adriana Fontes², Paulo E. Cabral Filho^{2*}, Maria A. V. Maciel^{1*}

¹ Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

² Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

***Autores correspondentes:** Paulo E. Cabral Filho, Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Centro de Biociências, UFPE, 50670-901 Recife, PE, Brasil. e-mail: pauloeuzebio03@gmail.com; Maria A. V. Maciel, Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, UFPE, 50670-901 Recife, PE, Brasil. e-mail: amelia57@gmail.com.

RESUMO

Infecções hospitalares por *Pseudomonas aeruginosa* multidroga resistentes são um problema mundial de saúde pública. A resistência aos carbapenêmicos tem aumentado nos últimos anos e tanto os sistemas de efluxo quanto a formação de biofilme são mecanismos relacionados à ineficácia desses fármacos. O presente estudo se propôs a avaliar os efeitos do inibidor de bombas de efluxo carbonil cianeto-3-clorofenilhidrazona em cepas de *P.aeruginosa* através de pontos quânticos (*Quantum dots*) conjugados a Meropenem (QD-MPM). Para isso, foram utilizados um isolado bacteriano resistente e uma cepa controle ATCC Pa27853, os quais foram incubados com QD-MPM. O isolado resistente foi submetido ao mesmo processo com adição prévia do inibidor de bomba de efluxo ao meio de cultura. A pesquisa molecular dos genes *mexA* e *mexE* foi realizada em ambos os isolados. As imagens por microscopia de fluorescência evidenciaram marcação das bactérias tanto sensíveis quanto resistentes, sendo que apenas o isolado resistente apresentou aglomerados celulares sugestivos da formação de biofilme. A adição do inibidor de efluxo alterou o perfil de marcação do isolado resistente, sendo observada a ausência de aglomerados, indicando a não formação do biofilme. Este estudo verificou a eficiência da conjugação de pontos quânticos ao meropenem e, além disso, apresenta-os como uma nova ferramenta para o estudo da inibição tanto dos sistemas de efluxo como da formação de biofilme em *P.aeruginosa*, tendo como perspectivas um futuro uso de moléculas inibidoras de efluxo combinadas com antimicrobianos para melhoria de sua eficácia contra isolados multidroga resistentes.

Palavras Chave: *Pseudomonas aeruginosa*, bombas de efluxo, biofilme, pontos quânticos, Meropenem.

INTRODUÇÃO

Infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS) são um problema impactante ao nível de saúde pública e representam uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes hospitalizados. Diversas espécies bacterianas tem apresentado redução de susceptibilidade a uma ampla variedade de antimicrobianos. Dentre essas espécies, destacam-se um grupo de patógenos denominados pelo acrônimo “ESKAPE”, que inclui *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp (ESPOSITO; SIMONE, 2017).

Os carbapenêmicos, em especial o imipenem (IMP) e o meropenem (MPM) são fármacos bastante prescritos no tratamento de infecções por *P. aeruginosa* multidroga resistentes (MDR), devido ao seu amplo espectro antibacteriano (PAN et al., 2016). A Superexpressão dos sistemas de efluxo em *P. aeruginosa* pode ocorrer quando há um uso de carbapenêmicos durante o tratamento da infecção, isso é mais frequente com MPM do que o IMP e representa um importante mecanismo de resistência contra esses fármacos (CODJOE; DONKOR, 2017); (PAN et al., 2016).

A formação de biofilme em *P.aeruginosa* também é um importante mecanismo de virulência e resistência, no qual as bactérias tem a possibilidade de se protegerem da ação dos antimicrobianos (SKARIYACHAN et al., 2018). Esse patógeno é capaz de formar um aglomerado celular no qual as bactérias nele inseridas possuem características particulares de comportamento e comunicação, constituindo o “*Quorum sensing*” (FONG et al., 2018).

Os inibidores de efluxo vêm sendo amplamente estudados com o intuito de reestabelecer o efeito antimicrobiano de diferentes fármacos, em isolados MDR, sendo apontados como novos potenciais agentes sinérgicos dos antimicrobianos administrados na prática clínica (SEKYERE; AMOAKO, 2017). Dentre os inibidores de efluxo mais estudados está o carbonil cianeto-3-clorofenilhidrazona (CCCP) que é um desacoplador da força próton motriz (baseada num fluxo de íons H^+ através da membrana citoplasmática e da membrana externa da parede celular bacteriana) necessária para o funcionamento dos sistemas de efluxo. Sendo assim, a ação do CCCP pode restaurar a atividade antimicrobiana uma vez que eleva a concentração intracelular do fármaco (IKONOMIDIS et al., 2008; MOMBESHORA; MUKANGANYAMA, 2017). Entretanto, o mecanismo de ação desses inibidores ao nível celular e molecular ainda é pouco conhecido, podendo tornar-se melhor compreendido através do uso de técnicas baseadas em fluorescência.

Os pontos quânticos ou *Quantum dots* (QDs) são nanocristais fluorescentes de semicondutores com propriedades ópticas únicas; como largo espectro de absorção, uma alta resistência a fotodegradação e superfície ativa para bioconjugações a proteínas e até mesmo a fármacos (GALDIERO et al., 2016) (FONTES et al, 2012) (KUMAR; SHARMA; DEEP, 2014). Esses nanocristais conjugados a biomoléculas vêm sendo utilizados com diversas finalidades na nanomedicina como para identificação de moléculas-alvo em células e tecidos, investigação de processos e eventos celulares em tempo real, além de serem bastante utilizados para o entendimento da biologia celular de diversas patologias (CABRAL FILHO et al., 2016; MOCAN et al., 2017). Além disso, os QDs podem ser conjugados a antimicrobianos na tentativa de estudar o perfil da interação destas moléculas com bactérias, afim de se entender melhor os mecanismos de resistência, bem como a ação das bombas de efluxo em isolados clínicos multidroga resistentes.

Dentro deste contexto, o objetivo do presente estudo foi conjugar QDs ao meropenem e avaliar o perfil de marcação na cepa de *P. aeruginosa* sensível (ATCC Pa27853) e em um isolado MDR resistente, além de avaliar os efeitos do inibidor de bombas de efluxo carbonil cianeto-3-clorofenilhidrazona sobre o isolado de *P.aeruginosa* resistente. Até onde sabemos, este é o primeiro trabalho que conjugou QDs de Telureto de Cadmio (CdTe) ao Meropenem para estudar o efeito de inibidores de bombas de efluxo.

METODOLOGIA

Isolados bacterianos

O isolado de *P.aeruginosa* (P118) utilizado neste estudo proveniente do setor de clínica médica de um hospital universitário em Recife, Brasil, coletado em 2012 e apresenta um perfil multidroga resistente (MDR), que inclui o MPM. A cepa de *P.aeruginosa* ATCC Pa27853, conhecidamente sensível ao MPM foi utilizada como controle. As bactérias foram mantidas em estoque congelado a -20°C em caldo Triptona de soja (TSB) com glicerol a 20% no laboratório de bacteriologia e biologia molecular (LBBM), departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco..

Extração de DNA bacteriano e reação em cadeia da polimerase (PCR) para *mexA* e *mexE*

Os isolados bacterianos foram incubados a uma temperatura de 37° entre 18 a 24 horas em tubos contendo caldo LB (Luria Bertani). Após o crescimento, o processo de extração de DNA foi realizado usando o Brazol (LGC-Biotecnologia, Brasil) segundo as instruções do fabricante. O DNA extraído foi ressuspenso em solução de Tris-ácido etileno diaminotetraacético (EDTA) e quantificado por espectrofotometria no aparelho *NanoDrop* 2000 a um comprimento de onda de 260 nm.

A Reação em cadeia da polimerase (PCR) para pesquisa dos genes *mexA* e *mexE*, que representam os sistemas de bomba de efluxo MexAB-OprM e MexEF-OprN foi realizada utilizando os primers: CGACCAGGCCGTGAGCAAGCAC (F) e GGAGACCTTCGCCGCGTTGTTCGC (R) para *mexA*; CCAGGACCAGCACGAACCTTCTTGC (F) e CGACAACGCCAAGGGCGAGTTCAC (R) para *mexE* de acordo Ozer et al, 2011. A reação foi preparada para um volume total de 25µL por tubo, contendo 10ng de DNA genômico, 10 pmol dos "primes", Tampão 1x (concentração final), 200 µM do dNTPs (Ludwig Biotec), 2 mM de MgCl₂ e 1U de *Taq* DNA polimerase (Promega, USA) .

A reação foi levada ao termociclador (Biosystems) e seguiram-se os ciclos: aquecimento prévio (94°C por 1 min), 35 ciclos (94°C por 1min- desnaturação), 45 segundos na temperatura de anelamento específica para cada "primer" (71°C para *mexA* e 69°C para *mexE*) e 45 segundos a 72°C de extensão. A extensão final foi de 10 min a 72 °C, após o término dos 35 ciclos. Cada reação conteve o DNA das cepas controle *P.aeruginosa* PAO1 e Pa27853.

Inibição das bombas de efluxo com CCCP

A solução de CCCP (Sigma Aldrich) foi preparada a partir da substância em pó. A mesma foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO), a fim de atingir uma concentração de 100 mM. Para realizar a

inibição do efluxo, a solução de CCCP foi adicionada ao meio de cultura caldo LB a uma concentração final de 12,5 μM em 2 mL de caldo. (adaptado de Pournaras et al., 2005). O inóculo do isolado P118 foi mantido sob aerobiose na estufa bacteriológica a 37°C por 24h na presença do inibidor.

Síntese de pontos quânticos de CdTe

A síntese de QDs de Telureto de Cádmio (CdTe) funcionalizadas com o ácido 3-mercaptopossuccínico (MSA) já foi previamente descrita por CABRAL FILHO *et al.* 2016. A síntese acontece em duas etapas: em uma primeira etapa, prepara-se uma solução de Cd^{2+} /MSA, formada a partir dos precursores de cádmio (CdCl_2 - 0,5 mmol) e do agente funcionalizante/estabilizante da reação, o ácido mercaptopossuccínico (MSA 0,6 mmol), em pH de aproximadamente 10,5, elevado com NaOH (2 M). Na segunda etapa, simultânea à primeira, ocorre a redução do telúrio (0,1 mmol), por ação do agente redutor, o boridreto de sódio (NaBH_4 - 3 mmol), em atmosfera inerte e em pH básico (pela ação do NaOH 2 M). Após a redução, o Te^{2-} é adicionado na solução de Cd^{2+} /MSA para formação das nanopartículas, permanecendo por 4 horas, sob agitação e aquecimento (90 - 100 °C), tendo uma proporção molar de 5:1:6 de Cd:Te:MSA.

Os QDs foram caracterizados opticamente, através da aquisição de espectros de absorção e emissão, utilizando, respectivamente, o espectrofotômetro UV-Vis 1800 (Shimadzu) e o espectrofluorímetro LS55 (PerkinElmer).

Conjugação de QDs ao Meropenem

O pH do QD (0,8 μM) foi ajustado para aproximadamente 5,5 utilizando MSA (4,9% m/v). Após o ajuste, foram adicionados o N-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC – 1,0 mM) e o sal de sódio de N-hidroxissulfosuccinimida (Sulfo-NHS – 1,2 mM) para promover a conjugação covalente entre o QD e o Meropenem trihidratado (MPM - 383.5 Daltons – [10 μM]) em uma razão de 1:500 QD:MPM. Após a adição do MPM o sistema QDs-MPM foi mantido sob agitação por 30 min (rotação a 360° - *Minirotator*) e em seguida armazenados em geladeira (4-8 °C) por 4 dias. Após a conjugação, os QD-MPM foram caracterizados por espectroscopias de emissão e absorção e foram comparados com os QDs sozinhos.

Preparação de inóculos bacterianos e incubação com os QDs de CdTe.

As colônias crescidas de *P. aeruginosa* P118 e ATCC Pa27853 em agar cetrimide e livres de contaminação foram inoculadas em 2 mL de caldo Luria-Bertani (LB) e deixadas na estufa a 37 °C por 24 h.

Para todos os procedimentos de marcação das bactérias e avaliação da formação de biofilmes os conjugados foram bloqueados com TRIS Base de acordo com bloqueios realizados por Cabral Filho et al. 2016, com algumas modificações. Para isso, 500 μL de QDs-MPM foram bloqueados com 25 μL de TRIS (15 mg/mL).

Inicialmente para avaliar a efetividade do conjugado através da formação de biofilme, a 50 μL do inóculo de P118 foi colocado 50 μL de QDs-MPM e o sistema foi mantido sob agitação constante por 1 h a 25 $^{\circ}\text{C}$, após o período de incubação foram feitas 2 lavagens através de centrifugação do sistema a 1400 xg por 5 min. Após a retirada do sobrenadante as bactérias foram diluídas em NaCl (0,9 % m/v) e observadas no microscópio de fluorescência convencional *Leica* (DMI4000B) com magnitude de 630x. A fluorescência foi observada excitando-se as amostras com um filtro do tipo passa banda (BP) a 560/40 nm e um filtro de emissão BP a 645/75 nm.

Para aumentar a produção de biofilme e verificar uma maior diferença entre as cepas resistentes e sensíveis foram adicionados às bactérias um excesso de MPM. Para isso, foram incubados 50 μL do inóculo P118 ou ATCC Pa27853 com 50 μL de MPM (1 mg/mL) e o 50 μL do QD-MPM por 1 h a 25 $^{\circ}\text{C}$, após o período de incubação foram seguidos os mesmos procedimentos de lavagens e ressuspensão das células feitas no procedimento anterior.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização óptica do MPM, QDs e conjugados QD-MPM

Na Figura 1 é possível observar os espectros de emissão e absorção do MPM. O pico máximo foi em 300 nm, o qual de acordo com ELRAGEHY et al, 2008 refere-se ao MPM não degradado. Após excitação a 300 nm foi observada uma discreta fluorescência com pico de intensidade máximo a 500 nm.

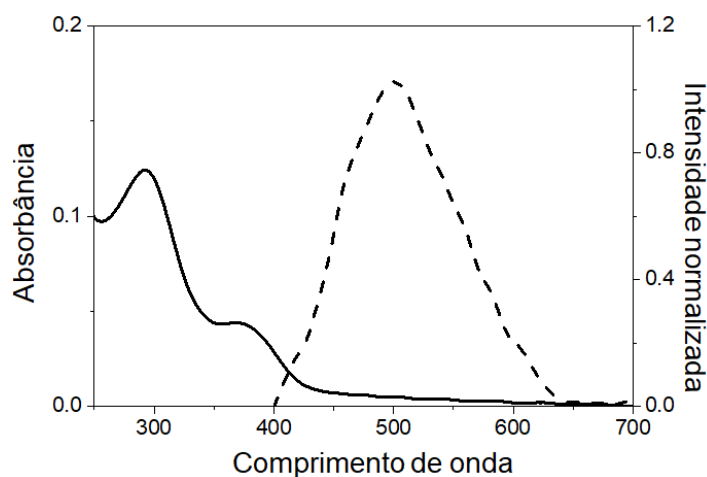


Figura 1- Absorção (linha contínua) e emissão (linha tracejada) do Meropenem. $\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$

A Figura 2A mostra os espectros de emissão e absorção dos QDs de CdTe e dos conjugados QD-MPM. De acordo com a caracterização óptica, os QDs funcionalizados com MSA apresentaram primeiro pico máximo de absorção em 585 nm. Sendo assim, de acordo com a equação de Dagtepe, et al, 2007 nós estimamos o diâmetro médio das partículas em aproximadamente 3,4 nm. Além disso, tendo ainda como base o primeiro pico máximo de absorção, o coeficiente de extinção molar para QDs de CdTe proposto por Yu et al, 2003., e a equação de Lambert-Beer, nós também estimamos a concentração das nanopartículas em aproximadamente 4.7 μM . Já o espectro de emissão do QD apresentou um pico máximo em 627 nm, indicando uma fluorescência na região do vermelho, e uma largura a meia altura de aproximadamente 56 nm, indicando um estreito espectro de emissão,

quando comparados aos corantes orgânicos que chegam a ter 80-100 nm de largura a meia altura (Resch-Genger et al, 2008).

Após a conjugação, não observamos diferenças significativas no espectro de absorção dos QDs, não sendo observado deslocamento do pico máximo que se manteve em 585 nm e também não houve surgimento de outros picos na região do visível, prevalecendo a absorbância das nanopartículas e suprimindo a absorbância do MPM no UV (dados não mostrados). Por outro lado, o espectro de emissão apresentou um deslocamento para a região do vermelho de cerca de 26 nm, tendo portanto pico máximo de emissão 653 nm, como podemos observar na Figura 2A. O conjugado QD-MPM de acordo com o espectro de emissão promoveu uma redução de aproximadamente 8 nm na largura a meia altura, quando comparado ao QD sozinho (56 nm), passando a ter uma largura de 48 nm quando conjugado.

Além disso, QD-MPM apresentou uma diminuição de aproximadamente 50% na intensidade de fluorescência, quando comparado ao QD sozinho. Apesar disto, esses achados indicam que o MPM estava conjugado na superfície do QD e mesmo com uma diminuição da intensidade de fluorescência este conjugado pode ser detectado por técnicas convencionais de análises, como já observado na literatura para conjugação de QDs a proteínas (CABRAL FILHO et al, 2016; CUNHA et al, 2018). A análise de fluorescência foi feita sob excitação a 488 nm, uma vez que nessa região o MPM não tem absorbância e consequentemente não apresenta emissão quando excitado neste comprimento de onda.

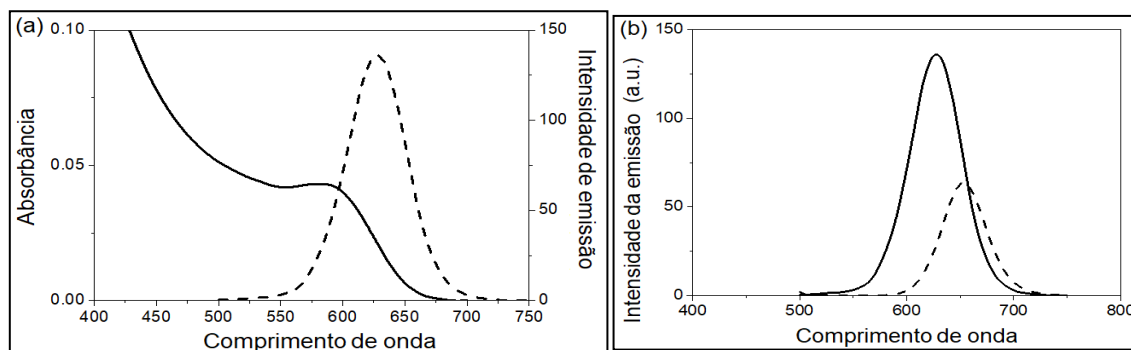


Figura 2- Espectros de absorção dos QDs e conjugados QD-MPM. Em (a) podemos observar a absorção (linha contínua) e a emissão (linha tracejada) dos QDs sozinhos, já em (b) podemos observar a emissão do QD sozinho (linha contínua) e do QD-MPM (linha tracejada). $\lambda_{exc} = 488$ nm.

Marcação de isolados P118 e cepa ATCC Pa27853 pelo QD-MPM

Inicialmente ao incubarmos o QD-MPM com o isolado P118 resistente a MPM foi observada a presença de biofilme como mecanismo de resistência desses isolados na presença do antimicrobiano (SKARIYACHAN et al., 2018). A Figura 3 apresenta diversas bactérias do isolado P118 marcadas em vermelho pelo QD-MPM e com presença de aglomerados celulares (micro-colônias), indicando a formação de biofilme como principal mecanismo de resistência em curto prazo. De acordo com esses resultados pode-se sugerir que a formação de biofilme não foi afetada pelo MPM conjugado ao QD possibilitando o estudo dos efeitos do CCCP sobre esses mecanismos. Vale ressaltar que as bactérias sem a presença do QD-MPM não apresentaram fluorescência quando excitadas no filtro BP 560/40 nm e coleta da emissão pelo BP 645/75 nm.

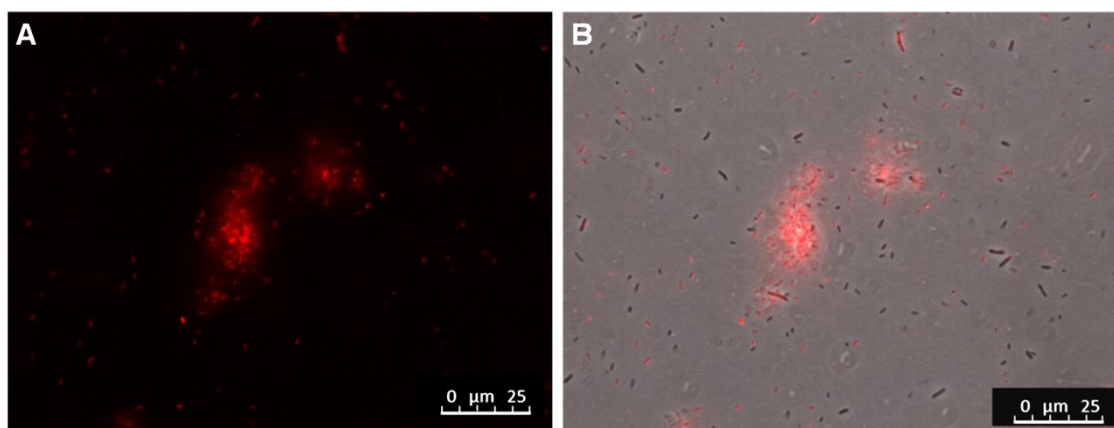


Figura 3- Imagens de microscopia de fluorescência do isolado P118 incubado com o conjugado QD-MPM. Em (A) imagem de fluorescência com emissão no filtro vermelho BP 645/75 nm e em (B) sobreposição da emissão do filtro vermelho com o contraste de fase. Barra de escala: 25 µm.

Uma vez que foi observado que o QD-MPM havia potencial para estudar o mecanismo da formação de biofilme pelo isolado P118, incubamos este isolado com um excesso de MPM e com o conjugado QD-MPM pelo mesmo período de tempo para observar se havia um aumento da formação do biofilme. Como podemos observar na Figura 4 houve um aumento considerável da formação do biofilme, como também do número de bactérias marcadas. Além disso, as bactérias continuavam vivas e com tendência a aumentar o tamanho do biofilme enquanto eram analisados na microscopia. Baugh et al., 2012, descreveu em *Salmonella Typhimurium*, que inativação química sistemas de efluxo multidroga usando inibidores de efluxo, com diferentes mecanismos de ação, foi capaz de reprimir a formação de biofilme em todos os testes.

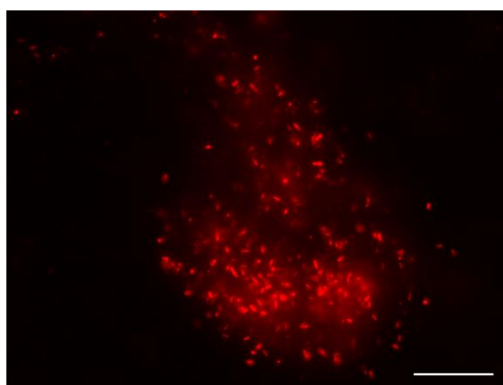


Figura 4- Imagens de microscopia de fluorescência do isolado P118 incubado com excesso de MPM e o conjugado QD-MPM. Barra de escala: 25 µm

Em seguida incubamos nas mesmas condições com excesso de MPM as cepas ATCC Pa27853 sensíveis ao MPM. Na Figura 5 não observamos mais a formação de biofilme e há uma redução na motilidade celular. A marcação apresentou um perfil mais uniforme no interior das células, indicando uma maior concentração intracelular ou na membrana bacteriana do conjugado QD-MPM.

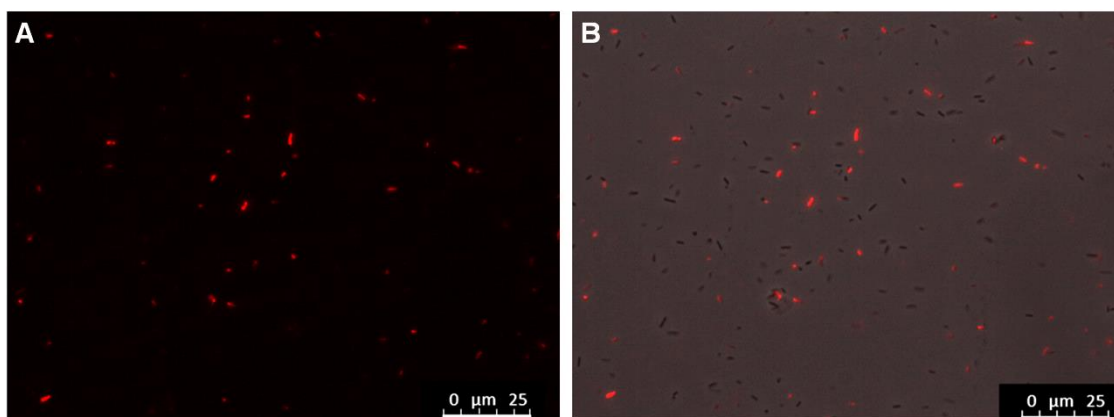


Figura 5- Imagens de microscopia de fluorescência da ATCC Pa27853 incubada com excesso de MPM e o conjugado QD-MPM. Em (A) imagem de fluorescência com emissão no filtro vermelho BP 645/75 nm e em (B) sobreposição da emissão do filtro vermelho com o contraste de fase. Barra de escala: 25 μ m.

Amplificação dos genes relacionados aos sistemas de efluxo.

Os resultados da PCR demonstraram que tanto o isolado clínico P118 quanto a cepa controle ATCC Pa27853 são positivos para os genes *mexA* e *mexE*. Esses genes são responsáveis pela codificação da proteína ligante dos sistemas de efluxo MexAB-OprM e MexEF-OprN sendo ambos os sistemas pertencentes a família *Resistance Nodulation Division* (RND) e responsáveis pela expulsão de várias classes de antimicrobianos incluindo os carbapenêmicos, preferencialmente o MPM (MELETIS; BAGKERI, 2013).

Análise da marcação dos isolados P118 após adição do CCCP

Uma vez que o conjugado QD-MPM foi capaz de diferenciar o isolado resistente P118 e a cepa sensível ATCC Pa27853, foi também utilizado como sonda para identificar possíveis alterações no isolado P118 após a inibição dos sistemas de efluxos com CCCP.

Após a adição do CCCP (Figura 6), observamos um maior número de bactérias marcadas quando comparadas a marcação obtida na ATCC Pa27853 (Figura 5), no entanto o perfil de marcação mostrou-se semelhante, indicando maior concentração intracelular ou na membrana do QD-MPM. Além disso, não foi possível observar a formação de micro-colônias, indicativas de formação de biofilme, sugerindo que o CCCP promoveu redução da resistência ao MPM no isolado P118.

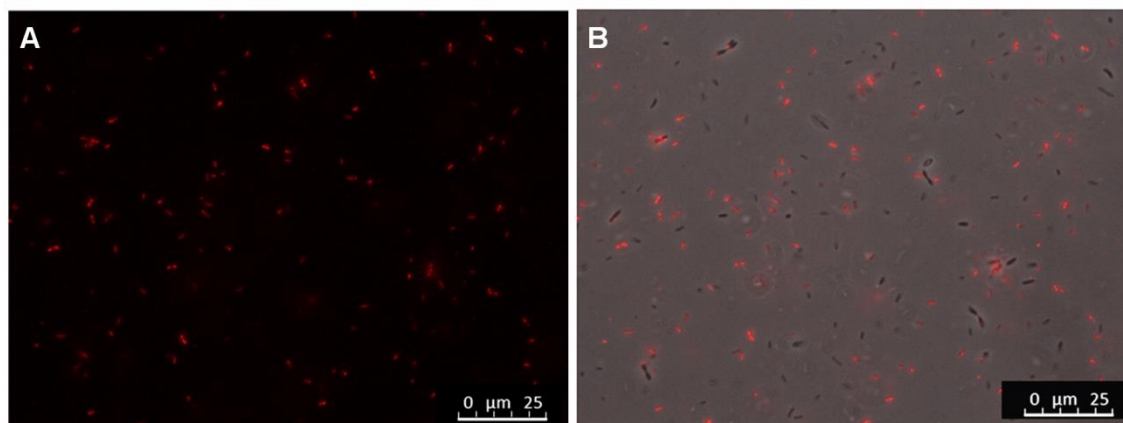


Figura 6- Imagens de microscopia de fluorescência do isolado P118+CCCP incubados com o conjugado QD-MPM. Em (A) imagem de fluorescência com emissão no filtro vermelho BP 645/75 nm e em (B) sobreposição da emissão do filtro vermelho com o contraste de fase. Barra de escala: 25 μm .

A inibição das bombas de efluxo pode ser realizada tanto geneticamente quanto quimicamente (utilizando outros inibidores de efluxo como PA β N e clopromazina). Já foi demonstrado em *Salmonella typhimurium* que ambas as formas de inibição de efluxo (deleção genética e adição de CCCP) estão relacionadas com a inibição do biofilme (BAUGH et al., 2014). Um modelo *in vivo* com larvas de *Galleria mellonella* infectadas por *P.aeruginosa* que superexpressam a MeXAB-OprM demonstrou a melhor eficácia de inibidores de efluxo em combinação com levofloxacina do que a monoterapia (ADAMSON; KRIKSTOPAITYTE; COOTE, 2015).

CONCLUSÃO

A conjugação dos QDs de CdTe funcionalizados com MSA ao MPM mostrou-se estável por um período de cerca de um mês, capazes de apresentar o mesmo perfil de marcação e foi eficiente na diferenciação entre cepas resistentes e sensíveis ao MPM. O conjugado foi capaz de ser usado como uma ferramenta de investigação das alterações ao nível celular em cepas de *P.aeruginosa* resistentes e sensíveis ao MPM.

Além disso, foi possível estudar os efeitos do CCCP como inibidor de bomba de efluxo no isolado P118, que apresentou diminuição da formação do biofilme e alteração no perfil de marcação indicando que a inibição do efluxo está relacionada com a redução do biofilme e o aumento da marcação celular pelo QD-MPM.

O sinergismo entre o inibidor de bomba de efluxo e o meropenem foi observado através do QD-MPM, mostrando que esses inibidores de bomba de efluxo em conjunto com os antibióticos podem ser utilizados na prática clínica principalmente em bactérias MDR. Além disso, os QD-MPM também podem ser usados para investigação de isolados clínicos resistentes a antimicrobianos, bem como para estudos mais aprimorados da formação de biofilmes em *P.aeruginosa* e outras espécies MDR.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos a Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas concedidas e projetos aprovados. Ainda somos gratos ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica (INCT-INFo).

REFERENCIAS

ADAMSON, D. H.; KRIKSTOPAITYTE, V.; COOTE, P. J. Enhanced efficacy of putative efflux pump inhibitor/antibiotic combination treatments versus MDR strains of *Pseudomonas aeruginosa* in a *Galleria mellonella* in vivo infection model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 8, p. 2271–2278, 2015.

Baugh S; Aruna E.S.; Piddock LJV and Webber MA. Loss of or inhibition of all multidrug resistance efflux pumps of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* results in impaired ability to form a biofilm **J Antimicrob Chemother** v. 67: 2409–2417, 2012.

BAUGH, S. et al. Inhibition of multidrug efflux as a strategy to prevent biofilm formation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. October 2013, p. 673–681, 2014.

CABRAL FILHO, P. E. et al. CdTe quantum dots as fluorescent probes to study transferrin receptors in glioblastoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1860, n. 1, p. 28–35, 2016.

CODJOE, F.; DONKOR, E. Carbapenem Resistance: A Review. **Medical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 1, 2017.

ESPOSITO, S.; SIMONE, G. DE. Update on the main MDR pathogens : prevalence and treatment options. **Le Infezioni in Medicina**, v. 4, p. 301–310, 2017.

FONG, J. et al. Combination Therapy Strategy of Quorum Quenching Enzyme and Quorum Sensing Inhibitor in Suppressing Multiple Quorum Sensing Pathways of *P. aeruginosa*. **Scientific Reports**, v. 8, n. January, p. 1–11, 2018.

GALDIERO, E. et al. An integrated study on antimicrobial activity and ecotoxicity of quantum dots and quantum dots coated with the antimicrobial peptide indolicidin. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 4199–4211, 2016.

IKONOMIDIS, A. et al. Effect of the proton motive force inhibitor carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone (CCCP) on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 298–302, 2008.

MELETIS, G.; BAGKERI, M. *Pseudomonas aeruginosa*: Multi-Drug-Resistance Development and Treatment Options. **Infection Control**, p. 33–56, 2013.

MOCAN, T. et al. Development of nanoparticle-based optical sensors for pathogenic bacterial detection. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 15, n. 1, p. 1–14, 2017.

MOMBESHORA, M.; MUKANGANYAMA, S. Development of an accumulation assay and evaluation of the effects of efflux pump inhibitors on the retention of chlorhexidine digluconate in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **BMC Research Notes**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2017.

OZER, B. et al. Efflux pump genes and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lower respiratory tract infections acquired in an intensive care unit. **The Journal of Antibiotics**. v. 65, p. 9-13, 2012.

PAN, Y. PING et al. Overexpression of MexAB-OprM efflux pump in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Archives of Microbiology**, v. 198, n. 6, p. 565–571, 2016.

POURNARAS, S. et al. Spread of efflux pump-overexpressing, non-metallo- β -lactamase-producing, meropenem-resistant but ceftazidime-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* in a region with blaVIM endemicity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 761–764, 2005.

SEKYERE, J. O.; AMOAKO, D. G. Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine (CCCP) reverses resistance to colistin, but not to Carbapenems and tigecycline in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. FEB, 2017.

SKARIYACHAN, S. et al. Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. **Folia microbiologica**, 2018.

ELRAGEHY, N.A. et al. Stability-indicating determination of meropenem in presence of its degradation product, **Talanta**, 77 (2008) 28-36

DAGTEPE P. et al Quantized Growth of CdTe Quantum Dots; Observation of Magic-Sized CdTe Quantum Dots, **The Journal of Physical Chemistry C**, 111 (2007) 14977-14983.

YU, W.W. L. Qu, W. Guo, X. Peng, Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals, **Chemistry of Materials**, 15 (2003) 2854-2860.

U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, T. Nann, Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels, **Nat Meth**, 5 (2008) 763-775.

C.R.A. Cunha, C.G. Andrade, M.I.A. Pereira, P.E. Cabral Filho, L.B. Carvalho, L.C.B.B. Coelho, B.S. Santos, A. Fontes, M.T.S. Correia, Quantum dot–Cramoll lectin as novel conjugates to glycobiology, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 178 (2018) 85-91.

FONTES A. et al , Quantum dots in biomedical research, in: R. Hudak (Ed.), **Biomedical Engineering - Technical Applications in Medicine**, InTech, 2012.

KUMAR, P., SHARMA, S.C., DEEP, A., Bioconjugation of anti-estrogen alpha antibody with CdSSe/ZnS quantum dots for molecular sensing of a breast cancer antigen, **Sensors Actuators B Chem.** 202 (2014) 404–409.

6 CONCLUSÕES

Diantes dos resultados obtidos, concluímos que a ação do CCCP na inibição do efluxo em *P.aeruginosa* foi capaz de alterar a susceptibilidade aos antimicrobianos testados tanto pelo método de disco-difusão quanto pelo método de microdiluição.

O desaparecimento das colônias no interior do halo de inibição para alguns antimicrobianos nos leva a sugerir que os sistemas de efluxo podem estar relacionados com o aparecimento do fenômeno de heterorresistência em *P.aeruginosa*.

Os testes com o conjugado de Pontos quânticos com meropenem se mostraram capazes de serem utilizados como uma ferramenta para o estudo dos efeitos da inibição do efluxo sobre a resistência antimicrobiana, principalmente sobre o processo de formação do biofilme.

REFERÊNCIAS

AENDEKERK, S. et al. Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. **Microbiology**. v.148, p.2371–2381, 2002.

AENDEKERK, S. et al. The MexGHI-OpmD multidrug efflux pump controls growth, antibiotic susceptibility and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* via 4-quinolone-dependent cell-to-cell communication. **Microbiology** V.151, p. 1113–1125, 2005.

ARDEBILI, A. et al. Effect of efflux pump inhibitor carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone on the minimum inhibitory concentration of ciprofloxacin in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 3–7, 2014.

ASKOURA, M. et al. Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. **Libyan Journal Medicine**. v.6, n.5870, maio 2011.

BAGGE, N. et al. Constitutive High Expression of Chromosomal Beta-Lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* Caused by a New Insertion Sequence (IS1669) Located in *ampD* **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2002, v.46, n.10, p. 3406–3411, novembro 2002.

BAUGH, S. et al. Inhibition of multidrug efflux as a strategy to prevent biofilm formation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. October 2013, p. 673–681, 2014.

BEGUM, S et al. Detection of extended spectrum β -lactamase in *Pseudomonas spp.* isolated from two tertiary care hospitals in Bangladesh. **BioMed Central Research Notes**. v.6, n.7, 2013.

BOLLA, J.-M. et al. Strategies for bypassing the membrane barrier in multidrug resistant Gram-negative bacteria. **FEBS letters**, v. 585, n. 11, p. 1682–90, 6 jun. 2011.

CABOT, G. et al Genetic Markers of Widespread Extensively Drug-Resistant (XDR) *Pseudomonas aeruginosa* High-Risk Clones **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**, outubro 2012.

CABRAL FILHO, P. E. et al. CdTe quantum dots as fluorescent probes to study transferrin receptors in glioblastoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1860, n. 1, p. 28–35, 2016.

CHEN, H. Y., YUAN, Mei & LIVERMORE, D. M. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993. v.43, p.300-309 **Journal Medical Microbiology** março 1995.

CIOFU, O. et al. Antibiotic treatment of biofilm infections. **Apmis**, v. 125, n. 4, p. 304–319, 2017.

CHEN, H. et al The *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux regulator MexR uses an oxidation-sensing mechanism **National Academy of Sciences of the USA (PNAS)**. vol. 105. no. 36, p13586–13591, Setembro, 2008.

CLSI (**Clinical and Laboratory Standards Institute**) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; CLSI supplement M100. Wayne, P.A., v.27, n.1, janeiro 2017.

DE ALMEIDA SILVA, K. DE C. F. et al. Molecular characterization of multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a burn center. **Burns**, v. 43, n. 1, p. 137–143, 2017.

DE FREITAS, A. L. P. & BARTH, A. L. Antibiotic resistance and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*: focus on imipenem **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. n.6, v.1, p.1-7, fevereiro 2002

ESPOSITO, S.; SIMONE, G. DE. Update on the main MDR pathogens : prevalence and treatment options. **Le Infezioni in Medicina**, v. 4, p. 301–310, 2017.

FONTES A. et al, Quantum dots in biomedical research, in: R. Hudak (Ed.), **Biomedical Engineering - Technical Applications in Medicine**, InTech, 2012.

GALDIERO, E. et al. An integrated study on antimicrobial activity and ecotoxicity of quantum dots and quantum dots coated with the antimicrobial peptide indolicidin. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 4199–4211, 2016.

GALES, A. C. et al. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 699–702, 2003.

GALES, A.C et al. Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Outbreak in an Intensive Care Unit of a Teaching Hospital. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. n.8, v.4, p.267-271, agosto 2004.

HOLZINGER, M.; LE GOFF, A.; COSNIER, S. Nanomaterials for biosensing applications: a review. **Frontiers in Chemistry**, v. 2, n. Agosto, p. 1–10, 2014.

JÁCOME, P. R. L. A. et al. First Report of KPC-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.56, n.9, p. 4990, setembro 2012.

JÁCOME, P. R. L. DE A. et al. Detection of bla SPM-1, bla KPC, bla TEM and bla CTX-M genes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. from cancer patients with healthcare-associated infections. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 658–665, 2016.

KANJ, S. S. & KANAFANI, Z. A Current Concepts in Antimicrobial Therapy Against Resistant Gram-Negative Organisms: Extended-Spectrum beta-Lactamase–Producing Enterobacteriaceae, Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae, and Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Mayo Clinic Proceedings**. v.3, n.86, p.250-259, março 2011.

LAMBERT, P.A. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* **JOURNAL OF THE ROYAL SOCIETY OF MEDICINE**. v.95, n.41, p.22-26, 2002.

LAMERS, R. P CAVALLARI, J. F. & BURROWS, L. L. The Efflux Inhibitor Phenylalanine-Arginine Beta-Naphthylamide (PAbetaN) Permeabilizes the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria. **PLOS ONE** v.8, n.10, março 2013.

LI, X., POOLE, K. & NIKAIDO, H. Contributions of MexAB-OprM and an EmrE Homolog to Intrinsic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Aminoglycosides and Dye. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 47, n. 1, p.27-33 janeiro 2003.

LIU, Y. *et al* Efflux System Overexpression and Decreased OprD Contribute to the Carbapenem Resistance Among Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from a Chinese University Hospital **Microbial drug resistance** v.00, n.00,p.1-6, 2013.

LIVERMORE, D. M. Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare? **Clinical Infectious Diseases Antimicrobial Resistance**. v.34, p. 634-640, janeiro 2002.

LOMOVSKAYA, O. *et al*, Identification and Characterization of Inhibitors of Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Agents for Combination Therapy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 45, n.1, janeiro 2001.

KOHLER, T. *et al.* Overexpression of the MexEF-OprN Multidrug Efflux System Affects Cell-to-Cell Signaling in *Pseudomonas aeruginosa* **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**, v. 183, n. 18, p. 5213–5222, setembro 2001.

KUMAR, P., SHARMA, S.C., DEEP, A., Bioconjugation of anti-estrogen alpha antibody with CdSSe/ZnS quantum dots for molecular sensing of a breast cancer antigen, **Sensors Actuators B Chem.** 202 (2014) 404–409.

IKONOMIDIS, A. *et al.* Effect of the proton motive force inhibitor carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone (CCCP) on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 298–302, 2008.

KOURTESI, C. *et al.* Microbial efflux systems and inhibitors: approaches to drug discovery and the challenge of clinical implementation. **The open microbiology journal**, v. 7, p. 34–52, 2013.

KRIENGKAUYKIAT, J. *et al.* Use of an Efflux Pump Inhibitor To Determine the Prevalence of Efflux Pump-Mediated Fluoroquinolone Resistance and Multidrug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 49, n. 2, p. 565–570, 2005.

MAHAMOUD, A. *et al.* Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.59, p.1223–1229, janeiro 2007.

MARQUEZ, B. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors **Biochimie.** v.87, p.1137–1147, maio 2005.

MASUDA, N. *et al.* Substrate specificities of mexAB-OprM, mexCD-OprJ, and mexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v.44, no.12, p.3322–3327, dezembro 2000.

MELETIS, G. & BAGKERI, M. *Pseudomonas aeruginosa*: Multi-Drug-Resistance Development and Treatment Options. **INTECH** cap.2, p35-56, 2013.

MISRA, R. & BRAVO, V. N. Assembly & Transport Mechanism of Tripartite Drug Efflux Systems. **Biochim Biophys Acta.** v.5, n.1794, p.817–825, maio 2009.

MOCAN, T. *et al.* Development of nanoparticle-based optical sensors for pathogenic bacterial detection. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 15, n. 1, p. 1–14, 2017.

MORALES, E. *et al.* Hospital costs of nosocomial multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. **Biomed Central Health Services Research.** v.12 n.122, 2012.

MURRAY, C. B.; NORRIS, D. J.; BAWENDI, M. G. Synthesis and Characterization of Nearly Monodisperse CdE (E = S, Se, Te) Semiconductor Nanocrystallites. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 19, p. 8706–8715, 1993.

NADEEM, S.G, et al, Comparison of the in vitro susceptibility of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a local hospital setting in Karachi. **British Journal of Practitioners**. Pakistan. v.2, n.4, dezembro 2009.

NEGI NIDHI, PRADYOT PRAKASH, MOHAN LAL GUPTA, T. MOHAN M. Possible Role of Curcumin as action an Efflux Pump Inhibitor in Multi Drug Resistant Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 10, p. 8–11, 2014.

NIKAIDO, H.; TAKATSUKA, Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1794, n. 5, p. 769–81, maio 2009.

NEVES, P. R et al,. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro Patologia Médica e Laboratorial**. v. 47, n. 4, p. 409-420, agosto 2011.

NIKAIDO, H. Porins and Specific Diffusion Channels in Bacterial Outer Membranes. **The journal of biological chemistry** v. 269, n.6, p. 3905-3908, fevereiro 1994.

OHENE-AGYEI, T. et al. Phytochemicals increase the antibacterial activity of antibiotics by acting on a drug efflux pump. **MicrobiologyOpen**, v. 3, n. 6, p. 885–896, 2014.

OZER, B. et al. Efflux pump genes and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lower respiratory tract infections acquired in an intensive care unit. **The Journal of Antibiotics**. v. 65, p. 9-13, 2012.

PAGES, J. & AMARAL, L. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: Challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**. p.826–833, dezembro 2009.

PARK, Y. K.; KO, K. S. Effect of carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) on killing *Acinetobacter baumannii* by colistin. **Journal of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 53–59, 2015.

PICÃO, R. C., et al. Diversity of β -lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.56, n.9, p.3908–3913, setembro 2009.

PIDDOCK, L. J.V Multidrug-resistance efflux pumps— not just for resistance **NATURE REVIEWS | MICROBIOLOGY** v.4 , p.629-636, agosto 2006.

PIDDOCK, L. J.V. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. **Clinical Microbiology Reviews** v.19, n.2 p. 382–402, abril 2006.

PIRES, E. J. V. C, et al. Análise epidemiológica de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de hospital universitário. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. v.21, n.4, p.384-390, novembro 2009.

POIREL, L. et al. GES-2 , a Class A β -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with Increased Hydrolysis of Imipenem. v. 45, n. 9, p. 2598–2603, 2001.

POOLE, K. et al, Multiple Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence for Involvement of an Efflux Operon **Journal of bacteriology** v.175, n.22, p. 7363-7372, setembro 1993.

POOLE, Keith. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the Max. **Frontiers in Microbiology**, v.2, n.65 p.1-13, abril 2011.

POOLE, Keith. 2005 Efflux-mediated antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v.56, p.20–5, maio 2005.

POURNARAS, S et al. Spread of efflux pump-overexpressing, non-metallo-beta-lactamase producing, meropenem-resistant but ceftazidime susceptible *Pseudomonas aeruginosa* in a region with *bla*VIM endemicity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.56, p.761–764, Julho 2005.

SADER, H. et al. Epidemiologic Typing of Multiply Drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Outbreak in Intensive Care Unit. **Diagnostic Microbiology Infection Disease**. n.17 p.13-18, 1993.

SCHUSTER, M. et al. Identification, Timing, and Signal Specificity of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Controlled Genes: a Transcriptome Analysis. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 7, p. 2066–2079, 2003.

SILVA JÚNIOR, V. V. DA et al. Detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* harboring *bla* GES-1 and *bla* GES-11 in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 6, p. 764–768, 2017.

SINGH, M. et al. Effect of efflux pump inhibitors on drug susceptibility of ofloxacin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **Indian Journal of Medical Research**. v.5, n.133, p. 535-540, dezembro, 2011.

SKARIYACHAN, S. et al. Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. **Folia microbiologica**, 2018.

SOTO, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. **Landes Bioscience**. v.4, n.3, p.223–229; Abril, 2013.

STOVER, C.K et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**. v.406, p.959-964, agosto 2000.

STRATEVA, T & YORDANOV, D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v.58, p.1133–1148, 2009.

TIAN, G, B et al, PME-1, an Extended-Spectrum Beta-Lactamase Identified in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n.6, p. 2710–2713, junho 2011.

VILLEGAS, M. V. et al. First Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Producing a KPC-Type Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.51, n.4, p.1553–1555, abril 2007.

WANG, C. et al. A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum beta-lactamase. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 1261–2, jun. 2006.

WATKINS, W. J. et al. The Relationship between Physicochemical Properties, In Vitro Activity and Pharmacokinetic Profiles of Analogues of Diamine-Containing Efflux Pump InhibitorsX, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** v.13 , p.4241–4244, julho 2003.

WEI, Q.; MA, L. Z. Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 10, p. 20983–21005, 2013.

WELDHAGEN, G. F. GES: an Emerging Family of Extended Spectrum Beta-Lactamases. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 28, n. 19, p. 145–149, 2006.

WESTBROK-WADMAN, S. et al. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* Efflux Pump Contributing to Aminoglycoside Impermeability. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 43, n.12 p. 2975–2983, dezembro 1999.

YIGIT H, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing betalactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**.;v.45, n.4. p1151-61. 2001

ZHONG, H. et al. Influence of induced ciprofloxacin resistance on efflux pump activity of *Klebsiella pneumoniae* **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)**. v.14 n.9, p.837-843, 2013.

APÊNDICE A- ARTIGO 1 VERSÃO EM INGLÊS

Susceptibility profile changing for Polymyxin B in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with use of Carbonyl Cyanide-3-Chlorophenylhydrazone efflux pump inhibitor.

Valdemir V. Silva Júnior¹, Jussyêgles N.P Pereira¹, Jaílton L.C Lima¹, Paulo S. R. Araújo², Ana C. S. Lopes¹, Maria A. V. Maciel¹

¹Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

²Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz, Pernambuco, Brazil.

ABSTRACT

Purpose. To evaluate CCCP as an efflux system inhibitor molecule to verify the susceptibility profile changes in multidrug resistant *P. aeruginosa* isolates harboring *mexA* and *mexE*, besides *bla*_{GES}, *bla*_{SPM-1} e *bla*_{KPC}.

Methodology. Eight *P.aeruginosa* clinical isolates were subjected to the molecular investigation for genes *mexA* and *mexE*, related to the MexAB-OprM and MexEF-OprN efflux pumps, respectively. The *bla*_{GES}, *bla*_{SPM-1} and *bla*_{KPC}, beta-lactamases codifying, were also surveyed. Disk-diffusion and broth microdilution tests determined drug susceptibility profiles. The tests were performed in the presence and absence of the Carbonyl Cyanide-3-Chlorophenylhydrazone (CCCP) efflux inhibitor.

Results/Key findings. CCCP addition displayed antimicrobial resistance reduction effects, especially for polymyxin B, whose minimum inhibitory concentrations for all isolates decreased. A heteroresistance profile also suffered inhibition after CCCP addition. We verified that CCCP efflux inhibitor may contribute to *P.aeruginosa* resistant phenotype reduction for some antimicrobials, as imipenem, amikacin and polymyxin B.

Conclusions. Using of efflux inhibitors may be adopted, after further toxicity reduction studies, in synergy with drugs already used in clinical practice in order to restore its antimicrobial activity.

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative non-fermentative bacillus that has been frequently isolated from several clinical samples and is related to various infections in developing countries. This opportunistic pathogen has showed resistance profiles to several antimicrobials in recent years [1]. Related in multidrug-resistant (MDR) pathogens group denominated by acronym "ESKAPE" including *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter* spp, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter* spp which account for a large drug

resistance percentage among bacteria and are a common infections cause in affected patients with unfavorable clinical outcome [2].

Bacterial resistance in recent years tends to increase and the pharmaceutical industry has not been producing new antimicrobial agents to replace existing ones in current clinical practice [3]. *P. aeruginosa* has numerous mechanisms responsible for the antibiotics ineffectiveness used in infections treatment, these mechanisms may be intrinsic or acquired, which together make the pathogen a real public health problem [4]. Among the acquired mechanisms stand out extended spectrum beta-lactamases enzymes [5], metallo beta-lactamases [6] and KPC-type enzymes [7] conferring resistance to all beta-lactams antibiotics including carbapenems that are considered last choice, leaving only polymyxins (colistin and polymyxin B) as a therapeutic option [8].

Regarding the intrinsic mechanisms, the multidrug efflux systems and the reduction of permeability of the outer membrane (reduction of porin expression) are highlighted [9].

Efflux pump systems are responsible for expulsion of multiple drugs, decreasing the antimicrobial intracellular concentration and rendering it ineffective. The main efflux systems in *P. aeruginosa* belong to the RND family (Resistance-Nodulation-Division) composed of an associated proteins tripartite set that linked transposes the bacterium cell membrane and cell wall, being able to perform extrusion of drugs, heavy metals, detergents and other harmful substances inside of cytosol or cell periplasm. [10].

The power source for RND efflux pumps operation and consequent noxious molecules expulsion is the proton motive force in which there is an exchange of H^+ ions into the cell by a molecule that it wants to expel [11].

The MexAB-OprM system is one of the most studied efflux pumps types in *P. aeruginosa*; MexB is the most internal protein, MexA is the binding protein and OprM is the outer porin of the tripartite system [12]. It is known that there are a antimicrobials shortage for fight against infections by MDR microorganism, among alternatives that have been studied the molecules known as inhibitors of efflux pump are gaining prominence [13].

The carbonyl cyanide-3-chlorophenylhydrazone (CCCP) is a proton motive force uncoupler that carries out a sequestration of H^+ ions required for the efflux system operation, this action can restore the antimicrobial activity since raises the intracellular drug concentration. [14, 15]

Therefore, the present study evaluated CCCP as an efflux system inhibitor molecule to verify the susceptibility profile changes in multidrug resistant *P. aeruginosa* isolates harboring *mexA* and *mexE*, besides *bla_{GES}*, *bla_{SPM-1}* and *bla_{KPC}*.

METHODS

Bacterial isolates

Eight *P. aeruginosa* MDR isolates were selected for the study. They were collected from clinical samples between 2006 and 2017 by three hospitals located in Recife, Brazil. The bacterial identification were confirmed by the VITEK® automated system (bioMérieux, France) and standardized microbiological techniques. Susceptibility profiles was determined by disk- diffusion and microdilution were obtained according to CLSI 2017 [16]. ATCC strains Pa27853 and the reference

strain *P. aeruginosa* Pa01 was used as controls. Bacteria were stored in Tryptone Soy Broth (TSB) in 20% glycerol at -20 ° C for subsequent analysis.

Bacterial DNA extraction

Bacterial isolates were incubated at 37°C for 18-24h in tubes containing Luria-Bertani (LB) broth. After bacterial growth, total deoxyribonucleic acid (DNA) extraction was performed using Brazol (LGC-Biotecnologia, Brazil) according to the manufacturer's instructions. The extracted DNA was re-suspended in Tris-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution and quantified by spectrophotometry (NanoDrop 2000) at a wavelength of 260nm.

Polymerase chain reaction for *mexA* and *mexE* genes

The Polymerase chain reaction (PCR) to research the genes encoding MexA and MexE channel proteins from MexAB-OprM and MexEF-OprN efflux pump systems was performed using the primers arranged in Table 1 according to Ozer et al, 2012 [17]. The reactions were prepared in a total volume of 25µL per tube, containing 10ng of genomic DNA, 10 pmol of primers, 1x buffer (final concentration), 200 µM of deoxyribonucleotide triphosphate (Ludwig Biotec), 2 mM MgCl₂ and 1U *Taq* DNA polymerase (Promega, USA).

The reaction was taken to the thermocycler (Biosystems) and follow the cycles: Initial denaturation (94°C for 1 min), 35 cycles (94°C for 1min-denaturation), 45 seg on specific annealing temperature to each primer (Table 1) and extension for 45 seg at 72°C. A final extension at 72°C for 10 min, after 35 cycles. Each reaction contained DNA of strains control *P.aeruginosa* Pa01 and Pa27853.

PCR for *bla*_{GES} gene

The *bla*_{GES} genes were identified using specific primers (**Table 1**). Amplification reactions were prepared in a total volume of 25µl per tube, comprising 10ng of genomic DNA, 10pmol of each primer, 1 × buffer, 200µM of deoxyribonucleotide triphosphate (Ludwig Biotec), 1.5mM MgCl₂, and 2U *Taq* DNA polymerase (Promega). The cycle parameters were as follows: 93°C for 3 min, followed by 40 cycles of denaturation at 93°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min; extension at 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 7min. Polymerase chain reaction (PCR) products were placed in 1% agarose gel for electrophoresis. A 100pb marker (Amresco) was used as the standard molecular weight. After electrophoresis, the fragment corresponding to the gene was visualized under ultraviolet light and was properly photodocumented.

PCR for *bla*_{KPC}, *bla*_{SPM-1} genes

Beta-lactamase genes *bla*_{SPM-1} and *bla*_{KPC} were investigated using specific primers. For each gene, the amplification reactions were performed in a total volume of 25µL per tube: For the *bla*_{SPM-1} and *bla*_{KPC} genes, 25ng of genomic DNA, 10pmol of primer, 1 × buffer, 100µM of deoxyribonucleotide triphosphate (Ludwig Biotec), 1.5mM of MgCl₂, and 1.0U Taq DNA polymerase (Promega) were used. PCR amplification was performed in a thermocycler(Biosystems) as follows: Initial denaturation at 95°C for 5 min followed by 30 cycles (*bla*_{SPM-1}) or 35 cycles (*bla*_{KPC}) of denaturation at 95°C for 1 min, annealing according to the temperature previously described (Table 1) for 1 min, and extension at 72°C for 1 min, and then a final extension of 10 min at 72°C.

The PCR products were stained with blue dye (Jena Bioscience), subjected to electrophoresis on 1% agarose gel in a Tris/Borate/EDTA buffer, visualized under ultraviolet light, and photodocumented. Positive control strain for the genes *bla*_{SPM-1} (*P. aeruginosa* PSA319), were supplied by the Laboratório Alerta, Universidade Federal de São Paulo. A positive control strain for the gene *bla*_{KPC} (*P. aeruginosa* P22A) was obtained from the culture collection of the Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco.

Susceptibility Test *in vitro*

Disk-diffusion method used seven antimicrobials: imipenem (IPM), ticarcillin / clavulanic acid (TAC), ciprofloxacin (CIP), aztreonam (ATM), gentamicin (GEN), amikacin (AMI) and cefepime (CPM). Technique was performed according to CLSI 2017 in the absence and presence of CCCP incorporated into the Mueller-Hinton agar medium at a final concentration of 12.5µM. The test was realized in duplicate.

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) was performed using *P. aeruginosa* inocula in Mueller-Hinton cation adjusted broth (MHCAB) suspension equivalent to the McFarland's standard scale (turbidity= 0.5), from a previous culture in Cetrimide agar incubated for 18-24 h to obtaining characteristic colonies contamination-free. Once prepared, the inocula were transferred to 96-well plates already containing 100 µL of CMHCA in which the antimicrobial dilutions meropenem, amikacin and polymyxin B. The same was done with the presence of CCCP in culture medium at final concentration of 12.5µM [21].

Eight serial dilutions was carried out, whose highest concentration corresponded to four-fold concentration value considered as resistant to *P. aeruginosa* according to Clinical and Laboratory Standards Institute [16].

The procedure was performed in triplicate and for reading was used rezasurin, a dye for cell viability.

RESULTS

P.aeruginosa MDR isolates selected for the study showed resistance to three or more antimicrobials classes and were obtained from different departments in three hospitals in Recife, Brazil (Table 2).

Most of the isolates were from the intensive care unit (6/8) and the most prevalent sample type was tracheal aspirate (3/8) followed by blood samples (2/8).

The *mexA* and *mexE* genes were detected simultaneously in all isolates. The *bla_{KPC}* gene was detected in both isolates from oncologic hospital. A single isolate from the tertiary hospital carried the *bla_{SPM-1}* gene, on the other hand *bla_{GES}* gene was detected in three isolates, from two different hospitals: university hospital (P118UH) and tertiary hospital (P8TH and P123TH), there was no simultaneity of these beta-lactamase genes in the same bacterium.

Two bacterial isolates presented increasing inhibition halo when submitted to the presence of CCCP at a concentration of only 12.5µM. Isolate P118UH changed inhibition halo to IMP from 12 mm to 22 mm. Halo diameter has been affected to two antimicrobials in P277TH: TAC (0mm - 10mm) and ATM (10mm - 18mm). The antibiogram analysis of the P16TH isolate shows growth of bacterial colonies visualized inside the inhibition halo for CPM, ATM, GEN and CIP, however the colonies they disappeared after the CCCP addition.

Concentration of 12.5 µM CCCP was also used in microdilution tests associate with different antimicrobials. Two isolates had MICs alterations for AMI. P123TH (128 µg /mL to 64 µg / mL) and P31TH (> 256 µg / mL to 32 µg / mL). For meropenem (MPM), P8TH changed the MIC from 32 µg / mL to 16 µg / mL, even harboring the *bla_{GES}* gene; P16TH increased the MIC from 8 µg / mL to 16 µg / mL after inhibitor addition. All isolates had MICs reduced for polymyxin B (POL) in the presence of CCCP (Table 3).

DISCUSSION

The efflux systems inhibition effects in Gram-negative bacteria have been increasingly studied with the aim of being able to using in treatment of infections by MDR bacterial lineages in synergy with antimicrobials already used in rational or empirical therapy [22]. CCCP has already obtained promising results in changing resistance profile to important antimicrobials, such as meropenem [21].

In our study, we found *mexA* and *mexE* genes simultaneously in all isolates analyzed, evidencing the integrity in the MexAB-OprM and MexEF-OprN efflux pumps composition, once these genes codify the channel protein of the tripartite system, corroborating with other reports [1, 12, 23].

We observed a susceptibility profile change for IMP detected by disk-diffusion test after use of CCCP. The isolate P118UH (carrying *bla_{GES}*) had an increase of 10mm in inhibition halo diameter for IMP becoming sensitive to the drug in the presence of this inhibitor. In 2016, Talebi-taher et al, described a susceptibility profile reversal for IMP in 4% of *P.aeruginosa* isolates collected from a burn

center in Iran. However, the presence of *bla*_{GES} gene may confer increasing hydrolytic activity to carbapenems [24].

Another change in susceptibility profile was observed in P277TH isolate for ATM, in which the isolate previously resistant to this drug showed an intermediate profile after CCCP addition. The *bla*_{SPM-1} gene was detected in this isolate, this finding may justify lack altering in susceptibility profile for IMP (in disk-diffusion) and for MPM (in microdilution) [6].

P16TH isolate shown the presence of bacterial colonies inside of the inhibition halo for CPM, ATM, GEN and CIP, disk-diffusion method was performed with CCCP addition, the colonies disappeared (**Figure 1**), Mei et al., 2015 detected heteroresistant *P. aeruginosa* to IMP and verified high levels of MexAB overexpression in resistant isolate when compared to sensitive isolate. The heteroresistance phenomenon has been reported since 1947 in *Haemophilus influenza*, and needs further studies to be better elucidated [25, 26].

The isolates P123TH and P31TH showed MICs reduction for AMI, but only P31TH showed a change in susceptibility profile from resistant to intermediate. Additional data on the presence of aminoglycoside modifying enzymes or RNA methyltransferases could explain more about this finding [27].

Two isolates had MICs inverse alterations for MPM. P8TH-1 (*bla*_{GES}-positive) decreased its MIC but maintained the resistant profile. In contrast, P16TH increased MIC. MIC increasing from 8 µg / mL to 16 µg / mL for MPM was previously verified by Pouranaras et al, 2005 in non-metallo-beta lactamases producing *P.aeruginosa* isolates. This report may be explained by *OprD* gene expression decreasing, which is related to carbapenems resistance [28].

Polymyxin B is a polypeptide antimicrobial with potent action against Gram-negative. However, due to toxicity (mainly nephrotoxicity) has a restriction on its use around the 1970s [29]. The increase in antimicrobial resistance has led to the return of polymyxin B or colistin use for treatment of Gram-negative MDR infections [2].

Our study demonstrated a MIC reduction for all *P.aeruginosa* isolates analyzed by microdilution. Recently, this effect has been observed with colistin in *Enterobacteriaceae*. CCCP interacted with colistin, changing the MIC 193.12 fold in mean [30]. Despite, our study showed a mean decrease in MIC of two-fold. This finding deserves further research to elucidate the dynamics of gene expression related to efflux systems and to depolarization in bacterial cell membrane by CCCP [31, 32]. According to Mohamed et al, 2016 the colistin effects on the cell wall are similar to those caused by beta-lactam antibiotics [33].

Conclusions

We thus conclude that CCCP presented several actions in the studied isolates, highlighting decrease of resistant phenotype for drugs from different classes. Although be a toxic molecule, it is chemically possible to formulate a derivative compound or similar to allow the possibility of clinical use in order to restore the existing antimicrobial action. Efflux systems inhibition in *P.aeruginosa* may be

related to the reduction of heteroresistance and to reversibility of polymyxin B-resistant profile, however, additional studies need to be carried out to better elucidate these phenomena.

Funding information

The authors received no specific grant from any funding agency.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the microbiology staff at the participating hospitals for their assistance in isolating and classifying clinical samples, and the Infection Control Practices Advisory Committee (ICPAC) staff for their help in collecting the clinical and therapeutic data from the patients.

REFERENCES

1. **Talebi-Taher M, Majidpour A, Gholami A, Rasouli-Kouhi S, Adabi M.** Role of efflux pump inhibitor in decreasing antibiotic cross-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in a burn hospital in Iran. *J Infect Dev Ctries* 2016;10:600–604.
2. **Esposito S, Simone G De.** Update on the main MDR pathogens : prevalence and treatment options. *Le Infez Med* 2017;4:301–310.
3. **Codjoe F, Donkor E.** Carbapenem Resistance: A Review. *Med Sci* 2017;6:1.
4. **Neves PR, Mamizuka EM, Levy CE, Lincopan N.** *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. *J Bras Patol e Med Lab* 2011;47:409–420.
5. **Silva Júnior VV da, Ferreira LD, Alves LR, Cabral AB, Jácome PRL de A, et al.** Detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* harboring blaGES-1 and bla GES-11 in Recife, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2017;50:764–768.
6. **Magalhães V, Lins AK, Magalhães M, Tropical DDM, Ciências C De, et al.** Metallo- β - lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in hospitals in recife , pe , brazil. *Brazilian J Microbiol* 2005;36:123–125.
7. **Jácome PRLDA, Alves LR, Cabral AB, Lopes ACS, Maciel MAV.** First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:4990.
8. **Picão RC, Gales AC.** Beta-Lactamases de Espectro Ampliado (ESBL) em *Pseudomonas*

- aeruginosa*: Pesadelo ou só Imaginação? *Prática Hosp Infectol* 2007;79–84.
9. **Poole K.** *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol* 2011;2:65.
 10. **Nikaido H, Takatsuka Y.** Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochim Biophys Acta* 2009;1794:769–81.
 11. **Piddock LJ V.** Multidrug-resistance efflux pumps — not just for resistance. *Nat Publ Gr* 2006;4:629–636.
 12. **Askoura M, Mottawea W, Abujamel T, Taher I.** Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Libyan J Med* 2011;6:1–8.
 13. **Lamers RP, Cavallari JF, Burrows LL.** The efflux inhibitor phenylalanine-arginine beta-naphthylamide (PA β N) permeabilizes the outer membrane of gram-negative bacteria. *PLoS One*;8. Epub ahead of print January 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0060666.
 14. **Ikonomidis A, Tsakris A, Kanellopoulou M, Maniatis AN, Pournaras S.** Effect of the proton motive force inhibitor carbonyl cyanide-m- chlorophenylhydrazone (CCCP) on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Lett Appl Microbiol* 2008;47:298–302.
 15. **Mombeshora M, Mukanganyama S.** Development of an accumulation assay and evaluation of the effects of efflux pump inhibitors on the retention of chlorhexidine digluconate in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *BMC Res Notes* 2017;10:1–9.
 16. **Wayne P.** *CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.* 2017.
 17. **Ozer B, Duran N, Onlen Y, Savas L.** Efflux pump genes and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lower respiratory tract infections acquired in an intensive care unit. *J Antibiot (Tokyo)* 2012;65:9–13.
 18. **Wang C, Cai P, Chang D, Mi Z.** A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:1261–2.
 19. **Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-sanchez A, Biddle JW, et al.** Novel Carbapenem-Hydrolyzing Beta-Lactamase , KPC-1 , from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1151–1161.
 20. **Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS.** Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:699–702.

21. **Pournaras S, Maniati M, Spanakis N, Ikonomidis A, Tassios PT, et al.** Spread of efflux pump-overexpressing, non-metallo- β -lactamase-producing, meropenem-resistant but ceftazidime-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* in a region with blaVIMendemicity. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:761–764.
22. **Sinha D, Pandey S, Singh R, Tiwari V, Sad K, et al.** Synergistic efficacy of Bisbenzimidazole and Carbonyl Cyanide 3-Chlorophenylhydrazine combination against MDR bacterial strains. *Sci Rep* 2017;7:1–14.
23. **Adabi M, Talebi-taher M, Arbabi L, Afshar M, Fathizadeh S, et al.** Spread of Efflux Pump Overexpressing-Mediated Fluoroquinolone Resistance and Multidrug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by using an Efflux Pump Inhibitor. *Infect Chemother* 2015;47:98–104.
24. **Bontron S, Poirel L, Nordmann P.** In vitro prediction of the evolution of GES-1 β -lactamase hydrolytic activity. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:1664–1670.
25. **Alexander BYHE, Leidy G.** Mode of action of streptomycin on type b H. influenzae. *J Exp Med* 1947;85:607–621.
26. **El-Halfawy OM, Valvano MA.** Antimicrobial heteroresistance: An emerging field in need of clarity. *Clin Microbiol Rev* 2015;28:191–207.
27. **Michalska AD, Sacha PT, Ojdana D, Wieczorek A, Tryniszewska E.** Prevalence of resistance to aminoglycosides and fluoroquinolones among *Pseudomonas aeruginosa* strains in a University Hospital in Northeastern Poland. *Brazilian J Microbiol* 2014;45:1455–1458.
28. **Arabestani, mohammad reza; Rajabpour, MOjtaba; Mashouf, Rasoul Yousefi; Alikhani MYM.** Expression of Efflux Pump MexAB-OprM and OprD of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Clinical Samples using qRT-PCR. *Arq Iran Med* 2015;18:102–108.
29. **MENDES CAC, Burdmann EA.** Polimixinas - revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. *Rev Assoc Med Bras* 2009;55:752–759.
30. **Sekyere JO, Amoako DG.** Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine (CCCP) reverses resistance to colistin, but not to Carbapenems and tigecycline in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Front Microbiol*;8. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00228.
31. **Ni, Wentao; Li, Yanjun; Guan, Jie; Zhao, Jin; Cui, Junchang; Wang, Rui ; Liu Y.** Effects of efflux pump inhibitors on Resistance in Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:3215–3218.

32. **Park YK, Ko KS.** Effect of carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) on killing *Acinetobacter baumannii* by colistin. *J Microbiol* 2015;53:53–59.
33. **Mohamed YF, Abou-Shleib HM, Khalil AM, El-Guink NM, El-Nakeeb MA.** Membrane permeabilization of colistin toward pan-drug resistant gram-negative isolates. *Brazilian J Microbiol* 2016;47:381–388.

FIGURES AND TABLES

Table 1. Primers used in the research efflux genes *mexA* and *mexE*, and beta-lactamases genes *bla_{GES}*, *bla_{KPC}*, *bla_{SPM-1}*.

Gene	Sequence (5´ - 3´) (F- Foward, R- Reverse)	Annealing temperature/ Reference
<i>mexA</i>	(F) CGACCAGGCCGTGAGCAAGCAC (R) GGAGACCTTCGCCGCGTTGTCGC	71°C / [17]
<i>mexE</i>	(F) CCAGGACCAGCACGAACTTCTTGC (R) CGACAACGCCAAGGGCGAGTTCAC	69°C/ [17]
<i>bla_{GES}</i>	(F) ATGCGCTTCATTACGCAC (R) CTATTTGTCCGTGCTCAGG	55°C/ [18]
<i>bla_{KPC}</i>	(F) TGTCAGTGTATCGCCGTC (R) CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	58°C/ [19]
<i>bla_{SPM-1}</i>	(F) CCTACAATCTAACGGCGACC (R) TCGCCGTGTCCAGGTATAAC	40°C/ [20]

Table 2. Characteristics of the *P.aeruginosa* MDR isolates in relation to the clinical sample type, Inpatient department, gene identified and resistance profile.

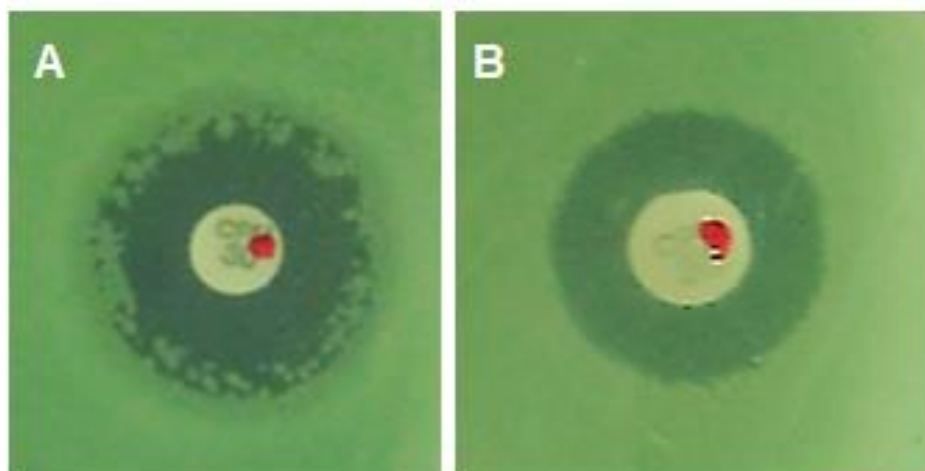
Isolate number/gene identified	Inpatient department	Clinical sample type	Antimicrobial resistance profile by disk- diffusion
P118UH/ <i>bla</i> _{GES} , <i>mexA</i> , <i>mexE</i>	Internal medicine ward	Right foot fragment	CPM, IMP, ATM, GEN, AMI,CIP, TAC
P868CH/ <i>bla</i> _{kpc} , <i>mexA</i> , <i>mexE</i>	Intensive care unit	Blood	CPM, IMP, ATM, GEN, AMI,CIP, TAC
P1398CH/ <i>bla</i> _{kpc} , <i>mexA</i> , <i>mexE</i>	Intensive care unit	Tracheal aspirate	CPM, IMP, ATM, GEN, AMI,CIP, TAC
P8TH/ <i>bla</i> _{GES} , <i>mexA</i> , <i>mexE</i>	Intensive care unit	Tracheal aspirate	CPM, IMP, ATM, GEN, AMI,CIP, TAC
P16TH/ <i>mexA</i> , <i>mexE</i>	Intensive care unit	Blood	CPM, ATM, GEN, AMI,CIP, TAC
P31TH/ <i>mexA</i> , <i>mexE</i>	Intensive care unit	Tracheal aspirate	ATM, GEN, AMI,CIP, TAC
P123TH/ <i>bla</i> _{GES} , <i>mexA</i> , <i>mexE</i>	Surgical unit	Surgical wound	CPM, IMP, ATM, GEN, AMI,CIP, TAC
P277TH/ <i>bla</i> _{SPM-1} , <i>mexA</i> , <i>mexE</i>	Intensive care unit	Tip central venous catheter	CPM, IMP, ATM, GEN, AMI,CIP, TAC

bla*_{GES}**:Beta lactamase GES; ***bla*_{SPM-1}**:metallo beta lactamase SPM-1;bla*_{kpc}**: beta lactamase KPC; **UH**:University Hospital; **CH**:Cancer Hospital; **TH**:Tertiary Hospital; **CPM**:cefepime; **IMP**:imipenem; **CIP**:ciprofloxacin; **ATM**:aztreonam; **TAC**:ticarcillin/clavulanate; **GEN**: gentamicin; **AMI**:amikacin;

Table 3. MICs results for Polymyxin B in *P. aeruginosa* MDR isolates in the absence and presence of CCCP

Isolate number	MIC ($\mu\text{g/mL}$) /Antimicrobial susceptibility profile	MIC ($\mu\text{g/mL}$) + CCCP 12,5 μM / Antimicrobial susceptibility profile
P118UH	4/ Intermediate	2/ Susceptible
P868CH	4/ Intermediate	1 / Susceptible
P1398CH	4/ Intermediate	2 / Susceptible
P8TH	4/ Intermediate	2 / Susceptible
P16TH	8/ Resistant	4/ Intermediate
P31TH	8/ Resistant	4/ Intermediate
P123TH	8/ Resistant	4/ Intermediate
P277TH	4/ Intermediate	2 / Susceptible

Figure 1. Occurrence of heteroresistance for CPM in the P16TH isolate and absence of the phenomenon after addition of CCCP. Note the presence of colonies within the inhibition halo (A). Disappearance of colonies after addition of CCCP (B).



APÊNDICE B- ARTIGO 2 VERSÃO EM INGLÊS

Evaluation of carbonyl cyanide-3-chlorophenylhydrazone effect on efflux pumps inhibition and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by quantum dots conjugated to meropenem

Valdemir V. Silva Júnior.^{1*}, Bruno L. Raposo², Ana C. S. Lopes¹, Adriana Fontes², Paulo E. Cabral Filho^{2*}, Maria A. V. Maciel¹

¹Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brazil

²Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brazil.

***Corresponding author:** Valdemir V. Silva Júnior, Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, UFPE, 50670-901 Recife, PE, Brazil. e-mail: jrv1_1@hotmail.com.

ABSTRACT

Background: Multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* hospital infections are a worldwide public health problem. Carbapenem resistance has increased in recent years, both efflux systems and biofilm formation are mechanisms related to ineffectiveness of these drugs. **Methods:** In this study, we evaluate the role of carbonyl cyanide-3-chlorophenylhydrazone (CCCP) on efflux pumps inhibition and biofilm formation in *P. aeruginosa* strains by quantum dots conjugated to meropenem (QD-MPM). Initially, QDs were covalently conjugated to MPM and the conjugates were optically characterized. Then, a MDR *P. aeruginosa* isolate (P118) and also a control sensitive strain (ATCC Pa27853) were incubated with QD-MPM conjugates. The P118 isolate was subjected to the same procedure with previous CCCP incubation. Molecular analysis of *mexA* and *mexE* genes and the susceptibility profile by disk-difusion was performed in both bacterial strains. **Results:** P118 and ATCC Pa27853 bacteria presented *mexA* and *mexE* genes expression despite this only the P118 isolates confirmed the MDR profile, including meropenem. Fluorescence microscopy images showed an efficient labeling of both sensitive and resistant bacteria, however, only resistant isolate presented fluorescent cell agglomerates, suggesting a biofilm formation. The efflux inhibitor addition changed the labeling profile in the resistant isolate, and the absence of agglomerates was observed, indicating no biofilm formation. **Conclusion:** Therefore, this study verified the efficiency of QD-MPM conjugates to study

the biofilm formation, or its inhibition, before and after CCCP addition. QDs conjugated to antimicrobials can be used as a tool to study multidrug-resistant bacterial strains on biofilm formation, and also monitor the efficiency of efflux inhibitor molecules.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, efflux pumps, biofilm, quantum dots, meropenem.

Background

Infections related to health care represent one of the main causes of morbidity and mortality in hospitalized patients and play an important public health problem. Several bacterial species have shown reduced susceptibility to a broad antimicrobials variety. Among these species, a group of pathogens named as acronym “ESKAPE” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter* spp) is highlighted [1].

Carbapenems, especially imipenem (IMP) and also meropenem (MPM) are widely prescribed drugs for the treatment of multidrug-resistant (MDR) *P. aeruginosa* infections, due to the broad antibacterial spectrum [2]. Efflux systems overexpression in *P. aeruginosa* may occur when there is the use of carbapenems during the infection treatment. This phenomenon is more frequent for MPM than IMP and plays an important role in the resistance mechanisms against these drugs[2,3].

Furthermore, the biofilm formation in *P. aeruginosa* is also an important mechanism of virulence and resistance, because the bacteria can protect themselves from the antimicrobials action [4]. In this cellular agglomerate, this pathogen has a particular behavior and communication characteristics, constituting a “quorum sensing” [5].

Efflux inhibitors have been also extensively studied by molecular biology in order to reestablish antimicrobial effect of distinct drugs in MDR isolates, indicated as new potential synergistic agents of antimicrobials prescribed in clinical practice [6]. The carbonyl cyanide-3-chlorophenylhydrazone (CCCP) is among one of the most studied efflux inhibitors, it is considered an uncoupler of proton motive force (based on H^+ ions flow across the cytoplasmic membrane and bacterial cell wall outer membrane) required for efflux systems operation. Thus, the action of CCCP can restore antimicrobial activity since it raises the drug intracellular concentration [7,8]. However, the CCCP effects at a cellular and molecular level and on the biofilm formation are still poorly understood.

The comprehension of these processes can be accessed by the use of fluorescence-based techniques with fluorophores, such as the quantum dots (QDs).

QDs are fluorescent semiconductor nanocrystals with unique optical properties, such as broad absorption band, high resistance to photobleaching, and an active surface to bioconjugations with proteins or even with drugs [9–11]. These nanocrystals conjugated to biomolecules have been used for several purposes in nanomedicine related to the investigation of cellular events, for cell biology comprehension of diverse pathologies, and also to target molecular identification, such as carbohydrates or receptors, in cells and tissues [12,13]. QDs can be conjugated to antimicrobials in an attempt to study the interaction of these molecules with bacteria, in order to better understand the contribution of different mechanisms as biofilm formation and the role of efflux pumps in antimicrobial resistance of MDR clinical isolates.

In this context, the aim of this study was to conjugate QDs to meropenem not only to evaluate the labeling profile in *P. aeruginosa* sensitive strain (ATCC Pa27853) and in a MDR isolate (P118), but also the effects of the efflux pump inhibitor carbonyl cyanide-3-chlorophenylhydrazone on resistant *P. aeruginosa* strains and its influence on the biofilm formation.

Methods

Bacterial isolates

The *P. aeruginosa* isolate (P118) used in this study was obtained during standard patient care in 2012 from a university hospital in Recife, Brazil, showed a multidrug-resistant profile by microdilution, including MPM. *P. aeruginosa* ATCC strain Pa27853, known to be sensitive to MPM, was used as a control. Bacterial strains were kept stock frozen at -20 °C in Tryptone soy broth (TSB) with 20% glycerol in *Laboratório de Bacteriologia e Biologia molecular* (LBBM), Department of Tropical Medicine of Federal University of Pernambuco.

Bacterial DNA extraction of polymerase chain reaction (PCR) for *mexA* and *mexE*

Bacterial isolates were incubated at 37 °C for 18-24 h in tubes containing Luria Bertani (LB) broth. After bacterial growth, total deoxyribonucleic acid (DNA) extraction was performed using Brazol (LGC-Biotecnologia, Brazil) according to the manufacturer's instructions. The extracted DNA was

resuspended in Tris-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution and quantified by spectrophotometry (NanoDrop 2000) at a wavelength of 260 nm.

The Polymerase Chain Reaction (PCR) to search the genes encoding MexA and MexE channel proteins from MexAB-OprM and MexEF-OprN efflux pump systems was performed using specific primers according to Ozer et al., 2012: CGACCAGGCCGTGAGCAAGCAC (F) and GGAGACCTTCGCCGCGTTGTCGC (R) for *mexA* gene; CCAGGACCAGCACGAACTTCTTGC (F) and (F) CGACAACGCCAAGGGCGAGTTCAC (R) for *mexE* gene [14]. Reactions were prepared in a total volume of 25 μ L per tube, comprising 10 ng of genomic DNA, 10 pmol of each primer, 1x buffer (final concentration), 200 μ M of deoxyribonucleotide triphosphate (Ludwig Biotec), 2 mM $MgCl_2$ and 1U *Taq* DNA polymerase (Promega, USA).

The reaction was taken to the thermocycler (Biosystems) and follows the cycles: Initial denaturation (94 °C for 1 min), 35 cycles (94 °C for 1 min - denaturation), 45 seconds on specific annealing temperature to each primer (71 °C for *mexA* and 69 °C for *mexE*) and extension for 45 seconds at 72 °C. A final extension at 72 °C for 10 min, after 35 cycles, was performed. Each reaction contained DNA of control strains *P.aeruginosa* (ATCC Pa27853).

Efflux pumps inhibition with CCCP

CCCP (Sigma-Aldrich) solution was prepared from the powdered substance and dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) in order to reach a concentration of 100 mM. To perform efflux inhibition, the CCCP solution was incorporated to LB broth medium at a final concentration of 12.5 μ M (adapted from Pournaras et al., 2005)[15]. The isolate P118 inoculum was maintained on aerobiosis in a bacteriological incubator at 37 °C for 24 h in the presence of inhibitor.

Synthesis and optical characterization of CdTe quantum dots

The synthesis of Cadmium Telluride (CdTe) QDs stabilized with 3-mercaptopropanoic acid (MSA) has previously been described by Cabral Filho et al. 2016. Briefly, Cd^{2+} /MSA solution was prepared, composed from Cadmium precursors ($CdCl_2$ - 0.5 mmol) and MSA (0.6 mmol), at pH of approximately 10.5 raised by using NaOH (2 M). In a second step, metallic tellurium (0.1 mmol) was reduced by using the sodium borohydride ($NaBH_4$ - 3 mmol) at a high pH and in an inert atmosphere of nitrogen (N_2). After reduction, Te^{2-} was added in Cd^{2+} /MSA solution to form nanoparticles under

constant stirring and heating (90 - 100 °C) during 4 h. The molar ratio used was 5:1:6 for Cd:Te:MSA, respectively.

After synthesized, QDs were optically characterized by absorption and emission spectroscopy using, spectrophotometer UV-Vis 1800 (Shimadzu) and a spectrometer LS55 (PerkinElmer), respectively.

QDs conjugation to meropenem

Initially, the QDs (0.8 μ M) pH was adjusted to nearly 5.5 by using MSA (4.9% w/v). Then, N-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC - 1.0 mM) and N-hydroxysulfosuccinimide sodium salt (Sulfo-NHS - 1.2 mM) were added to promote covalent conjugation between QDs and meropenem trihydrate (MPM - 383.5 Daltons - [10 μ M]) in a proportion of 1:500 (QDs particles: MPM molecules).

After MPM addition the QD-MPM system was kept under stirring rotation at 360° for 30 in a Mini Rotator Bio RS-24 (BioSan), and then stored at 4-8 °C for 4 days. After conjugation process, the QD-MPM system was characterized by emission and absorption spectroscopies and compared to the bare QDs.

Incubation of bacterial inocula with QD-MPM conjugates

P. aeruginosa P118 and ATCC Pa27853 previously cultured on cetrimide agar and free-contamination were inoculated in 2 mL of LB broth at 37 °C for 24 h.

Conjugates used for all bacteria labeling and evaluating the biofilm formation had the carboxyl activated groups blocked by TRIS base according to previously procedure performed by Cabral Filho et al. 2016, with some modifications. For this, 500 μ L of QD-MPM conjugates were blocked with 25 μ L TRIS base (15 mg·mL⁻¹).

Firstly, to evaluate the conjugate effectiveness, 50 μ L of P118 inoculum was added in 50 μ L of QD-MPM and the system was kept under constant agitation for 1 h at 25 °C. After the incubating period, 2 washes were accomplished by centrifuging the system at 1400 xg for 5 min.

After removing the supernatant, the bacteria were diluted in NaCl (0.9% w/v) and observed under conventional fluorescence microscope *Leica* (DMI4000B) with a 63x objective. The samples

were excited by a bandpass (BP) filter at 560/40 nm and the fluorescence was collected in an emission BP filter at 645/75 nm.

To increase biofilm production and to verify a greater difference between resistant and sensitive strains an MPM excess was added to bacteria. For this, 50 μL of P118 (or ATCC Pa27853) inoculum was incubated with 50 μL of MPM ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) and 50 μL of QD-MPM conjugates for 1 h at 25 °C, after the incubation period, the systems were washed and the cells were resuspended according to procedures previously performed.

To evaluate the efflux pump inhibition, the isolate P118 inoculum in the presence of CCCP inhibitor was also incubated with the QD-MPM system plus an excess of MPM, as previously described. After washes, the bacteria were analyzed under fluorescence microscopy by the same conditions described above.

Results and Discussion

Amplification of genes related to efflux systems

The *mexA* and *mexE* genes were detected by PCR in both strains, P118 isolate, and ATCC Pa27853. The channel proteins of MexAB-OprM and MexEF-OprN efflux systems are codified for these genes. The presence of these genes indicates only the efflux systems integrity however, the overexpression of them can contribute for the antimicrobial resistance profile [15]. MexAB-OprM and MexEF-OprN belong to Resistance Nodulation Division (RND) family and are responsible for the expulsion of several antimicrobials classes including carbapenems, preferably MPM [16].

Optical characterization of MPM, QDs and QD-MPM conjugates

Figure 1 shows the MPM emission and absorption spectra. The maximum absorption peak was set at 300 nm, which according to Elragehy et al, 2008 refers to non-degraded MPM form [17]. After excitation at 300 nm, a discrete fluorescence was observed with maximum intensity peak at 500 nm.

Please, insert Figure 1

Figure 2 shows emission and absorption spectra of bare CdTe QDs and QD-MPM conjugates. According to optical characterization, QDs showed the first absorption peak at 585 nm. The nanoparticle average diameter was estimated as approximately 3.4 nm [18]. Moreover, taking into account the absorbance at the first maximum absorption peak, the CdTe QDs molar extinction coefficient, and the Lambert-Beer equation, QD concentration was estimated as approximately 4.7 μM [19].

The emission spectrum of QDs showed a maximum peak at 627 nm indicating fluorescence in the red spectral region, and a full width at a half maximum (FWHM) of approximately 56 nm, indicating a narrow emission spectrum when compared to organic dyes that have FWHM around 80 - 100 nm [20].

After conjugation, no significant difference in the QD absorption spectrum was observed, and the first peak remained at 585 nm. Absorption peaks of MPM, in UV region, were not visualized, predominating nanoparticle absorbance profile. On the other hand, the emission spectrum of conjugates showed a redshift of about 26 nm, thus displaying a maximum emission peak at 653 nm, as shown in Figure 2b. QD-MPM conjugate emission spectrum presented an FWHM at 48 nm corresponding to FWHM reduction of approximately 8 nm when compared to bare QDs (FWHM = 56 nm). These findings indicate that MPM was conjugated on the QD surface.

In addition, the conjugation leads to a decrease of approximately 50% in fluorescence intensity when compared to bare QDs, which did not comprise the signal detection, as already observed in previous studies for QDs conjugated to proteins [12,21]. The fluorescence analysis was performed under excitation at 488 nm, once in this wavelength, the MPM has no absorption and consequently no emission. The QD-MPM conjugates remained stable and with a high photoluminescence for at least one month.

Please, insert Figure 2

P118 and ATCC Pa27853 strains labeling by QD-MPM conjugates

Initially, after incubation of QD-MPM conjugates with MPM resistant P118 isolate, it was observed the biofilm formation, corroborating the resistance mechanism of this strain in the presence of antimicrobial [4]. Figure 3 shows several P118 isolate cells labeled in red by QD-MPM conjugates with the presence of cell agglomerates (microcolonies), indicating biofilm formation as the first signal

of drug resistance. According to these results, it can be suggested that biofilm formation was not affected by QD-MPM conjugates, allowing the study of CCCP effects on this mechanism. It is noteworthy that no fluorescence was detected in bacteria without the presence of QD-MPM conjugates when the fluorescence was excited by BP 560/40 nm filter and collected by BP 645/75 nm.

Please, insert Figure 3

These results revealed that QD-MPM conjugates can be a tool to study the biofilm formation. Thus, we incubated P118 isolate with MPM excess, before adding QD-MPM conjugates, to observe the biofilm formation increase. Figure 4 displays a considerable growth of the biofilm, as well as in the number of bacteria labeled by conjugates, when compared to the Figure 3. Furthermore, bacteria remained alive and the biofilm continued to rise.

Please, insert Figure 4

Then, ATCC Pa27853 MPM-sensitive strain was incubated under the same conditions with MPM in excess. In Figure 5, no biofilm formation was observed and there is a decrease in the cell motility. The labeling profile was more uniform in ATCC Pa27853 cells when compared to the P118 MDR isolate (Fig. 3), indicating that there was a high concentration of QD-MPM conjugates inside the strain sensitive cells and/or on their outer cell membranes. The excess MPM may have induced the death of this sensitive strain (ATCC Pa27853) more quickly, decreasing the number of labeled bacterial cells.

Please, insert Figure 5

Labeling analysis of isolate P118 after CCCP addition

Since QD-MPM conjugates were able to differentiate resistant isolate P118 and ATCC Pa27853 sensitive strain, they were also used as a probe to identify possible changes in P118 isolate after inhibition of efflux systems by CCCP.

After the CCCP addition (Fig. 6), the P118 labeling profile was similar to ATCC Pa27853 (Fig. 5), also indicating a high intracellular concentration of QD-MPM conjugates inside the cells and/or on the outer bacterial membrane. However, a higher number of P118 labeled bacteria was observed. In

addition, the formation of microcolonies was not observed (even with an excess of MPM), indicating no biofilm formation, suggesting that CCCP promoted a reduction of MPM resistance in the isolate P118, may by inhibiting the efflux pump.

Please, insert Figure 6

Our results also suggest that efflux pumps inhibition may be performed chemically as also have been reported in other studies by using other efflux inhibitors such as PA β N and chlorpromazine [22,23]. It has been previously demonstrated in *Salmonella typhimurium* that both forms of efflux inhibition (genetic deletion or CCCP addition) are related to biofilm inhibition [23]. An *in vivo* model using *Galleria mellonella* larvae infected by resistant *P. aeruginosa* demonstrated the best efficacy of efflux inhibitors in combination with levofloxacin when compared to monotherapy [24].

The optical density measurement is the most used method to identify the biofilm formation [25] and elucidate the mechanism of input or output of the antimicrobials in the bacterial cells. In a previous work, QD conjugated to curcumin was used to demonstrate the decreasing in biofilm formation in staphylococcal strains [26]. In our study, by using QDs conjugated to MPM, we were able to observe by fluorescence microscopy not only the biofilm formation, due to the direct interaction of the antimicrobial agent with the bacterial isolates, but also to visualize the absence of biofilm production by the MDR *P. aeruginosa* cells after using CCCP.

CdTe QDs conjugated to MPM was stable for at least one month, showing the same labeling profile and efficiency to differentiate between MPM resistant and sensitive strains. Thus, the sensitivity and specificity of these nanoprobes, allied to the quickness of the analysis, can be applied to study the biofilm formation of MPM resistant strains in a perspective of using antimicrobial agents combined with inhibitors in hospital infections.

Conclusion

With QD-MPM conjugates we were able to investigate changes at the cellular (cell-cell interaction in the biofilm formation) and molecular (MPM–cell interaction) level in *P. aeruginosa* strains resistant and sensitive to MPM. Moreover, it was possible to study the CCCP effects as an efflux pump inhibitor on P118 isolate, which showed a decrease in biofilm formation and changes in the bacteria cells labeling profile.

Synergism between efflux pump inhibitor and meropenem was observed by applying QD-MPM conjugates, showing that these inhibitors combined with antibiotics may be used further up in clinical practice especially to MDR bacteria. In addition, QDs conjugated to others antimicrobials may be used to investigate MDR isolates as well as to further improve the understanding of biofilm formation by fluorescence-based techniques.

Acknowledgments

The authors are grateful to *Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE) and to *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for fundings awarded and approved projects. We are still grateful to *Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica* (INCT-INFo).

Transparency declarations

None to declare.

Author contributions

VVSJ participated in all experiments involved in the study; BLR and PECF synthesized and characterized the QDs and conjugates; BLR, PECF and AF analyzed, discussed the bioconjugation and interpreted the bacterial labeling; ACSL and MAVM conceived and designed the experiments. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors confirm that there are no conflicts of interest in this work.

References

1. Esposito S, Simone G De. Update on the main MDR pathogens : prevalence and treatment options. *Le Infez Med.* 2017;4:301–10.
2. Pan YP, Xu YH, Wang ZX, Fang YP, Shen JL. Overexpression of MexAB-OprM efflux pump in

carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Arch Microbiol. Springer Berlin Heidelberg; 2016;198:565–71.

3. Codjoe F, Donkor E. Carbapenem Resistance: A Review. Med Sci [Internet]. 2017;6:1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29267233><http://www.mdpi.com/2076-3271/6/1/1>

4. Skariyachan S, Sridhar VS, Packirisamy S, Kumargowda ST, Challapilli SB. Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. Folia Microbiol (Praha) [Internet]. Folia Microbiologica; 2018; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29352409>

5. Fong J, Zhang C, Yang R, Boo ZZ, Tan SK, Nielsen TE, et al. Combination Therapy Strategy of Quorum Quenching Enzyme and Quorum Sensing Inhibitor in Suppressing Multiple Quorum Sensing Pathways of *P. aeruginosa*. Sci Rep [Internet]. Springer US; 2018;8:1–11. Available from: www.nature.com/scientificreports

6. Sekyere JO, Amoako DG. Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine (CCCP) reverses resistance to colistin, but not to Carbapenems and tigecycline in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. Front Microbiol. 2017;8.

7. Ikonomidis A, Tsakris A, Kanellopoulou M, Maniatis AN, Pournaras S. Effect of the proton motive force inhibitor carbonyl cyanide-m- chlorophenylhydrazine (CCCP) on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Lett Appl Microbiol. 2008;47:298–302.

8. Mombeshora M, Mukanganyama S. Development of an accumulation assay and evaluation of the effects of efflux pump inhibitors on the retention of chlorhexidine digluconate in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. BMC Res Notes. BioMed Central; 2017;10:1–9.

9. Galdiero E, Siciliano A, Maselli V, Gesuele R, Guida M, Fulgione D, et al. An integrated study on antimicrobial activity and ecotoxicity of quantum dots and quantum dots coated with the antimicrobial peptide indolicidin. Int J Nanomedicine [Internet]. 2016;11:4199–211. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27384444>

10. Fontes A, Lira RB, Seabra MABL, Silva TG, Castro Neto AG, Santos BS. Quantum Dots in Biomedical Research. *Biomed Eng Tech Appl Med* [Internet]. 2012. p. 269–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/50214%0A1>.
11. Kumar, P., Sharma, S.C., Deep A. Bioconjugation of anti-estrogen alpha antibody with CdSSe/ZnS quantum dots for molecular sensing of a breast cancer antigen. *Sensors Actuators B Chem.* 2014;202:404 – 409.
12. Cabral Filho PE, Cardoso ALC, Pereira MIA, Ramos APM, Hallwas F, Castro MMCA, et al. CdTe quantum dots as fluorescent probes to study transferrin receptors in glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;1860:28–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.09.021>
13. Cunha, C.R.A.; Oliveira, A.D.P.R.; Firmino, T.V.C., Tenório, D.P.L.A.; Pereira, G.; Carvalho Jr., L.B.; Santos, B.S.; Correia, M.T.S.; Fontes A. Biomedical applications of glyconanoparticles based on quantum dots. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2018;1862:427–39.
14. Ozer B, Duran N, Onlen Y, Savas L. Efflux pump genes and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lower respiratory tract infections acquired in an intensive care unit. *J Antibiot (Tokyo)* [Internet]. 2012;65:9–13. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ja.2011.102>
15. Pournaras S, Maniati M, Spanakis N, Ikonmidis A, Tassios PT, Tsakris A, et al. Spread of efflux pump-overexpressing, non-metallo- β -lactamase-producing, meropenem-resistant but ceftazidime-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* in a region with blaVIMendemicity. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56:761–4.
16. Meletis G, Bagkeri M. *Pseudomonas aeruginosa*: Multi-Drug-Resistance Development and Treatment Options. *Infect Control.* 2013;33–56.
17. Elragehy NA, Abdel-Moety EM, Hassan NY RM. Stability-indicating determination of meropenem in presence of its degradation product. *Talanta.* 2008;77:2008.

18. Dagtepe P., Chikan V., Jasinski J., and Leppert V. Quantized Growth of CdTe Quantum Dots; Observation of Magic-Sized CdTe Quantum Dots. *J Phys Chem C*. 2007;111:14977–83.
19. Yu W. W, Qu L., Guo, W., and Peng X. Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals. *Chem Mater*. 2003;15:2854–60.
20. Resch-Genger U, Grabolle M, Cavaliere-Jaricot S, Nitschke R NT. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat Methods*. 2008;5:2008.
21. Cunha CRA, Andrade CG, Pereira MIA, Cabral Filho PE, Carvalho LB, Coelho LCBB, et al. Quantum dot–Cramoll lectin as novel conjugates to glycobiology. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. Elsevier; 2018;178:85–91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.10.020>
22. Lamers RP, Cavallari JF, Burrows LL. The efflux inhibitor phenylalanine-arginine beta-naphthylamide (PAβN) permeabilizes the outer membrane of gram-negative bacteria. *PLoS One* [Internet]. 2013 [cited 2014 May 23];8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3609863&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
23. Baugh S, Phillips CR, Ekanayaka AS, Piddock LJ V, Webber M a. Inhibition of multidrug efflux as a strategy to prevent biofilm formation. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69:673–81.
24. Adamson DH, Krikstopaityte V, Coote PJ. Enhanced efficacy of putative efflux pump inhibitor/antibiotic combination treatments versus MDR strains of *Pseudomonas aeruginosa* in a *Galleria mellonella* in vivo infection model. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70:2271–8.
25. Stiefel P, Rosenberg U, Schneider J, Mauerhofer S, Maniura-Weber K RQI. Is biofilm removal properly assessed? Comparison of different quantification methods in a 96-well plate system. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100:4135–45.
26. Singh AK, Prakash P, Singh R, Nandy N, Firdaus Z, Bansal M, et al. Curcumin quantum dots mediated degradation of bacterial biofilms. *Front Microbiol*. 2017;8:1–17.

FIGURES

Fig. 1 Absorption (full line) and emission (dashed line) spectra of MPM. The emission spectrum was acquired under $\lambda_{\text{exc}} = 300$ nm.

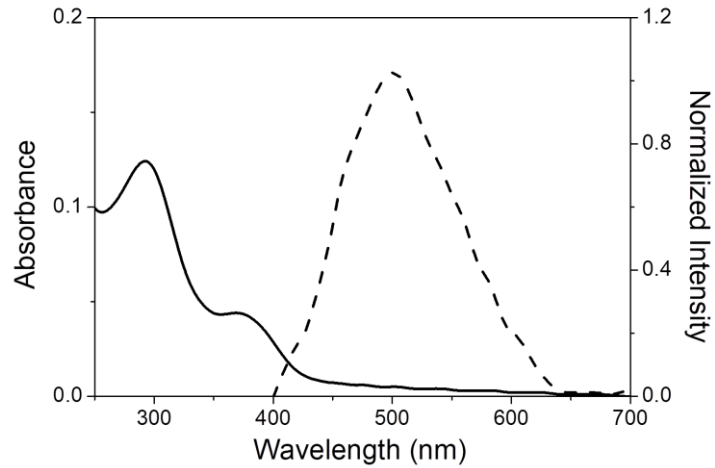


Fig. 2 Optical characterization of QD and QD-MPM conjugates. In (a) is observed the absorption (solid line) and the emission (dashed line) of the bare QD. In (b) are shown the emission of bare QD (solid line) and QD-MPM conjugates (dashed line), $\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm.

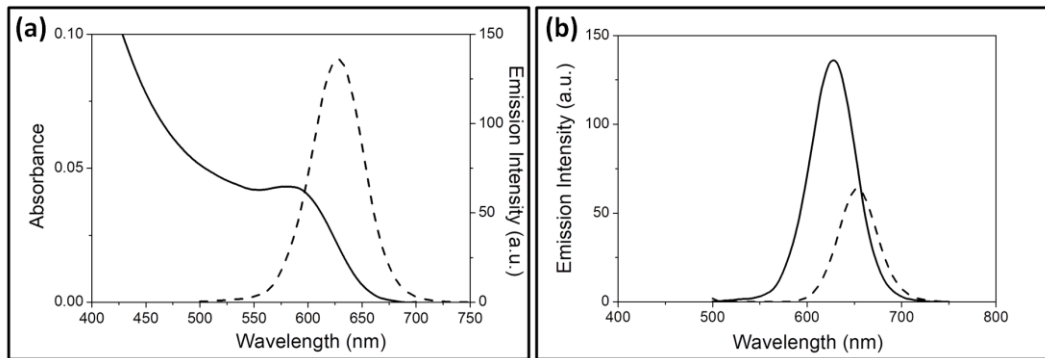


Fig. 3 Fluorescence microscopy images show P118 isolate incubated with QD-MPM conjugates. In (a) fluorescence image with emission in red (BP 645/75 nm filter) and in (b) overlap images of the red emission and phase contrast microscopy. Scale bar: 25 μm .

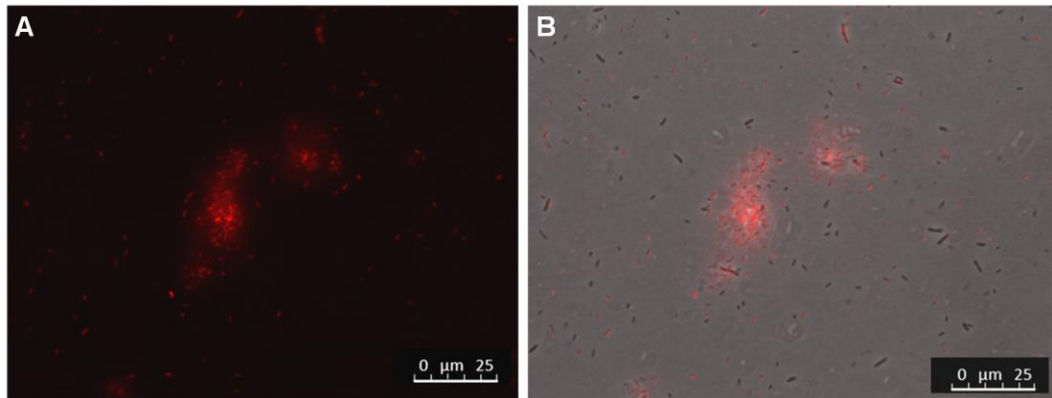


Fig. 4 Fluorescence microscopy images of P118 isolate incubated with MPM excess plus QD-MPM conjugates. Scale bar: 25 μm .

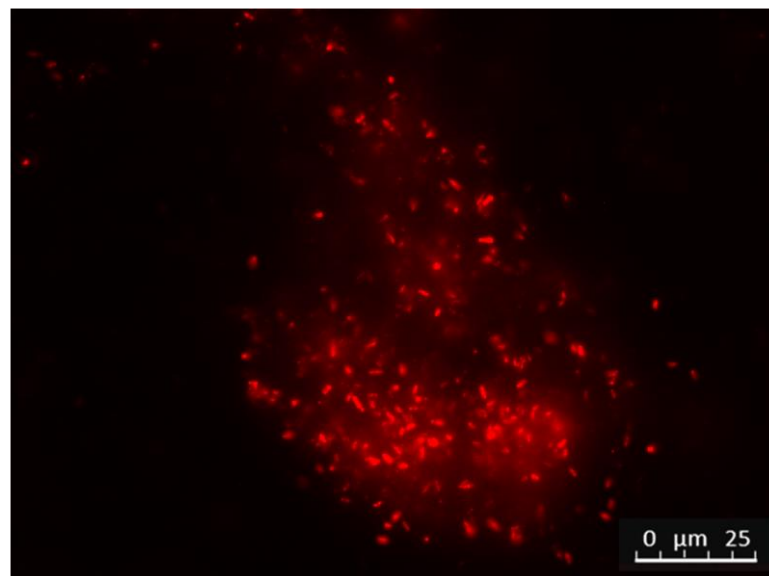


Fig. 5 Fluorescence microscopy images of ATCC Pa27853 strain incubated with QD-MPM conjugates plus MPM in excess. In (a) fluorescence image with emission in red /BP 645/75 nm filter) and in (b) overlap of red emission with the phase contrast microscopy. Scale bar: 25 μm .

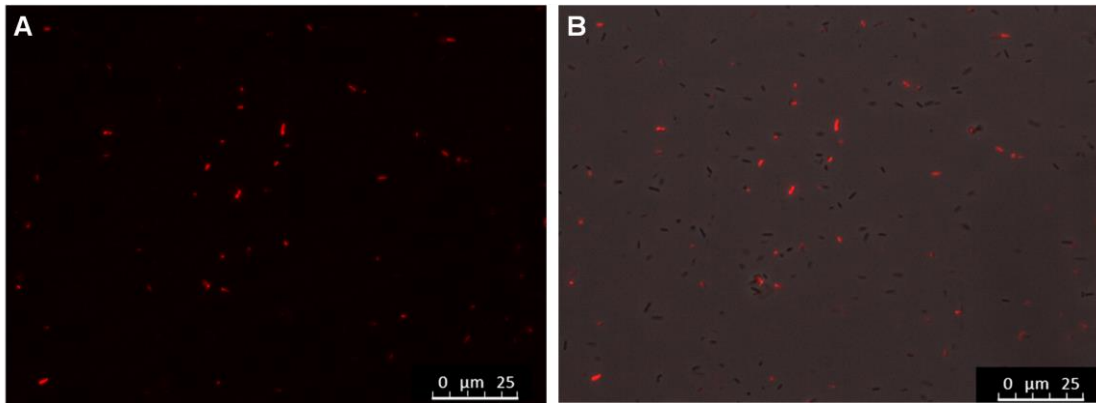
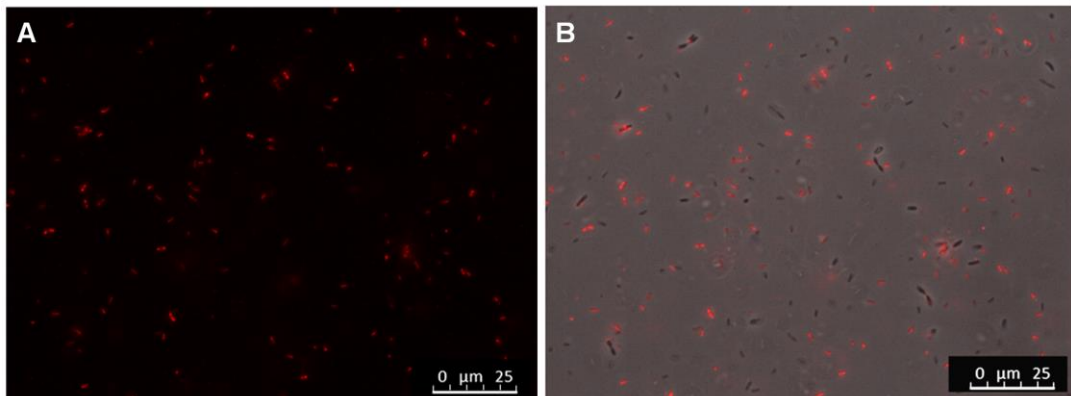


Fig. 6 Fluorescence microscopy images of P118 isolate after inhibition by CCCP incubated with QD-MPM conjugates. In (a) fluorescence image with emission in red (BP 645/75 nm filter) and in (b) overlap of red emission with phase contrast microscopy. Scale bar: 25 μm .



ANEXO A- REGISTRO NO COMITÊ DE ÉTICA Nº 009/11



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº. 111/2011 - CEP/CCS

Recife, 07 de abril de 2011

Registro do SISNEP FR – 396521

CAAE – 0490.0.172.000-11

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 009/11

Título: Caracterização fenotípico-molecular de *Staphylococcus* spp. Multiresistentes de amostras de pacientes e profissionais de saúde do Hospital das Clínicas de Pernambuco.

Pesquisador Responsável: Marcelle Aquino Rabelo

Senhor (a) Pesquisador (a):

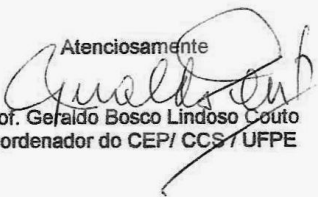
Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 06 de abril de 2011.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

- a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
- b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente


Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS/UFPE

A

Mestranda Marcelle Aquino Rabelo
Departamento de Medicina Tropical - CCS/UFPE

Av. da Engenharia, s/n – 1º Andar, Cid. Universitária, CEP 50740-600, Recife - PE, Tel/fax: 81 2126 8588;
e-mail: cepccs@ufpe.br

ANEXO B- ADENDO DO REGISTRO NO COMITÊ DE ÉTICA Nº 009/11

Departamento de Medicina Tropical
Mestranda Marcelle Aquino Rabelo
Coordenador Comissão Ética Pesquisa/CCS/UFPE
Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto

Recife, 01 de fevereiro de 2012

Prezado Coordenador Geraldo Bosco

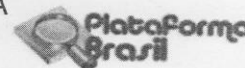
Venho através desta carta, solicitar à VSA. adicionar um termo de adendo ao projeto intitulado **“CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICO-MOLECULAR DE *Staphylococcus spp.* MULTIRESISTENTES DE AMOSTRAS DE PACIENTES E PROFISSIONAIS DE SAÚDE DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DE PERNAMBUCO”**cujo registro CEP/CCS/UFPE número 009/11, justificando que devido a problemas de processamento das amostras no Laboratório do Hospital das Clínicas da UFPE, e a necessidade de ampliar o tamanho da amostra de bactérias de interesse médico solicitamos expandir o cronograma do citado projeto para o prazo de um ano, à partir do prazo de aprovação deste termo de adendo.

Marcella Aquino Rabelo
Mestrandia Marcelle Aquino Rabelo

 Gerardo Bosco Lindoso Coutinho
Coordenador do CEPIC/SUPE

ANEXO C- PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA HOSPITAL DO CÂNCER DE PERNAMBUCO

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE GENÉTICA DE BACTÉRIAS DE INTERESSE MÉDICO PROVENIENTES DE PACIENTES DO HOSPITAL DO CÂNCER DE PERNAMBUCO

Pesquisador: PAULO SERGIO RAMOS DE ARAÚJO

Área Temática: Área 9. A critério do CEP.

Versão: 2

CAAE: 05554812.7.0000.5205

Instituição Proponente: SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER -SPCC

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 118.131

Data da Relatoria: 09/10/2012

Apresentação do Projeto:

O estudo será realizado no Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP) e a análise molecular amostras de interesse da pesquisa serão processadas Laboratório de Bacteriologia Molecular do Departamento de Medicina Tropical-UFPE que dispõe de toda infra-estrutura necessária para o desenvolvimento de todas as etapas da pesquisa.- Tipo de estudo: O estudo será do tipo prospectivo série de casos, obtidos no período do estudo

Objetivo da Pesquisa:

Analisar a diversidade microbiológica e genética de isolados de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter*, *K. pneumoniae* e *Staphylococcus* spp. dos pacientes do Hospital do Câncer de Pernambuco

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há qualquer risco à integridade dos sujeitos participantes desta pesquisa

Benefícios:

Caracterizar o perfil de resistência antimicrobiana de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter*, *K. pneumoniae* e *Staphylococcus* spp. isolados de pacientes do Hospital de Câncer de Pernambuco assim como a diversidade genética e seu papel na disseminação intrahospitalar

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo será realizado no Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP) e a análise molecular amostras de interesse da pesquisa serão processadas Laboratório de Bacteriologia Molecular do

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

UF: PE

Município: RECIFE

CEP: 50.040-000

Telefone: (813)217-8197

Fax: (813)217-8197

E-mail: cep@hcp.org.br

**SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC**



Departamento de Medicina Tropical-UFPE que dispõe de toda infra-estrutura necessária para o desenvolvimento de todas as etapas da pesquisa.- Tipo de estudo: O estudo será do tipo prospectivo série de casos, obtidos no período do estudo.- Amostras Clínicas: As amostras clínicas obtidas dos pacientes serão processadas no laboratório referência do HCP (CIAC), e as informações a respeito das características dos pacientes serão coletadas através da consulta de prontuários, com objetivo de obter informações a respeito de antibioticoterapia e uso de dispositivos invasivos, por exemplo.- Tipo de amostragem e definição do tamanho da amostra: As amostras dos pacientes serão coletadas de acordo com os procedimentos padrões, utilizados no HCP para ponta de cateter, drenos, sangue, abscesso, ferida operatória e secreções diversas. . Desta forma, a pesquisa visa atingir todos os isolados bacterianos que forem identificados como Staphylococcus spp., espécies de P. aeruginosa, oriundas dos setores do HCP no período de julho de 2012 a dezembro de 2012.-

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O termo de consentimento está adequado

Recomendações:

Projeto aprovado

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto foi aprovado após a realização das alterações solicitadas

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

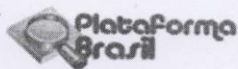
Município: RECIFE

Telefone: (813)217-8197

Fax: (813)217-8197

E-mail: cep@hcp.org.br

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC



RECIFE, 09 de Outubro de 2012

Assinador por:
GLAUBER MOREIRA LEITAO
(Coordenador)

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (813)217-8197

Fax: (813)217-8197

E-mail: cep@hcp.org.br

ANEXO D- CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 1 NA REVISTA JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY

Submission Confirmation for Journal of Medical Microbiology article JMM-D-18-001
[EMID:1371841d10e17d86]

E JMM <em@editorialmanager.com>
Hoje, 22:09
Você

CC: ju-biomed@hotmail.com, jailtonlobo@hotmail.com, psergiora@gmail.com, ana.lopes.ufpe@gmail.com, amelia57@g

Ms. No. JMM-D-18-00147

Susceptibility profile changing for Polimixin B in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with use of Carbonyl Cyan Chlorophenylhydrazone efflux pump inhibitor

Valdemir V. Silva Júnior; Jussyêgles N.P Pereira; Jailton L.C Lima; Paulo S.R Araújo; Ana C.S Lopes; Maria A.V Maciel

Dear Dr. SILVA JÚNIOR,

Your submission entitled "Susceptibility profile changing for Polimixin B in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* Cyanide-3 Chlorophenylhydrazone efflux pump inhibitor" has been received by Journal of Medical Microbiology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <https://jmm.editorialmanager.com/>.

Your manuscript reference number is JMM-D-18-00147. Please use this in all correspondence relating to this manuscript.

Thank you for submitting your work to Journal of Medical Microbiology.

Yours sincerely,

Journal of Medical Microbiology

IMPORTANT INFORMATION:

Please note that we cannot publish the accepted version of the manuscript without a completed Licence to Publish form. reporting new sequence data, papers will not be published online until the sequence data are released in public databases

Please make sure you check the details you have entered into the Editorial Manager site very carefully, particularly the manuscript category and author details, as these will be used when your accepted PDF is published online.

ANEXO E- CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 2 REVISTA JOURNAL OF BIOMEDICAL SCIENCE

25/02/2018

Email - jrv1_1@hotmail.com

Confirmation of your submission to Journal of Biomedical Science -
JBMS-D-18-00195

Journal of Biomedical Science Editorial Office <em@editorialmanager.com>

sex 23/02/2018 18:55

Para: Valdemir V. Silva Júnior <jrv1_1@hotmail.com>;

JBMS-D-18-00195

Evaluation of carbonyl cyanide-3-chlorophenylhydrazone effect on efflux pumps inhibition and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by quantum dots conjugated to meropenem

Valdemir V. Silva Júnior; Bruno L. Raposo; Ana C.S. Lopes; Adriana Fontes; Paulo E. Cabral Filho; Maria A.V. Maciel

Journal of Biomedical Science

Dear Dr. Silva Júnior,

Thank you for submitting your manuscript, "Evaluation of carbonyl cyanide-3-chlorophenylhydrazone effect on efflux pumps inhibition and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by quantum dots conjugated to meropenem", to Journal of Biomedical Science

The submission id is: JBMS-D-18-00195

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following website:

Your username is: valdemirvsjunior

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at <https://jbms.editorialmanager.com/>.

Best wishes,

Editorial Office