



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**VINICIUS CARVALHO PEREIRA**

**EFEITO DA PROMETAZINA, FLUOXETINA E CARBONILCIANETO M-  
CLOROFENIL-HIDRAZONA (CCCP) COMO INIBIDORES DE BOMBAS DE  
EFLUXO EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa*  
MULTIRRESISTENTES**

**FORTALEZA-CE**

**2023**

VINICIUS CARVALHO PEREIRA

**EFEITO DA PROMETAZINA, FLUOXETINA E CARBONILCIANETO M-  
CLOROFENIL-HIDRAZONA (CCCP) COMO INIBIDORES DE BOMBAS DE  
EFLUXO EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa*  
MULTIRRESISTENTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gláucia Morgana de Melo Guedes.

FORTALEZA-CE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- P496e      Pereira, Vinicius Carvalho.  
              Efeito da prometazina, fluoxetina e carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP) como inibidores de bombas de efluxo em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes / Vinicius Carvalho Pereira. – 2023.  
              71 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2023.  
              Orientação: Prof. Dr. Débora Castelo Branco de Souza Collares  
              Maia.  
              Coorientação: Prof. Dr. Gláucia Morgana de Melo Guedes.
1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. bombas de efluxo. 3. resistência antimicrobiana. 4. biofilmes. 5. permeabilidade. I. Título.

CDD 616.9

---

VINICIUS CARVALHO PEREIRA

EFEITO DA PROMETAZINA, FLUOXETINA E CARBONILCIANETO M-  
CLOROFENIL-HIDRAZONA (CCCP) COMO INIBIDORES DE BOMBAS DE EFLUXO  
EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* MULTIRRESISTENTES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Microbiologia Médica da  
Universidade Federal do Ceará, como requisito  
parcial à obtenção do título de Mestre em  
Microbiologia Médica. Área de concentração:  
Microbiologia Humana e Animal.

Aprovada em: 17/02/2023.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof. Dr. Paulo César Pereira de Sousa  
Centro Universitário Christus (Unichristus)

A Deus.

Aos meus pais, Ana e Pedro.

Às minhas irmãs, Camila e Viviane.

À minha sobrinha e afilhada, Raissa.

Vocês são meu combustível.

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

À FUNCAP, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

À Profa. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia, por todas as oportunidades, ensinamentos e experiências que me permitiu vivenciar ao longo do mestrado, seu tratamento compreensivo e humanizado estará sempre marcado em mim, como profissional e ser humano. Tenho na senhora uma enorme inspiração, muito obrigado!

À Profa. Dra. Glaucia Morgana de Melo Guedes, por toda ajuda e companheirismo no dia a dia do laboratório, desde a ajuda nos cálculos dos experimentos até as simples conversas rotineiras que tornavam os dias de trabalho no laboratório mais alegres.

Aos professores participantes da banca de qualificação e defesa, Dra. Glaucia Morgana de Melo Guedes, Dra. Silviane Praciano Bandeira, Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento e Dr. Paulo César Pereira de Sousa, pela disponibilidade no aceite desse convite e auxílio na melhoria deste trabalho. Obrigado pelas valiosas colaborações e sugestões.

A todos os funcionários do setor da Microbiologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), em especial ao microbiologista Paulo César e aos técnicos André e Mariana, por todo apoio na obtenção e identificação das cepas do estudo. Sem vocês essa pesquisa não seria possível.

À minha mãe, dona Ana Lucia, por ser a maior representação de amor e cuidado na minha vida, por todas as bênçãos nas minhas saídas pelas manhãs e esperas ansiosas pela minha chegada em casa, amo a senhora mais que tudo no mundo. Ao meu pai, Seu Pedro, por me ensinar a lutar por todos os meus objetivos e sonhos, é meu grande incentivador e melhor amigo, tenho no senhor a minha maior fortaleza, amo você.

Às minhas irmãs Camila e Viviane, as melhores que Deus poderia me dar, tenho em vocês a eterna admiração de um irmão caçula, amo vocês mais que tudo, até mesmo quando são chatas. E também à minha sobrinha e afilhada Raissa, que me ensinou a amar como um irmão mais velho.

À Stefany por tanto carinho, apoio e compreensão, me fazendo acreditar que os momentos difíceis passariam e melhores chegariam, tenho em você a melhor companheira para todos os momentos, sejam eles bons ou ruins, amo muito você! E à toda família Paiva, em especial à Tia Cida, Paulo, Tia Sandra, Katy e Kikaki, vocês são muito especiais para mim.

À Alyne e Paulo que me ajudaram em todos os momentos da minha pesquisa, da bancada a escrita, sem vocês esse trabalho não teria sido possível. A vocês minha eterna gratidão e admiração. Muito obrigado, de verdade!

A todos os amigos e colegas que tive a honra de trabalhar e conhecer no Laboratório de Bacteriologia, em especial, à Lucia, Thiago, Rodrigo Guedes, Jaiane, Luana, Rodrigo Machado, Expedito, Juliana, Emanuela, Kesia, Ana Carla, Ivan, Jardel, Natasha e Marcos, que dividiram tantos momentos especiais, e não tão especiais também, no laboratório.

Aos meus amigos Anderson, Carolzinha, Rodrigo, Sarinha, Lucifu, Luquinhas, Anne, Yara, Camila, Isadora e João, por todos os momentos de descontração e apoio.

Por fim, e não menos importante, a todos os funcionários do prédio da Biomedicina, pela manutenção e cuidado com nosso ambiente de trabalho, em especial, ao Seu João, Valdeni, Rogério, Marcílio e Waliton.

“I think for the most part if you’re really honest with yourself about what you want out of life, life gives it to you”

*How I Met Your Mother*

## RESUMO

*Pseudomonas aeruginosa* multirresistente (MDR) representa um grande problema de saúde em todo o mundo. O efluxo ativo dos antimicrobianos representa uma importante via associada a esse fenótipo MDR. Além disso, as bombas de efluxo nessa espécie bacteriana também atuam em outros aspectos da fisiologia bacteriana, como na manutenção de biofilmes. Assim, a pesquisa por inibidores de bombas de efluxo (IBEs) apresenta-se como uma importante alternativa no manejo da resistência e virulência bacteriana. A presente pesquisa objetivou avaliar a ação da prometazina (PMZ), fluoxetina (FLU) e carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP) como IBEs em *P. aeruginosa*. As concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) e o efeito dos IBEs sobre o metabolismo e a biomassa dos biofilmes bacterianos foram determinados. Ensaios de acumulação com brometo de etídio (EtBr) foram realizados para comprovar a ação de PMZ, FLU e CCCP como IBEs. Associações de PMZ, FLU e CCCP com antimicrobianos clássicos (ciprofloxacina, gentamicina e meropenem) sobre as células planctônicas e em biofilme também foram realizadas. Os IBEs do estudo apresentaram efeitos antibacterianos e antibiofilme frente as cepas do estudo com CIMs variando de 195,3 a 781,2 µg/mL para PMZ, 78,1 a 312,5 µg/mL para FLU e 256 a 2048 µM para CCCP e Concentrações Eliminatórias Mínimas em Biofilme (CEMBs) variando de 781,2 a 6250 µg/mL para PMZ, 312,5 a 1250 µg/mL para FLU e 1024 a 4096 µM para CCCP, embora FLU não tenha reduzido significativamente a biomassa desses biofilmes. Concentrações subinibitórias de PMZ, FLU e CCCP (CIM/2 e CIM/4) aumentaram significativamente a fluorescência das células bacterianas, indicando sua ação na inibição de bombas de efluxo. Foram observadas reduções significativas na atividade metabólica dos biofilmes após a associação com os antimicrobianos, especialmente para o meropenem. Os dados do presente estudo permitem comprovar a ação de PMZ, FLU e CCCP como IBEs em *P. aeruginosa*, e demonstram a relevância das bombas de efluxo na resistência antimicrobiana.

**Palavras-chave:** *Pseudomonas aeruginosa*; bombas de efluxo; resistência antimicrobiana; biofilmes; permeabilidade.

## ABSTRACT

Multi-drug resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* represents a major health problem worldwide. The active efflux of antimicrobials represents an important pathway associated with this MDR phenotype. In addition, efflux pumps in this bacterial species also act in other aspects of bacterial physiology, such as in biofilm maintenance. Thus, the search for efflux pump inhibitors (EPIs) presents itself as an important alternative in the management of bacterial resistance and virulence. This research aimed to evaluate the action of promethazine (PMZ), fluoxetine (FLU) and carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) as EPIs in *P. aeruginosa*. The Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) and the effect of EPIs on the metabolism and biomass of bacterial biofilms were determined. Accumulation assays with ethidium bromide (EtBr) were performed to prove the action of PMZ, FLU and CCCP as EPIs. Associations of PMZ, FLU and CCCP with classical antimicrobials (ciprofloxacin, gentamicin and meropenem) on planktonic cells and in biofilm were also performed. The study EPIs showed antibacterial and antibiofilm effects against the study strains with MICs ranging from 195.3 to 781.2 µg/mL for PMZ, 78.1 to 312.5 µg/mL for FLU and 256 to 2048 µM for CCCP and Minimum Eliminating Biofilm Concentrations (MBECs) ranging from 781, 2 to 6250 µg/mL for PMZ, 312.5 to 1250 µg/mL for FLU and 1024 to 4096 µM for CCCP, although FLU did not significantly reduce the biomass of these biofilms. Subinhibitory concentrations of PMZ, FLU and CCCP (MIC/2 and MIC/4) significantly increased the fluorescence of bacterial cells, indicating their action in inhibiting efflux pumps. Significant reductions in the metabolic activity of biofilms were observed after the association with the antimicrobials, especially for meropenem. The data from this study allow us to prove the action of PMZ, FLU and CCCP as EPIs in *P. aeruginosa*, and demonstrate the relevance of efflux pumps in antimicrobial resistance.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*; efflux pumps; antibiotic resistance; biofilms; permeability.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Árvore filogenética demonstrando o posicionamento do gênero <i>Pseudomonas</i> em <i>Gammaproteobacteria</i> .....	19
Figura 2 – <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em ágar MacConkey.....	20
Figura 3 – Aspecto estrutural e acoplamento energético das principais superfamílias de bombas de efluxo.....	26
Figura 4 – Estrutura geral de uma bomba de efluxo RND.....	27
Figura 5 – Principais bombas de efluxo em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	28
Figura 6 – Mecanismos de inibição das bombas de efluxo.....	31
Figura 7 – Efeito dos inibidores de bombas de efluxo nos parâmetros estruturais de biofilmes maduros analisados por microscopia confocal em cepas forte e fraca formadoras de biofilme.....	46
Figura 8 – Análise tridimensional de biofilmes maduros de uma cepa forte (1) e fraca (1) formadoras de biofilme de <i>P. aeruginosa</i> expostas aos inibidores de bombas de efluxo.....	46
Figura 9 – Efeito dos IBEs no efluxo de brometo de etídio por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=31).....	47
Figura 10 – Efeitos das associações dos antimicrobianos com PMZ, FLU e CCCP sobre a biomassa de biofilmes maduros de <i>P. aeruginosa</i> (n=8).....	51
Gráfico 1 – Efeitos dos inibidores de bombas de efluxo na biomassa de biofilmes maduros de <i>P. aeruginosa</i> .....	45

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Bombas de efluxo em *Pseudomonas aeruginosa* e principais substratos antimicrobianos..... 28
- Tabela 2 – Origem, perfil de sensibilidade e mecanismos de resistência aos carbapenêmicos das cepas clínicas do estudo..... 39
- Tabela 3 – Isolados bacterianos selecionados, concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações eliminatória mínima de biofilme (CEMB) para prometazina (PMZ), fluoxetina (FLU), carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP) contra *Pseudomonas aeruginosa* (n=31)..... 44
- Tabela 4 – Atividade antibacteriana da prometazina (PMZ), fluoxetina (FLU) e carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP) combinados com antibióticos..... 50
- Tabela 5 – Atividade das associações de prometazina (PMZ), fluoxetina (FLU) e carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP) nas CEMBs dos antimicrobianos..... 51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BrCAST	<i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
CCCP	Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CEMB	Concentração Eliminatória Mínima sobre o Biofilme
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical &amp; Laboratory Standards Institute</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
fL	Fluorescência
FLU	Fluoxetina
GEN	Gentamicina
GrAMM	Grupo Aplicado em Microbiologia Médica
IBE	Inibidor de bomba de efluxo
IMP	Imipenemase
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
mCIM	Teste de inativação dos carbapenêmicos
MDR	Multidroga resistente
ME	Membrana externa
MER	Meropenem
MH	<i>Mueller Hinton</i>
MI	Membrana interna
NDM	Metalo- $\beta$ -lactamase de Nova Delhi
OMS	Organização Mundial de Saúde
OXA-48	Oxacilinase-48
PFM	Proteína de Fusão de Membranas
PME	Proteína de Membrana Externa
PMI	Proteína de Membrana Interna
PMZ	Prometazina
RAM	Resistência antimicrobiana

RND	Divisão de nodulação de resistência
UFC	Universidade Federal do Ceará
VIM	Metallo- $\beta$ -lactamase codificada por Integron de Verona

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
<b>2.1</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	19
<b>2.2</b>	<b>Arsenal terapêutico disponível para o tratamento de infecções por</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	21
<b>2.3</b>	<b>Mecanismos de resistência aos antimicrobianos em</b> <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> .....	24
<b>2.4</b>	<b>Bombas de Efluxo</b> .....	26
<b>2.5</b>	<b>Inibidores de bombas de efluxo (IBEs)</b> .....	30
<b>2.5.1</b>	<i>Prometazina</i> .....	32
<b>2.5.2</b>	<i>Fluoxetina</i> .....	33
<b>2.5.3</b>	<i>CCCP</i> .....	33
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES</b> .....	35
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	36
<b>4.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	36
<b>4.1</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	36
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	37
<b>5.1</b>	<b>Caracterização das cepas do estudo</b> .....	37
<b>5.2</b>	<b>Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) para os</b> <b>IBEs</b> .....	40
<b>5.3</b>	<b>Determinação das Concentrações Eliminatórias Mínimas em Biofilme</b> <b>(CEMBs)</b> .....	40
<b>5.4</b>	<b>Microscopia confocal de varredura a laser de biofilmes de</b> <i>P. aeruginosa</i> <b>após exposição a PMZ, FLU e CCCP</b> .....	41
<b>5.5</b>	<b>Avaliação fenotípica da atividade de bomba de efluxo</b> .....	41
<b>5.6</b>	<b>Associação dos inibidores de bombas de efluxo com os antimicrobianos</b> .....	42
<b>5.7</b>	<b>Análise estatística</b> .....	43
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	44
<b>6.1</b>	<b>Atividade dos IBEs frente as cepas do estudo</b> .....	44
<b>6.2</b>	<b>Atividade das bombas de efluxo das cepas e avaliação dos compostos</b> <b>como IBEs</b> .....	47
<b>6.3</b>	<b>Associação de inibidores da bomba de efluxo com ciprofloxacina,</b>	

	<b>gentamicina e meropenem.....</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>59</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana é considerada um problema de saúde pública mundial. Estima-se que, em 2019, bactérias multirresistentes foram responsáveis por 4,95 milhões de mortes (MURRAY *et al.*, 2022). Desses microrganismos, *Pseudomonas aeruginosa*, um dos principais agentes causadores de infecções relacionadas à assistência à saúde, representa um grande desafio por apresentar resistência a múltiplas classes de antimicrobianos (AZAM; KHAN, 2019; HORCAJADA *et al.*, 2019).

De acordo com um levantamento do Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos, apenas no ano de 2017, as infecções por *P. aeruginosa* multirresistentes foram responsáveis por 32.600 internações e 2.700 óbitos, gerando gastos estimados em 767 milhões de dólares aos centros de saúde (CDC, 2019).

Por esse motivo, essa espécie, quando resistente aos carbapenêmicos, está incluída na lista prioritária de patógenos bacterianos da Organização Mundial de Saúde (OMS) para os quais urge a pesquisa e o desenvolvimento de novos antibióticos (DIGGLE & WHITELEY, 2020; JURADO-MARTÍN *et al.*, 2021). Nesse cenário, vários mecanismos de resistência em *P. aeruginosa* têm sido estudados para explicar a perda de eficácia desses antimicrobianos e, dentre eles, destacam-se a produção de enzimas que inativam as drogas e a redução da permeabilidade bacteriana, que pode se dar através da menor expressão de porinas na membrana externa, como a *oprD*, ou da super expressão de sistemas de efluxo (GELLATLY & HANCOCK, 2013; CHEVALIER *et al.*, 2017; KHALILI *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2021).

O aumento na expressão de bombas de efluxo vem ganhando destaque, uma vez que importantes drogas com atividade antipseudomonas são apontadas como substrato para alguns sistemas de efluxo presentes nesse patógeno. A super expressão de quatro deles conferem resistência a essas classes de antimicrobianos, são eles: *MexAB-OprM*, cujos substratos antimicrobianos são fluoroquinolonas, macrolídeos, tetraciclina, lincomicina, cloranfenicol, novobiocina e a maioria dos  $\beta$ -lactâmicos (exceto imipenem), *MexCD-OprJ* atuando sobre fluoroquinolonas,  $\beta$ -lactâmicos (em especial cefalosporinas de quarta geração, como cefepima), cloranfenicol, tetraciclina, novobiocina, trimetoprima e macrolídeos, *MexEF-OprN*, agindo sobre cloranfenicol, fluoroquinolonas e trimetoprima e *MexXY-OprM*, cujos substratos são aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, cefepime, tetraciclina, cloranfenicol e eritromicina, reduzindo, assim, as alternativas terapêuticas para o manejo dessas infecções (TERAHARA; NISHIURA, 2019; AL RASHED *et al.*, 2020; HILLIAM *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2020; LISTER *et al.*, 2009; PAN *et al.*, 2016; BASSETTI *et al.*, 2018; LORUSSO *et al.*,

2022; REHMAN *et al.*, 2018; SEUPT *et al.*, 2020).

Nesse contexto, compostos que modulam a atividade de bombas de efluxo em *P. aeruginosa* têm se apresentado como alvo de estudos para melhor entender e caracterizar a resistência antimicrobiana apresentada por essa espécie (ISLAMIEH *et al.*, 2018; ISLAMIEH *et al.*, 2020; ZAHEDI BIALVAEI *et al.*, 2021).

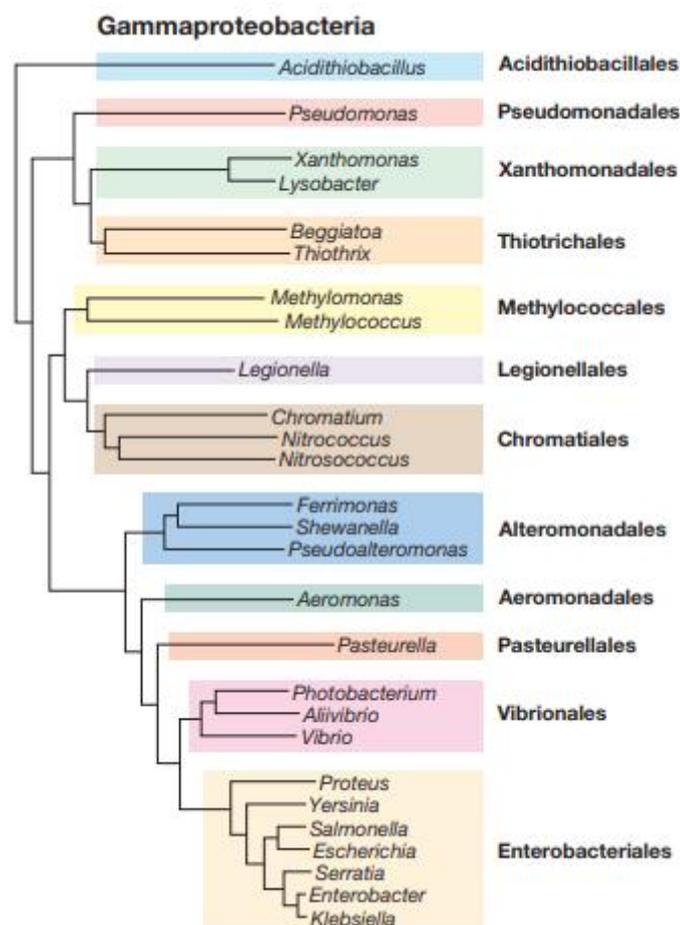
Pesquisas anteriores demonstraram a ação de dois fármacos não antimicrobianos, prometazina (PMZ) e fluoxetina (FLU), como inibidores de atividade de bomba de efluxo em algumas espécies bacterianas (SIDRIM *et al.*, 2017; NZAKIZWANAYO *et al.*, 2017; LAGADINO *et al.*, 2020). Logo, o presente estudo objetiva avaliar o efeito da prometazina (PMZ) e fluoxetina (FLU), além de um clássico inibidor de bombas de efluxo (IBE), o carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP), como inibidores das bombas de efluxo presentes em *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Descrita em 1882, por Carle Gessard, *Pseudomonas aeruginosa*, do grego *Pseudo*, “falso”, *monas*, “unidade única”, *aeruginosa*, “azul-esverdeado”, é uma bactéria pertencente ao filo *Proteobacteria*, classe *Gammaproteobacteria*, ordem *Pseudomonadales*, família *Pseudomonadaceae*, gênero *Pseudomonas* (PALLERONI *et al.*, 2015; DIGGLE; WHITELEY, 2020). Madigan *et al.*, (2016) apresentam uma representação esquemática da árvore filogenética, construída com base em sequências do 16S RNAr, de *Gammaproteobacteria*, na qual é possível observar o posicionamento filogenético de *Pseudomonas*.

Figura 1 - Árvore filogenética demonstrando o posicionamento do gênero *Pseudomonas* em *Gammaproteobacteria*.



Fonte: MADIGAN *et al.*, (2016).

Morfológicamente, *P. aeruginosa* apresenta-se como bacilo Gram negativo móvel, reto ou pouco curvado, disposto em pares ou isolado, medindo, aproximadamente, 0,6 x 2 µm

(BROOKS *et al.*, 2014). Sua caracterização bioquímica, envolve a utilização de carboidratos por respiração aeróbia, embora possa crescer em baixas concentrações de oxigênio usando nitrato ou arginina como aceptores finais de elétrons (MURRAY *et al.*, 2017). A oxidação ocorre pela passagem de elétrons pelo citocromo c, e por isso são oxidase positivas. Além disso, não fermentam glicose, sendo denominadas não fermentadoras. Essas duas características permitem diferenciá-la de muitas enterobactérias na rotina clínica em microbiologia (LEVINSON; JAWETZ, 2006).

Cresce bem na faixa de temperatura entre 25°C a 37°C, porém, é capaz de crescer, também, a temperaturas de 42°C, o que permite a diferenciar de outras espécies do gênero (TANG *et al.*, 2014). Em ágar MacConkey, meio comumente utilizado para seu isolamento, são incolores, apresentam colônias com aspecto navicular e alguns autores descrevem a produção de um odor característico de frutas (LEVINSON; JAWETZ, 2006). Outra característica importante da espécie, e que deu nome a seu epíteto específico “*aeruginosa*”, é a produção de alguns pigmentos, como a piocianina, uma fenazina azul não fluorescente, a pioverdina, um sideróforo fluorescente, a piorubina, de cor vermelha e não fluorescente, e a piomelanina, marrom e não fluorescente (ORLANDI *et al.*, 2015). Esses pigmentos também podem auxiliar no diagnóstico laboratorial e são importantes fatores de virulência para essa espécie. A figura 2 apresenta essa espécie em ágar MacConkey.

Figura 2 - *Pseudomonas aeruginosa* em ágar MacConkey.



Fonte: Arquivo pessoal (2022).

*P. aeruginosa* é um organismo ubíquo, comumente isolado de diversos nichos ecológicos, como: solo, ambientes aquáticos, plantas e animais (MIELKO *et al.*, 2019). Porém, para além da sua presença em matrizes ambientais, esse microrganismo também se apresenta como um patógeno oportunista que, com frequência, causa uma ampla gama de infecções em pacientes imunocomprometidos, especialmente em ambientes hospitalares (MORITA *et al.*, 2014; JURADO-MARTIN *et al.*, 2021).

Reynolds & Kollef (2021), afirmam que *P. aeruginosa* representa em torno de 7,1% a 7,3% entre todas as Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS). Driscoll *et al.*, (2007), pontuam que, em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), essa porcentagem se eleva para 13,2 a 22,6%. Dados sobre os principais microrganismos associados a IRAS publicados pelo Centro Europeu de Prevenção de Doenças (ECDC) no ano de 2016 revelaram que *P. aeruginosa* foi o microrganismo mais isolado de pacientes com pneumonia adquiridas nas UTIs europeias, além de estar entre os isolados mais frequentes em infecções do trato urinário e de corrente sanguínea também adquiridas nas UTIs (BOTELHO *et al.*, 2019).

Labarca *et al.*, (2016) pontuam que levantamentos realizados na América Latina indicam que *P. aeruginosa* represente 26% dos isolados em pacientes em UTIs. No Brasil, essa espécie bacteriana desponta como a principal causa de pneumonias adquiridas em ambiente hospitalar (SANTOS *et al.*, 2019).

Essa relevante distribuição epidemiológica no cenário das infecções hospitalares se associa a outro desafio imposto à comunidade médica. *P. aeruginosa* apresenta resistência intrínseca a vários medicamentos, além da sua relativa capacidade em adquirir novos mecanismos de resistência, limitando o arsenal terapêutico disponível para o tratamento dessas infecções (SAVOIA, 2014; HU *et al.*, 2017).

## **2.2 Arsenal terapêutico disponível para o tratamento de infecções por *Pseudomonas aeruginosa***

Dentre o arsenal de antimicrobianos disponíveis, as fluoroquinolonas, os beta-lactâmicos, em especial os carbapenêmicos, e os aminoglicosídeos são geralmente usados como terapia de primeira linha até que resultados de cultura e sensibilidade estejam disponíveis (HILLAN *et al.*, 2020; WILSON; PANDEY, 2022).

As fluoroquinolonas são antibióticos de amplo espectro amplamente prescritos para tratar infecções causadas por *P. aeruginosa* (KHAN *et al.*, 2020). Agem inibindo duas

enzimas envolvidas na síntese de DNA bacteriano, a topoisomerase II (DNA-girase) e a topoisomerase IV (HOOPER; JACOBY, 2016).

Seus principais representantes são a levofloxacina e a ciprofloxacina. Destes, a ciprofloxacina é mais comumente utilizada, pode ser administrada por via oral ou intravenosa e tem sido prescrita para tratar uma variedade de infecções por *P. aeruginosa*, incluindo bacteremia, otite, Infecções do Trato Urinário (ITUs) e infecções de pele e partes moles (BASSETTI *et al.*, 2018; REHMAN; PATRICK; LAMONT, 2018; SHE *et al.*, 2019).

Os carbapenêmicos são amplamente utilizados no tratamento de infecções causadas por isolados multirresistentes de *P. aeruginosa*. Isso se deve ao fato de serem muito resistentes à hidrólise pelas penicilinas e cefalosporinas, apesar de serem hidrolisados por carbapenemases (FIGUEREDO *et al.*, 2020; NEVES, *et al.*, 2011).

Assim como os demais betalactâmicos, inibem o crescimento bacteriano ao interferir na reação de transpeptidação da síntese da parede celular bacteriana. Os principais representantes dessa classe são imipenem e meropenem, sendo prescritos principalmente nos casos de Infecções de Corrente Sanguínea (ICS), Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica (PAVM), ITUs complicadas e infecções de pele e tecidos moles (BASSETTI *et al.*, 2018; FIGUEREDO *et al.*, 2020).

Dentre os mecanismos de resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa*, a produção de carbapenemases tem se apresentado como uma realidade problemática, uma vez que essas enzimas, além de inativar os carbapenêmicos, também é capaz de hidrolisar outros Beta-lactâmicos, como as penicilinas e cefalosporinas (CAMPANA *et al.*, 2017). Diante desse cenário, alguns antimicrobianos importantes foram inseridos na prática clínica para lidar com essa problemática.

Ceftazidima é uma cefalosporina de terceira geração que foi combinada ao Avibactam, um inibidor de enzimas importantes, como as serino carbapenemases (MATESANZ & MENSA, 2021). Ceftazidima/Avibactam se apresenta como uma importante alternativa terapêutica no manejo de infecções por *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos e produtoras de serino carbapenemases.

Outra alternativa terapêutica comumente apresentada é a combinação de outra cefalosporina com um inibidor de  $\beta$ -lactamases, o Ceftolozane/tazobactam. Esse fármaco também é estável à ação de  $\beta$ -lactamases produzidas por *Pseudomonas aeruginosa*, e vem sendo utilizado em cepas de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos (POGUE *et al.*, 2020).

Evidências científicas sugerem que pacientes infectados com *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos têm maior probabilidade de morbidade e mortalidade em comparação com aqueles infectados com cepas sensíveis. Além de ter impactado negativamente nos desfechos clínicos, a resistência aos carbapenêmicos também criou um ônus econômico indevido com alto custo de hospitalização (CAI *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2021).

Nos últimos anos, o aumento da resistência às fluoroquinolonas e aos beta-lactâmicos têm levado à maior utilização dos aminoglicosídeos na prática clínica (AHMADIAN *et al.*, 2021). Os aminoglicosídeos são antimicrobianos bactericidas que atuam na síntese proteica bacteriana, a partir da sua ligação com a porção 30S do ribossomo bacteriano e consequente indução de erros no processo de tradução e montagem de proteínas funcionais (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010; POULIKAKOS; FALAGAS, 2013).

Alguns de seus representantes, como tobramicina, gentamicina e amicacina são importantes drogas pertencentes ao arsenal de antimicrobianos utilizados para o tratamento de uma ampla gama de infecções causadas por *P. aeruginosa*, como endocardites, infecções respiratórias e quadros de sepse (THACHARODI; LAMOND, 2022). Eles são usados em monoterapia ou em associação com outros antimicrobianos, porém, as infecções hospitalares causadas por *P. aeruginosa* geralmente requerem sua utilização em combinação, especialmente para aumentar seu efeito bactericida (KUMAR *et al.*, 2021; TEIXEIRA *et al.*, 2016).

Assim como para as outras classes antimicrobianas, seu uso excessivo tem resultado no aumento dos perfis de resistência a essas drogas, reduzindo ainda mais as estratégias terapêuticas para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa* (KHAN *et al.*, 2020).

Além das três classes de antimicrobianos apresentadas acima, as polimixinas assumiram um papel importante no tratamento de cepas multirresistentes de *P. aeruginosa*, e têm sido utilizadas como estratégia de salvamento quando este microrganismo apresenta resistência às fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e carbapenêmicos (TSUJI *et al.*, 2019). Seu mecanismo de ação envolve sua ligação ao lipopolissacarídeo (LPS) e a moléculas de fosfolípídeos na membrana externa das bactérias Gram negativas, resultando em extravasamento de conteúdo intracelular e consequente morte celular (NIKOO *et al.*, 2017).

Duas polimixinas estão disponíveis para uso clínico, a polimixina B e a colistina (polimixina E). Sendo a primeira mais indicada para infecções sistêmicas devido suas características farmacocinéticas, bem como um potencial reduzido de causar nefrotoxicidade

quando comparada à colistina. Já a colistina, torna-se uma boa opção em infecções do trato urinário (TSUJI *et al.*, 2019).

Dados de estudos farmacocinéticos sugerem que as concentrações plasmáticas de colistina seguindo as recomendações da Agência Europeia de Medicamentos e do FDA são baixas e inadequadas para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa* MDR (HORCAJADA *et al.*, 2019). Dessa forma, as diretrizes do consenso internacional para uso ideal das polimixinas recomendam que para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa* MDR, a polimixina deve ser usada em combinação com um ou mais agentes adicionais aos quais o patógeno apresenta CIM sensível (TSUJI *et al.*, 2019).

A nefrotoxicidade é um efeito adverso comum das polimixinas. As concentrações plasmáticas de colistina demonstraram ser um fator de risco importante para o desenvolvimento de lesão renal aguda. Uma concentração média de colistina plasmática em estado estacionário superior a ~2 mg/litro é considerada um fator de risco independente para nefrotoxicidade associada à colistina (HORCAJADA *et al.*, 2019; TSUJI *et al.*, 2019).

Assim, tendo em vista a limitação dos tratamentos antimicrobianos disponíveis associados à resistência apresentada por *Pseudomonas aeruginosa*, serão apresentados no tópico a seguir alguns mecanismos de resistência aos antimicrobianos importantes para essa espécie bacteriana.

### **2.3 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa***

Abushaheen *et al.*, (2020) definem a Resistência Antimicrobiana (RAM) como a capacidade de um microrganismo se adaptar e sobreviver na presença de agentes antimicrobianos. A RAM é um problema de saúde pública de escala global, Murray *et al.*, (2022) estimam que as infecções por bactérias resistentes aos medicamentos sejam responsáveis por quase 5 milhões de mortes por ano.

*Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno importante neste cenário, dados do Centro de Controle e Prevenção de Doenças Americano (CDC, 2019) estima que, no ano de 2017, 32.600 pacientes hospitalizados apresentaram infecções por esta espécie bacteriana, sendo responsável por, aproximadamente, 2.700 óbitos, gerando custos estimados em 767 milhões de dólares aos sistemas de saúde americanos. Além disso, está na lista de patógenos categorizados como “ESKAPE”, que contém microrganismos associados a elevados perfis de resistência no contexto das infecções hospitalares, sendo capazes de “escapar” da atividade dos antimicrobianos, são eles: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*

*pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter* (BOTELHO *et al.*, 2019). A Organização Mundial de Saúde também incluiu a espécie, quando resistentes aos carbapenêmicos, na lista prioritária de patógenos bacterianos para os quais urge a pesquisa e o desenvolvimento de novos antibióticos (DIGGLE & WHITELEY, 2020; JURADO-MARTÍN *et al.*, 2021).

Esses elevados perfis de resistência são associados ao fato de essa espécie bacteriana possuir mecanismos de resistência intrínsecos importantes, como a baixa permeabilidade a antimicrobianos, possibilitada pelo efluxo ativo de antimicrobianos e baixo teor de porinas em sua membrana, e a produção de  $\beta$ -lactamases, como a AmpC. Além disso, possui a capacidade de adquirir mecanismos de resistência adicionais por outras vias, como por processos de mutação, transformação, transdução ou conjugação, que podem conceder a este microrganismo, enzimas importantes no contexto da resistência antimicrobiana, a exemplo das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EL ZOWALATY *et al.*, 2015; LANGENDONK *et al.*, 2021).

A produção de carbapenemases em *Pseudomonas aeruginosa* também é um mecanismo de resistência de grande relevância, uma vez que essas  $\beta$ -lactamases conferem resistência a praticamente todos os  $\beta$ -lactâmicos disponíveis (HALAT; MOUBARECK, 2022). As principais enzimas pertencentes a esse grupo são as metalo- $\beta$ -lactamases, como IMP (Imipenemase), VIM (Metalo- $\beta$ -lactamase codificada por Integron de Verona) e NDM (Metalo- $\beta$ -lactamase de Nova Delhi), e as serino carbapenemases, como KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) e OXA-48 (Oxacilinase-48) (BOYD *et al.*, 2020). Atualmente, a disseminação de *P. aeruginosa* MDR produtoras de carbapenemases tem gerado alerta aos sistemas de saúde, uma vez que as alternativas terapêuticas para o tratamento das infecções por esse patógeno são limitadas, em especial para os microrganismos produtores de metalo- $\beta$ -lactamases (BOYD *et al.*, 2020; GARCIA-BETANCUR, 2020).

Além destes, mecanismos de resistência adaptativos também são observados, em especial, a formação de biofilmes, que possibilitam, ainda mais, a evasão do microrganismo aos antimicrobianos. Os biofilmes são agregados de células microbianas, aderidos a uma superfície biótica ou abiótica, envoltos por uma matriz polimérica composta por lipídeos, proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e outros metabólitos, fornecendo um ambiente de resistência à substâncias tóxicas exógenas, como os antibióticos (AZAM; KHAN, 2019; PANG *et al.*, 2019).

Dos vários mecanismos de resistência aos antibióticos descritos anteriormente, o efluxo ativo dos antimicrobianos representa uma importante via associada ao fenótipo

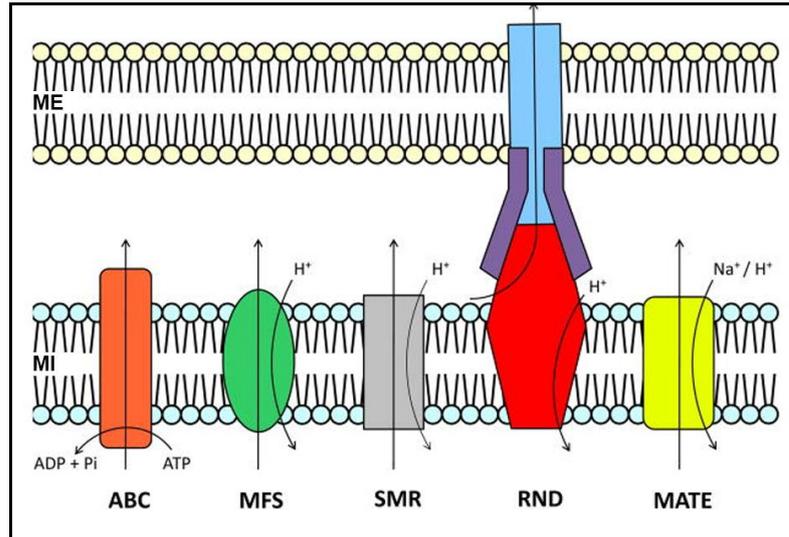
multirresistente (MDR) em *P. aeruginosa*. Tal fato está relacionado à capacidade dos sistemas de efluxo presentes nessa espécie exportarem diferentes classes de drogas clinicamente importantes para o tratamento das infecções por esse patógeno (LI *et al.*, 2015; LORUSSO *et al.*, 2022).

## 2.4 Bombas de efluxo

As bombas de efluxo são proteínas de membrana encontradas em todas as espécies bacterianas que atuam na extrusão de compostos tóxicos para a célula bacteriana. Elas exportam diversos substratos, como corantes, detergentes, metabólitos residuais e, também, antibióticos, evitando que estes alcancem concentrações tóxicas no ambiente intracelular bacteriano (JAMSHIDI *et al.*, 2016; ALAV *et al.*, 2018).

Esses sistemas de efluxo são codificados por genes localizados em cromossomos ou plasmídeos, e podem ser divididos em cinco superfamílias, são elas: *Resistance Nodulation cell Division* (RND), *Major facilitator superfamily* (MFS), *Small Multidrug Resistance* (SMR), *ATP-Binding Cassette* (ABC) e *Multi-Antimicrobial Extrusion family* (MATE) (BLAIR *et al.*, 2014; LOWRENCE *et al.*, 2019). Os membros da família ABC utilizam a hidrólise do ATP como fonte de energia para seu funcionamento, enquanto os transportadores das outras famílias utilizam força próton motiva ( $H^+$ ) ou gradiente eletroquímico ( $Na^+$ ), além disso, diferenças em sequência e especificidade de substrato também são observadas, assim como em estrutura, como apresentado na figura 3 (DELMAR *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2014; THAKUR *et al.*, 2021; HUANG *et al.*, 2022).

Figura 3 - Aspecto estrutural e acoplamento energético das principais superfamílias de bombas de efluxo.

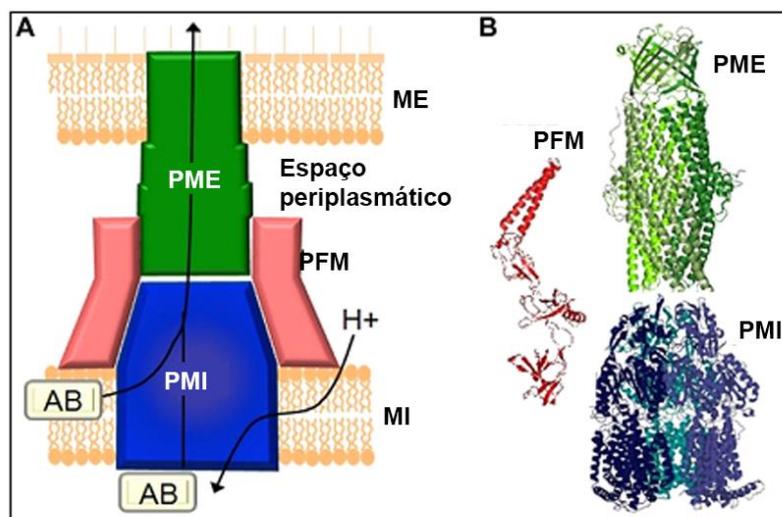


Fonte: Adaptado de Delmar *et al.*, (2014).

Figura 3. Representação esquemática da estrutura e acoplamento energético necessário para o funcionamento das principais superfamílias de bombas de efluxo. As bombas de efluxo ABC, MFS, SMR e MATE situam-se na membrana interna (MI) bacteriana, enquanto os transportadores RND são complexos proteicos tripartidos que abrangem as membranas externa (ME) e interna (MI). A superfamília ABC utiliza a energia advinda da hidrólise de ATP para seu funcionamento, enquanto as demais bombas de efluxo se utilizam de força próton motiva. Os transportadores de MATE também funcionam a partir de gradiente eletroquímico como fonte energética.

Destes, os transportadores pertencentes à família RND estão presentes em todas as bactérias Gram negativas e são as bombas de efluxo clinicamente mais relevantes no contexto da resistência antimicrobiana (VARGIU *et al.*, 2022). Os sistemas de efluxo RND são complexos proteicos tripartidos, compostos por uma proteína de membrana interna (PMI), uma proteína de membrana externa (PME) e uma proteína periplasmática de fusão de membranas (PFM) que conecta a PMI e a PME (VENTER *et al.*, 2015; COLCLOUGH *et al.*, 2020). A figura 4 representa um desenho esquemático de uma bomba de efluxo RND.

Figura 4 - Estrutura geral de uma bomba de efluxo RND.



Fonte: Adaptado de Venter *et al.*, (2015).

Figura 4.A) Representação esquemática da estrutura de uma bomba de efluxo RND e seus principais componentes: PME: Proteína de Membrana Externa, PMI: Proteína de Membrana Interna e PFM: Proteína de Fusão de Membranas, situada no espaço periplasmático bacteriano, entre as membranas externa (ME) e interna (MI). Os substratos das bombas de efluxo (AB) se ligam à PMI, onde é iniciado o processo de extrusão, que necessita de uma força próton motiva ( $H^+$ ) para seu funcionamento. O substrato é deslocado ao longo da bomba e enviado ao ambiente extracelular através da PME. B) Representação esquemática da estrutura em 3D de PME, PMI e PFM, que compõem a bomba.

A proteína acoplada a membrana interna catalisa o antiporte droga/prótons, e é responsável pela seletividade da bomba ao substrato (VENTER *et al.*, 2015). O substrato se liga à PMI e, após uma série de alterações conformacionais, é transmitido à proteína de fusão de membrana periplasmática e é, então, reempacotado, causando mudanças estruturais na proteína de membrana externa, abrindo este canal e finalizando o efluxo (DU *et al.*, 2015; DU *et al.*, 2018).

Em *P. aeruginosa*, a superexpressão de quatro principais sistemas de efluxo ganham destaque, pois conferem resistência a diversas classes de antimicrobianos, são eles: *MexAB-OprM*, *MexCD-OprJ*, *MexEF-OprN* e *MexXY-OprM* (LISTER *et al.*, 2009). No quadro 1, estão apresentados os principais substratos antimicrobianos para cada uma das bombas de efluxo anteriormente citadas (PAN *et al.*, 2016; BASSETTI *et al.*, 2018; LORUSSO *et al.*, 2022; REHMAN *et al.*, 2018; SEUPT *et al.*, 2020).

Tabela 1 - Bombas de efluxo em *Pseudomonas aeruginosa* e principais substratos antimicrobianos.

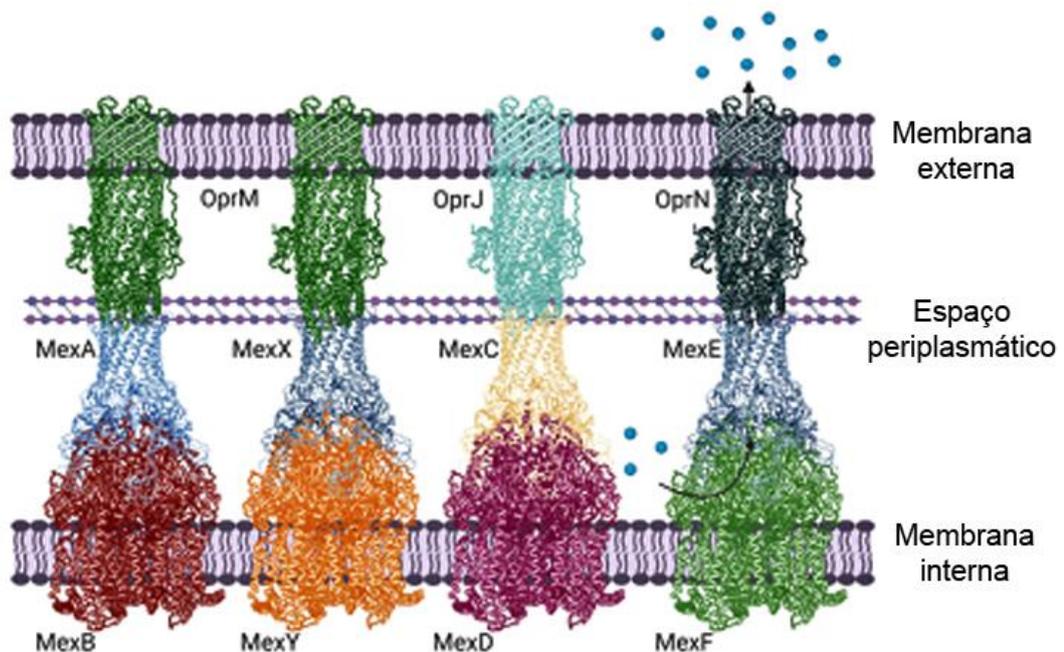
Bombas de efluxo	Substratos antimicrobianos
------------------	----------------------------

<i>MexAB-OprM</i>	Fluoroquinolonas, Macrolídeos, Tetraciclina, Lincomicina, Cloranfenicol, Novobiocina e $\beta$ -lactâmicos (exceto imipenem).
<i>MexCD-OprJ</i>	Fluoroquinolonas, $\beta$ -lactâmicos (em especial cefalosporinas de quarta geração, como Cefepima), Cloranfenicol, Tetraciclina, Novobiocina, Trimetoprima e Macrolídeos.
<i>MexEF-OprN</i>	Cloranfenicol, Fluoroquinolonas e Trimetoprima.
<i>MexXY-OprM</i>	Aminoglicosídeos, Fluoroquinolonas, Cefepime, Tetraciclina, Cloranfenicol e Eritromicina.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A estrutura e principais genes reguladores desses sistemas de efluxo estão apresentados na figura 5.

Figura 5 - Principais bombas de efluxo em *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: Adaptado de Lorusso *et al.*, (2022).

Figura 5. Representação esquemática da estrutura das principais bombas de efluxo em *Pseudomonas aeruginosa*: *MexAB-OprM* (*MexB*: PMI, *MexA*: PFM e *OprM*: PME) *MexXY-OprM* (*MexY*: PMI, *MexX*: PFM e *OprM*: PME), *MexCD-OprJ* (*MexD*: PMI, *MexC*: PFM e *OprJ*: PME) e *MexEF-OprN* (*MexF*: PMI, *MexE*: PFM e *OprN*: PME).

Como evidenciado nos parágrafos anteriores, as bombas de efluxo conferem resistência a muitos antimicrobianos para *P. aeruginosa* em sua forma planctônica. Porém, Soto (2013) também discorre sobre o papel desses sistemas de efluxo na resistência a diversos antibióticos observados em biofilmes dessa espécie bacteriana.

Baugh *et al.*, (2014) afirmam que as bombas de efluxo são importantes no contexto da resistência em biofilmes e espécies bacterianas como *Escherichia coli*,

*Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* teriam sua capacidade de formar biofilmes prejudicadas na ausência desses complexos proteicos. Buroni *et al.* (2014) descrevem a importância de três bombas de efluxo RND (RND-3, RND-8 e RND-9) para biofilmes de *Burkholderia cenocepaciae* contra tobramicina. Gillis *et al.*, (2005) também discorrem sobre o papel das bombas *MexAB-OprM* e *MexCD-OprJ* na resistência à azitromicina em biofilmes de *P. aeruginosa*.

Os mecanismos envolvidos na resistência, arquitetura e formação de biofilmes relacionados às bombas de efluxo ainda não são totalmente esclarecidos, porém Soto (2013) hipotetiza que esses sistemas de efluxo atuam na regulação de *Quorum Sensing* (QS), muito importante para formação e manutenção de biofilmes. Pearson *et al.*, (1999), já discorriam sobre o papel desses sistemas no efluxo de compostos importantes na comunicação célula-célula.

Assim, é possível observar que, além de modular a sensibilidade antimicrobiana, as bombas de efluxo também atuam em outros aspectos da fisiologia bacteriana, dentre eles, a comunicação intercelular, QS e consequente formação e manutenção de biofilmes. Logo, inibir esses sistemas de efluxo permite avaliar sua contribuição para resistência, virulência e patogenicidade bacteriana (BLANCO *et al.*, 2018; DAVIN-REGLI *et al.*, 2021; HUANG *et al.*, 2022).

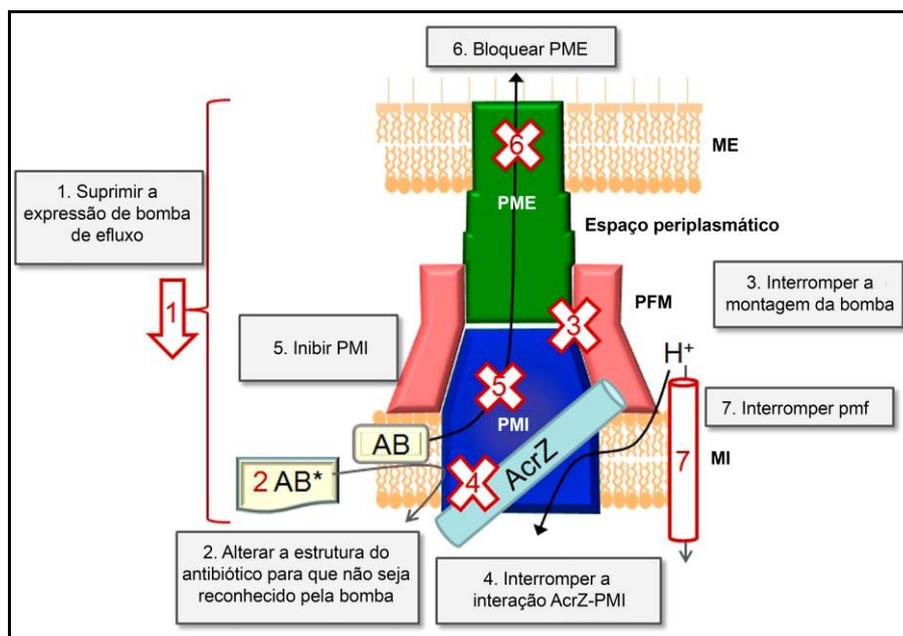
## **2.5 Inibidores de bombas de efluxo (IBEs)**

Estratégias que visam melhorar o acúmulo intracelular de agentes antimicrobianos, e sua consequente eficácia, representam um grande desafio à comunidade científica, especialmente, em bactérias Gram negativas, que dispõem de um duplo sistema de membranas associado aos sistemas de efluxo ativos já descritos no tópico anterior (ZGURSKAYA; RYBENKOV, 2020; MEHLA *et al.*, 2021).

Porém, a vagarosidade no desenvolvimento de novos antimicrobianos tem despertado interesse na busca por estratégias que mantenham a efetividade dos antimicrobianos já existentes. Nesse cenário, a inibição de bombas de efluxo tem surgido como uma alternativa para superar a resistência mediada pelos sistemas de efluxo (RAMASWAMY *et al.*, 2017).

A inibição das bombas de efluxo pode ocorrer por diversos mecanismos, como apresentado na figura 6, adaptada da publicação de Venter *et al.*, (2015).

Figura 6 - Mecanismos de inibição das bombas de efluxo.



Fonte: Adaptado de Venter *et al.*, (2015).

Figura 6. Representação esquemática ilustrando possíveis abordagens para inibir o efluxo de antimicrobianos pelas bombas de efluxo RND. 1) regular genes supressores e repressores envolvidos na expressão das bombas de efluxo; 2) alterar da estrutura do antimicrobiano, impedindo seu reconhecimento como substrato para a bomba de efluxo; 3) impedir a montagem do complexo tripartido; 4) interromper a ação de proteínas importantes para o funcionamento da proteína de membrana interna, como a proteína *AcrZ*, importante para o funcionamento de *AcrB* em *Escherichia coli*; 5) Inibir a proteína de membrana interna, que se liga ao substrato antimicrobiano; 6) Bloquear o canal de saída na proteína de membrana externa; 7) Esgotar a energia necessária para o funcionamento da bomba de efluxo.

Muitos inibidores de bombas de efluxo são descritos na literatura, e podem ser classificados como: derivados de plantas, derivados de microrganismos e químicos (ALENAZY, 2022). Destes, alguns IBEs químicos ganham destaque na inibição de bombas de efluxo RND em *P. aeruginosa*, a exemplo do Phe-Arg  $\beta$ -naftilamida (PA $\beta$ N), que inibem competitivamente algumas bombas de efluxo presentes em *P. aeruginosa*, porém não avançaram aos ensaios clínicos devido à nefrotoxicidade apresentada (NAKASHIMA *et al.*, 2013). Outro exemplo são os inibidores de piridopirimidina, como o D13-9001, específico para a bomba de efluxo *MexAB-OprM* de *P. aeruginosa*, e, especialmente por sua alta especificidade à apenas um sistema de efluxo, muitas pesquisas com esse composto foram descontinuadas (ARON & OPPERMAN, 2016). Nesse contexto, a busca por novos inibidores que atuem em uma maior diversidade de sistemas de efluxo e não sejam tóxicos faz-se relevante.

Pesquisas anteriores demonstraram a ação de dois fármacos não antimicrobianos, prometazina (PMZ) e fluoxetina (FLU), como inibidores de atividade de bomba de efluxo em algumas espécies bacterianas (SIDRIM *et al.*, 2017; NZAKIZWANAYO *et al.*, 2017; LAGADINO *et al.*, 2020). Por esse motivo, a presente pesquisa objetivou avaliar a ação desses dois fármacos como inibidores de bombas de efluxo em *P. aeruginosa*. Além deles, um inibidor clássico de bombas de efluxo, carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP), comumente utilizado para avaliar atividade de bomba de efluxo em diversas espécies bacterianas, também foi adicionado ao estudo.

### 2.5.1 Prometazina

A prometazina, fármaco pertencente ao grupo dos fenotiazínicos, é um medicamento com propriedades antidopaminérgicas, anti-histamínicas e anticolinérgicas para o tratamento de condições alérgicas, náuseas e para sedação, como adjuvante a outros anestésicos (SOUTHARD; AL KHALILI, 2021). Inicialmente, a prometazina foi desenvolvida devido à sua propriedade anti-histamínica, bloqueando os sítios do receptor H1 e impedindo a ação da histamina na célula, apresentando assim propriedades anti-alérgicas, porém uma série de outras funcionalidades vêm sendo associadas à este composto, dentre elas, propriedades antimicrobianas (CANTISANI *et al.*, 2013; LAGADINO *et al.*, 2020).

Sidrim *et al.*, (2017) e Lehtinen & Lilius (2007) relatam efeitos antimicrobianos da prometazina contra as espécies *Burkholderia pseudomallei* e *Escherichia coli*, encontrando concentrações inibitórias mínimas de 780 µg/mL e 128 µg/mL, respectivamente. Fiallos *et al.*, (2022) também descrevem em seu estudo, que prometazina inibiu o crescimento microbiano de *Enterococcus faecalis* a partir de concentrações de 64 µg/mL. Além disso, Brilhante *et al.* (2018) relatou, através de ensaios de fluorescência com Rodamina 6G, a ação desse composto como inibidor de bombas de efluxo em cepas de *Candida tropicalis*.

Alguns mecanismos são propostos para a ação antimicrobiana das fenotiazinas, como a inibição no processo de replicação do microrganismo, através da capacidade desses fármacos em se intercalar ao DNA bacteriano, e também a inativação de bombas de efluxo, gerada pela capacidade desses compostos em impedir o transporte de cálcio e consequente inibição de funções enzimáticas dependentes de  $Ca^{2+}$ , como a geração de energia para a célula necessária para ativação dos sistemas de efluxo (VARGA *et al.*, 2017). Chan *et al.* (2007) também pontuam que as fenotiazinas podem atuar nas bombas de efluxo por outro mecanismo, através da perturbação do gradiente de prótons da membrana, que é necessário

para alguns transportadores, como para as bombas de efluxo da família RND, para energizar o processo de extrusão do substrato antimicrobiano.

Assim, também se faz relevante avaliar a ação da prometazina sobre a inibição de bombas de efluxo em *Pseudomonas aeruginosa*, um patógeno comumente associado à elevada expressão desses sistemas de efluxo (LORUSSO *et al.*, 2022).

### 2.5.3 Fluoxetina

Fluoxetina é um medicamento antidepressivo que atua inibindo a recaptação seletiva de serotonina através do bloqueio da proteína transportadora de recaptação localizado no terminal pré-sináptico (PEREZ-CABALLERO *et al.*, 2014; SOHEL *et al.*, 2022). Porém, alguns autores já têm descrito a atividade antimicrobiana desse fármaco frente a diferentes espécies bacterianas e fúngicas (TEKINTAS *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2017; SOUSA *et al.*, 2018).

Tekintas *et al.* (2020), relataram que fluoxetina inibia o crescimento de *Candida* spp. em concentrações variando de 64 µg/mL a 512 µg/mL, além disso, apresentou interações sinérgicas com fluconazol, reduzindo as concentrações nas quais o antimicrobiano inibia o crescimento fúngico. Além disso, Silva *et al.*, (2017) relataram o efeito desse composto na redução da atividade metabólica de biofilmes maduros de *Candida* spp.

Sousa *et al.* (2018) descrevem a ação desse fármaco sobre o crescimento planctônico de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, porém os autores do estudo relatam que os mecanismos envolvidos na atividade antimicrobiana frente a essas espécies bacterianas ainda são desconhecidos, porém a inibição de bombas de efluxo é o mecanismo hipotetizado. Nzakizwanayo *et al.* (2017), utilizando uma metodologia de acúmulo intracelular de brometo de etídio, demonstraram a ação da fluoxetina como inibidor de bomba de efluxo em *Proteus mirabilis*. Logo, hipotetiza-se que esse fármaco pode apresentar-se como inibidor de bombas de efluxo também em *P. aeruginosa*.

### 2.5.3 CCCP

O Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP) atua como inibidor de bombas de efluxo por dissipar o gradiente de prótons, impedindo a continuação da síntese de ATP e, assim, o funcionamento normal dos processos celulares dependentes desse gradiente de energia, como as bombas de efluxo (PATHANIA; SHARMA; GUPTA, 2019; RODRIGUES;

CRAVO; VIVEIROS, 2020). Dentre essas, seu efeito é relacionado principalmente à família RND (ANES *et al.*, 2015).

Tem sido utilizado principalmente em combinação com antibióticos, sendo descrito como capaz de melhorar a sensibilidade *in vitro* de *Acinetobacter baumannii* para imipenem e cefepima (SANCHEZ-CARBONEL *et al.*, 2021), reverter a resistência à colistina em cepas de *Proteus* spp., *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Providencia* spp., *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. (BARON; ROLAIN, 2018), além de reduzir a CIM de polimixina B em *Pseudomonas aeruginosa* (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2020).

O CCCP tem sido amplamente utilizado em laboratório, porém seu uso *in vivo* deve ser cauteloso devido sua toxicidade. Isso ocorre por interferir na despolarização mitocondrial induzindo o processo de mitofagia (KONCHA *et al.*, 2021; SOUTAR *et al.*, 2019).

Dessa forma, diante das lacunas apresentadas no desenvolvimento de IBEs e a problemática das bombas de efluxo no contexto da resistência antimicrobiana e virulência em *Pseudomonas aeruginosa*, se faz relevante a busca por novos compostos que inibam os sistemas de efluxo neste patógeno. A presente pesquisa, se dedica à investigação dos fármacos não antimicrobianos prometazina (PMZ) e fluoxetina (FLU) e do composto CCCP como potenciais inibidores de bombas de efluxo em *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes.

### 3 HIPÓTESES

1. PMZ, FLU e CCCP apresentam atividade antimicrobiana e antibiofilme contra *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes;
2. PMZ, FLU e CCCP inibem a atividade das bombas de efluxo presentes em *P. aeruginosa* multirresistentes;
3. PMZ, FLU e CCCP possuem ação sinérgica com ciprofloxacina, gentamicina e meropenem contra *P. aeruginosa* multirresistentes nas formas planctônicas e de biofilmes.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da prometazina (PMZ), fluoxetina (FLU) e carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP) como inibidores das bombas de efluxo presentes em *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes.

### 4.2 Objetivos Específicos

1. Determinar as Concentrações Inibitórias Mínicas (CIMs) de PMZ, FLU e CCCP contra *P. aeruginosa*;
2. Quantificar fenotipicamente a inibição de bombas de efluxo por PMZ, FLU e CCCP frente *P. aeruginosa*;
3. Analisar o efeito de PMZ, FLU e CCCP sobre a atividade metabólica e biomassa de biofilmes maduros de *P. aeruginosa*;
4. Caracterizar as associações de PMZ, FLU e CCCP com os antimicrobianos ciprofloxacina, gentamicina e meropenem sobre os isolados planctônicos e em biofilmes de *P. aeruginosa*.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Caracterização das cepas do estudo

Foram incluídos nesse estudo 30 isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, além da cepa de referência *P. aeruginosa* ATCC 27853. As cepas clínicas foram cedidas pelo Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), e encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia do Grupo Aplicado em Microbiologia Médica (GrAMM), da Universidade Federal do Ceará (UFC), onde foram estocadas em meio mínimo para manutenção de culturas bacterianas.

A identificação e sensibilidade antimicrobiana dos isolados foram realizadas pelo sistema VITEK® 2 Compact (bioMérieux™), os pontos de corte para os testes de sensibilidade aos antimicrobianos foram interpretados seguindo os critérios do documento BrCAST (2022). Para categorizar o mecanismo de resistência aos carbapenêmicos em enzimático ou não enzimático foi utilizado o teste de inativação dos carbapenêmicos (mCIM), e os microrganismos resistentes aos carbapenêmicos por via enzimática foram submetidos ao ensaio imunocromatográfico NG-Test® CARBA 5 para detecção das carbapenemases KPC, OXA-48, VIM, IMP e NDM (TAMMA; SIMNER, 2018).

Todos os isolados clínicos do estudo foram caracterizados como multidroga resistentes (MDR), ou seja, resistentes a pelo menos 1 agente de 3 diferentes classes de drogas antimicrobianas – sendo elas: Beta-lactâmicos, Aminoglicosídeos e Fluorquinolonas (MAGIORAKOS *et al.*, 2012), seguindo o perfil de sensibilidade antimicrobiana liberada pelo Vitek® 2 Compact (bioMérieux™) - tabela 2.

Além dos testes de sensibilidade realizados pelo sistema semiautomatizado, foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para um representante de cada classe antimicrobiana, foram elas: ciprofloxacina (fluorquinolonas), gentamicina (aminoglicosídeos) e meropenem ( $\beta$ -lactâmicos), seguindo os protocolos estabelecido pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2021). Para isso, os micro-organismos foram crescidos em caldo BHI por 24 horas a 37 °C em estufa bacteriológica. Posteriormente, foram semeados em ágar BHI para o crescimento de colônias por mais 24 horas a 37 °C. Após esse período, os inóculos bacterianos foram preparados utilizando as colônias numa escala 0,5 de McFarland e diluídos até alcançarem a concentração final de  $5 \times 10^5$  UFC/mL. Os antimicrobianos foram testados em 10 concentrações seriadas, nos seguintes intervalos de concentração: 0,25 - 128  $\mu$ g/mL. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C, por 24 horas e a leitura foi feita de forma visual a fim de encontrar a CIM, definida como a

menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento bacteriano. A cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 permitiu a validar as drogas utilizadas no estudo. Poços livres de droga foram utilizados como controle de crescimento e poços contendo apenas meio de cultura como controle de esterilidade.

Tabela 2 - Origem, perfil de sensibilidade e mecanismos de resistência aos carbapenêmicos das cepas clínicas do estudo.

Cepas	Amostras	Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos - Vitek® 2 Compact (bioMérieux™)									Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos – Microdiluição em Caldo			Mecanismo de resistência aos carbapenêmicos	
		BTL							AM		FQ	BTL	AM		FQ
		CAZ	CFP	IPM	MPM	PIT	C/A	C/T	AMI	GEN	CIP	MPM	GEN*		CIP
MB2	Aspirado Traqueal	R	R	R	R	R	-	-	R	R	R	R	I	R	Enzimático: Metallo-β-lactamase (IMP)
MB9	Aspirado Traqueal	R	R	R	R	R	-	-	R	R	R	I	R		
MB33	Aspirado Traqueal	R	R	R	R	R	-	-	R	R	R	R	R		
MB36	Ponta de Cateter	R	R	R	R	R	-	-	R	R	R	R	I	R	
MB37	Aspirado Traqueal	R	R	R	R	R	-	-	R	R	R	R	I	R	
MB93	Sangue	R	R	R	R	R	-	-	R	R	R	R	R	R	
MB143	Urina	R	R	R	R	R	-	-	R	R	R	R	R	R	
NID29	Aspirado Traqueal	R	R	R	R	R	-	-	R	R	R	S	S	I	Enzimático: Enzima não identificada
NID45	Líquido Abdominal	R	R	R	R	R	-	-	R	R	R	I	R	R	
NID47	Aspirado Traqueal	R	R	R	R	R	-	-	R	R	R	I	R	R	
NID51	Líquido Abdominal	R	R	R	R	R	-	-	R	R	R	I	R	R	
NID86	Sangue	R	R	R	R	R	-	-	R	R	R	I	R	R	
NID91	Aspirado Traqueal	R	R	R	R	R	-	-	R	S	R	I	S	I	
NID94	Aspirado Traqueal	R	R	R	R	R	-	-	R	S	R	I	S	I	
NID110	Aspirado Traqueal	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	
NID127	Ferida Operatória	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	
NID144	Líquido Abdominal	R	R	R	R	R	R	-	R	R	R	R	R	R	
SRN1	Aspirado Traqueal	R	R	R	R	R	S	-	R	R	R	R	R	R	Enzimático: Serino Carbapenemase
SRN3	Pé	R	R	R	R	R	S	-	R	R	R	R	R	R	
SRN7	Secreção de Ferida	R	R	R	R	R	S	-	R	R	R	R	R	R	
SRN27	Pé	R	R	R	R	R	S	-	R	R	R	I	R	R	
SRN35	Amígdala	R	R	R	R	R	S	-	R	R	R	R	R	R	
SRN65	Sangue	R	R	R	R	R	R	-	R	R	R	R	R	R	
NEZ11	Aspirado Traqueal	R	R	R	R	R	-	S	I	R	R	I	R	R	Não enzimático
NEZ26	Aspirado Traqueal	R	R	R	R	R	-	S	I	R	R	S	S	I	
NEZ71	Aspirado Traqueal	R	R	R	R	R	-	S	S	S	R	I	R	R	
NEZ77	Urina	R	R	R	R	R	-	S	R	R	R	I	R	R	
NEZ85	Sangue	R	R	R	R	R	-	S	I	R	R	I	S	R	
NEZ148	Fragmento de Tecido	S	R	R	R	R	-	S	S	R	R	I	R	R	
NEZ153	Aspirado Traqueal	R	R	R	R	R	-	S	R	R	R	I	S	R	

Fonte: Elaborada pelo autor.

BTL: β-Lactâmicos; AM: Aminoglicosídeos; FQ: Fluorquinolonas; CAZ: Ceftazidima; CFP: Cefepime; IPM: Imipenem; MPM: Meropenem; AMI: Amicacina; GEN: Gentamicina; CIP: Ciprofloxacina; PIT: Piperacilina/Tazobactam; C/A: Ceftazidima/Avibactam; C/T: Ceftolozane/tazobactam; R: Resistente; I: Sensível aumentando a dose/exposição; S: Sensível; IMP: Imipenemase; KPC: Klebsiella Pneumoniae carbapenemase. \* A resultados dos ensaios por microdiluição para gentamicina foram interpretados seguindo o documento M100 – CLSI (2021).

## 5.2 Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) para os IBEs

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos inibidores de bomba de efluxo prometazina (25 mg/mL, HIPOLABOR, Brasil), fluoxetina (20 mg/mL, EMS, Brasil) e cianeto de carbonila 3-clorofenilhidrazona (CCCP, Sigma, Brasil) foram determinadas, seguindo os protocolos estabelecido pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2021) já descritos anteriormente. Os compostos foram testados em 10 concentrações seriadas, nos seguintes intervalos de concentração: 12,20 - 6250 µg/mL (42,91 - 21975 µM) para prometazina, 9,76 - 5000 µg/mL (31,56 - 16163,75 µM) para fluoxetina e 8 - 4096 µM para CCCP. A cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 permitiu a validar os EBIs utilizadas no estudo. Poços livres de droga foram utilizados como controle de crescimento e poços contendo apenas meio de cultura como controle de esterilidade.

## 5.3 Determinação das Concentrações Eliminatórias Mínimas em Biofilme (CEMBs)

A formação de biofilmes dos 30 isoladas foi induzida em placas de 96 poços de fundo chato, seguindo a metodologia proposta por Sidrim *et al.* (2019), com adaptações. Os inóculos bacterianos foram preparados e ajustados para a turbidez de 6,0 na escala McFarland, que corresponde a  $1,8 \times 10^9$  UFC/mL. Os biofilmes foram cultivados em um volume total de 200 µL, sendo 175 µL de BHI-1% de glicose e 25 µL do inóculo. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C, por 48 horas, para formação do biofilme. Após esse período, todos os poços foram lavados com PBS 1x estéril. Em seguida, 200 µL de BHI-1% de glicose, contendo concentrações crescentes de drogas, foram adicionados a cada poço. As drogas foram testadas nas seguintes concentrações: 0,25 - 128 µg/mL para os antimicrobianos, 12,20 - 6250 µg/mL (42,91 - 21975 µM) para prometazina, 9,76 - 5000 µg/mL (31,56 - 16163,75 µM) para fluoxetina e 8 - 4096 µM para CCCP. As placas foram incubadas novamente em estufa bacteriológica a 37 °C, por mais 24 horas (SIDRIM *et al.*, 2019). Em seguida, a leitura da atividade metabólica foi feita de forma visual com o indicador metabólico resazurina a 0.025% e a menor concentração capaz de inibir completamente a atividade metabólica do biofilme foi definida como a CEMB. Além disso, as placas foram avaliadas quanto à biomassa dos biofilmes, por meio da técnica de coloração com cristal violeta e leitura com espectrofotômetro para medir a densidade óptica a um comprimento de onda de 490 nm (SIDRIM *et al.*, 2019). Os ensaios foram realizados em duplicata e em momentos distintos. Foram adicionados poços controle positivo a fim de categorizar a formação do biofilme do

isolado sem a presença das drogas utilizadas no estudo, e poços controle negativos a fim de garantir a esterilidade do processo. Além disso, para caracterizar o perfil de formação de biofilmes das cepas do estudo foi utilizada a metodologia descrita por Stepanovic *et al.*, (2007).

#### **5.4 Microscopia confocal de varredura a laser de biofilmes de *P. aeruginosa* após exposição a PMZ, FLU e CCCP**

O efeito dos IBEs na estrutura do biofilme foi avaliado por microscopia confocal utilizando duas cepas de *P. aeruginosa*, uma fraca e uma forte formadora de biofilme. Para tal, os biofilmes foram formados numa placa de poliestireno de 12 poços contendo uma lamínula de vidro (1 cm de diâmetro) no fundo do poço, de acordo com a metodologia descrita (SIDRIM *et al.*, 2019). O volume total dos poços foi ajustado para 1000  $\mu\text{L}$ , mantendo-se a relação meio de cultura: inóculo (7:1 v/v). Após 48 horas de crescimento do biofilme, PMZ, FLU ou CCCP foram adicionados aos poços e incubados por mais 24 horas.

Subsequentemente, as lamínulas de vidro foram colocadas em placas de Petri de fundo chato, contendo o corante fluorescente Live/Dead (Invitrogen™, EUA) (200  $\mu\text{L}$ ). Em seguida, os biofilmes foram avaliados num Microscópio Confocal Nikon C2, com uma ampliação de 600x (10 campos), a 488 nm para a detecção do corante fluorescente SYTO9, que identifica as células bacterianas vivas, e a 561 nm para a detecção do iodeto de propídio, que identifica as células bacterianas mortas/danificadas. As imagens Z-stack foram analisadas com o software COMSTAT™ e os parâmetros biomassa ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ ), espessura média de toda a área ( $\mu\text{m}$ ), espessura média da biomassa ( $\mu\text{m}$ ), coeficiente de rugosidade e razão superfície/volume ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ ) foram calculados e comparados com biofilmes não expostos aos compostos (controle de crescimento).

#### **5.5 Avaliação fenotípica da atividade de bomba de efluxo**

A avaliação da atividade de bomba de efluxo e a ação dos inibidores sobre as cepas do estudo foram avaliadas seguindo a metodologia proposta por NZAKIZWANAYO *et al.*, (2017), com modificações. Os isolados foram cultivados *overnight* (18h) em caldo BHI. Após esse período as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em caldo Mueller Hinton (MH) e ajustadas à turvação de 0,5 na escala McFarland, que corresponde a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Para avaliação da atividade de bomba de

efluxo das cepas não tratadas com os inibidores, um volume total de 205 µL foi cultivado em placas de microtitulação de 96 poços de fundo chato, contendo 100 µL de MH Caldo, 100 µL do inóculo bacteriano e 5 µl de brometo de etídio (EtBr) a uma concentração final de 5 mg/L. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa agitadora por 1 hora. Para avaliação da atividade de bomba de efluxo das cepas tratadas com os inibidores, um volume total de 200 µl foi cultivado em placas de microtitulação de 96 poços de fundo chato, contendo 100 µL de MH Caldo contendo os inibidores de bomba de efluxo (PMZ, FLU e CCCP) nas concentrações de CIM/4 e CIM/2 correspondentes a cada cepa testada e 100 µl do inóculo bacteriano. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa agitadora por 1 hora e, após esse período, foram adicionados 5 µL de EtBr a uma concentração de 5 mg/L. As placas foram novamente incubadas a 37 °C em estufa agitadora por 1 hora. Após esse período, a fluorescência foi medida em excitação de 540 nm e emissão de 600 nm no equipamento Cytation™ 5 (Biotek). Controles de fluorescência do meio de cultura e dos inibidores de bomba (PMZ, FLU e CCCP) foram mensurados e subtraídos do valor de fluorescência dos poços testes de modo a quantificar apenas a fluorescência relativa à célula bacteriana.

## **5.6 Associação dos inibidores de bombas de efluxo com os antimicrobianos**

Para avaliar o papel das bombas de efluxo na sensibilidade antimicrobiana das cepas planctônicas e em biofilme, foi avaliada a interação entre os inibidores de bomba de efluxo PMZ, FLU e CCCP e os antimicrobianos. Para isso, foram repetidos os protocolos utilizados com os compostos isolados, já descritos acima (CLSI, 2021; SIDRIM *et al.*, 2019), incorporando-se ao meio cada IBE (PMZ, FLU ou CCCP) em concentrações subinibitórias.

Para os ensaios frente as cepas planctônicas, os inóculos bacterianos foram preparados utilizando as colônias na escala 0,5 de McFarland e diluídas até alcançarem a concentração de  $5 \times 10^5$  UFC/mL junto a concentrações subinibitórias fixas dos inibidores de bomba de efluxo (CIM/4 e CIM/2) e adicionados às placas de 96 poços, onde as drogas antimicrobianas ciprofloxacina, gentamicina e meropenem estavam dispostas nas concentrações de 0,25 - 128 µg/mL.

Para os biofilmes, após as etapas de lavagem e microdiluição dos antimicrobianos (ciprofloxacina, gentamicina e meropenem) nas concentrações de 0,25 - 128 µg/mL, foi adicionado 100 µL de caldo BHI enriquecido com glicose a 1% diluído com as concentrações subeliminatórias dos biofilmes (CEMB/2 e CEMB/4) frente aos inibidores de bomba de

efluxo. As CEMBs e a quantificação de biomassa dos biofilmes após a associação dos compostos foram realizados como já descrito anteriormente (SIDRIM *et al.*, 2019).

### **5.7 Análise estatística**

Inicialmente, os dados obtidos foram analisados quanto ao padrão de normalidade. Para os que apresentavam distribuição normal, foi utilizado teste t para amostras não pareadas, enquanto os dados não paramétricos foram avaliados com o teste de Mann-Whitney. O programa GraphPad Prism 9.0 foi utilizado para as análises e valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Atividade dos IBEs frente as cepas do estudo

As CIMs determinadas variaram entre 195,3 a 781,2 µg/mL para PMZ, 78,1 a 625 µg/mL para FLU, e 52,3 a 419 µg/mL para CCCP. As CEMBs também foram determinadas e variaram de 781,2 a 6250 µg/mL para PMZ, 312,5 a 1250 µg/mL para FLU e 209,5 a 838,1 µg/mL para CCCP. Quanto ao perfil de formação de biofilme, sete cepas apresentaram-se como fortes formadoras, nove como moderados formadoras, sete como fracas formadoras e oito como não formadoras (Tabela 3).

Tabela 3 - Isolados bacterianos selecionados, concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações eliminatória mínima de biofilme (CEMB) para prometazina (PMZ), fluoxetina (FLU), carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP) contra *Pseudomonas aeruginosa* (n=31).

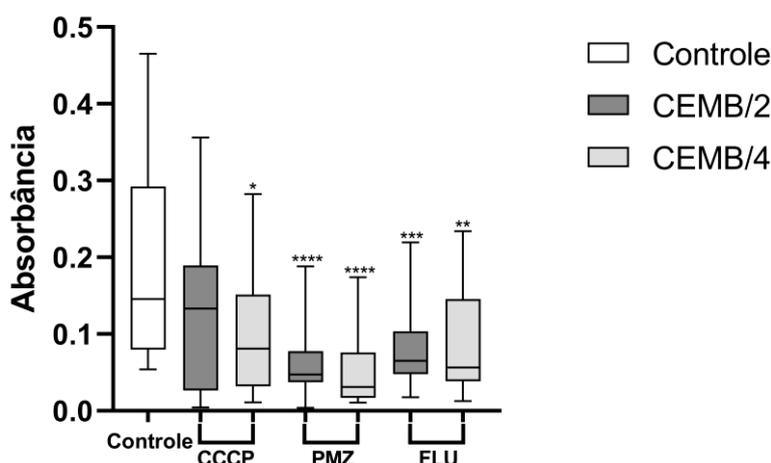
Cepas	Formação de Biofilme	Concentração Inibitória Mínima (CIM)			Concentração Eliminatória Mínima em Biofilme (CEMB)		
		PMZ (µg/mL)	FLU (µg/mL)	CCCP (µg/mL)	PMZ (µg/mL)	FLU (µg/mL)	CCCP (µg/mL)
MB2	Forte	390,6	312,5	419,06	781,2	625	419,06
MB9	Forte	390,6	156,2	419,06	3125	625	419,06
MB33	Forte	390,6	312,5	419,06	781,2	625	419,06
MB36	Forte	781,2	312,5	419,06	3125	625	419,06
MB37	Moderada	781,2	156,2	419,06	1562,5	625	419,06
MB93	Moderada	390,6	78,1	52,38	3125	625	209,53
MB143	Fraca	390,6	156,2	52,38	3125	625	419,06
NID29	Fraca	390,6	312,5	209,53	1562,5	1250	419,06
NID45	Fraca	195,3	312,5	104,76	781,2	312,5	209,53
NID47	Não aderente	781,2	312,5	104,76	3125	1250	419,06
NID51	Não aderente	781,2	156,2	104,76	781,2	1250	419,06
NID86	Moderada	390,6	156,2	52,38	3125	1250	419,06
NID91	Moderada	390,6	78,1	419,06	3125	625	419,06
NID94	Não aderente	781,2	156,2	419,06	6250	625	419,06
NID110	Forte	781,2	156,2	209,53	1562,5	625	419,06
NID127	Moderada	390,6	156,2	419,06	6250	1250	838,12
NID144	Forte	390,6	156,2	104,76	1562,5	625	419,06
SRN1	Não aderente	781,2	625	419,06	1562,5	625	209,53
SRN3	Moderada	781,2	312,5	419,06	1562,5	625	209,53
SRN7	Forte	390,6	312,5	419,06	1562,5	1250	419,06
SRN27	Moderada	390,6	312,5	419,06	1562,5	1250	419,06
SRN35	Não aderente	390,6	312,5	419,06	3125	1250	838,12
SRN65	Moderada	390,6	312,5	209,53	6250	1250	419,06
NEZ11	Não aderente	390,6	312,5	419,06	1562,5	1250	419,06
NEZ26	Não aderente	390,6	312,5	209,53	3125	312,5	419,06
NEZ71	Não aderente	390,6	312,5	419,06	1562,5	1250	838,12
NEZ77	Fraca	390,6	312,5	419,06	1562,5	625	419,06
NEZ85	Fraca	390,6	312,5	419,06	781,2	625	838,12
NEZ148	Fraca	390,6	156,2	209,53	781,2	625	419,06
NEZ153	Moderada	390,6	156,2	209,53	3125	625	838,12
ATCC	Fraca	390,6	312,5	104,76	781,2	625	838,12

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para cepas formadoras de biofilme, foram também utilizadas duas concentrações subeliminatórias mínimas de erradicação de biofilme (CEMB/2 e CEMB/4) de inibidores de bombas de efluxo para avaliar o seu potencial contra a biomassa de biofilme maduro. CEMB/2 de PMZ ( $p < 0,0001$ ) e FLU ( $p = 0,0003$ ) reduziu significativamente a biomassa dos

biofilmes bacterianos em comparação com os biofilmes não tratados, com uma redução da biomassa de 67,21% e 56,06%, respectivamente. CEMB/2 de CCCP reduziu a biomassa em 35,25%, mas esta redução não foi significativa ( $p=0,0714$ ). CEMB/4 de PMZ ( $p<0,0001$ ), FLU ( $p=0,0019$ ) e CCCP ( $p=0,0117$ ) reduziram significativamente a biomassa dos biofilmes bacterianos em comparação com os biofilmes não tratados, com uma redução da biomassa de 70,66%, 50,79% e 46,15%, respectivamente (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Efeitos dos inibidores de bombas de efluxo na biomassa de biofilmes maduros de *P. aeruginosa*.



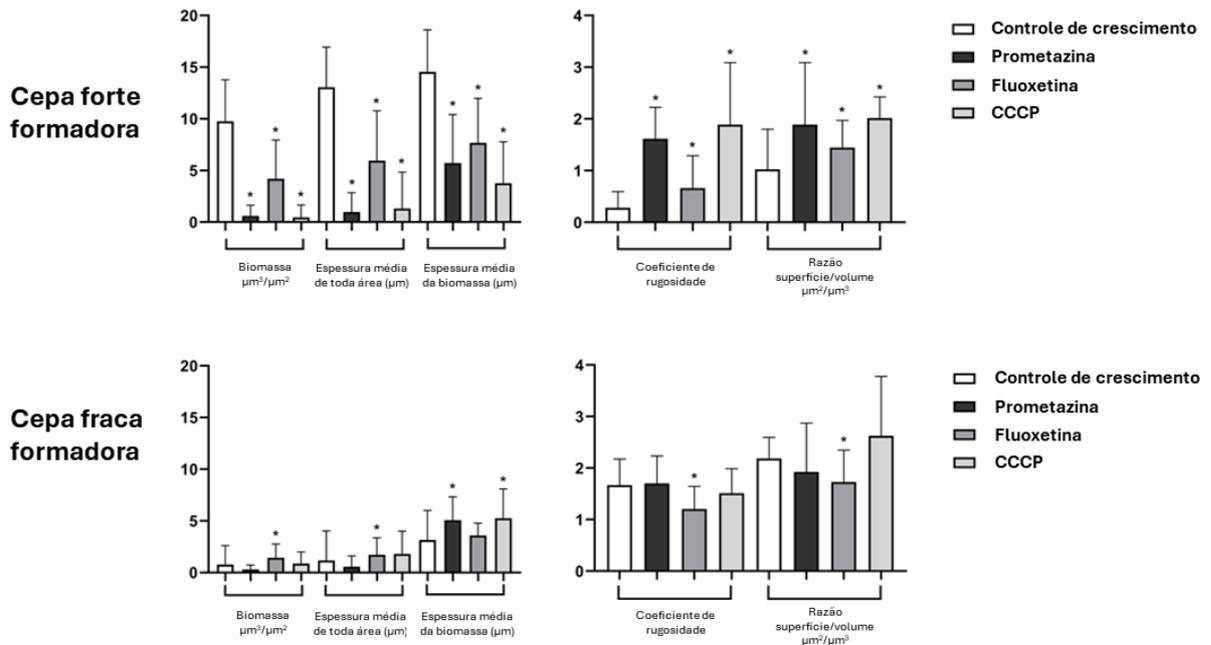
Fonte: Elaborada pelo autor.

Gráfico 1. Efeito da prometazina, fluoxetina e CCCP na biomassa de biofilmes maduros de *P. aeruginosa*. Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão da biomassa do biofilme avaliada pela técnica de coloração com violeta de cristal. Efeito das concentrações subeliminatórias (CEMB/2 e CEMB/4) de CCCP, PMZ e FLU na biomassa do biofilme bacteriano em comparação com o grupo de controle do crescimento, isento de IBEs. \*Indica diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,0117$ ) quando comparadas com o grupo controle do crescimento, sem IBEs. \*\*Indica diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,0019$ ) quando comparado com o grupo controle do crescimento, sem IBEs. \*\*\*Indica diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,0003$ ) quando comparado com o grupo controle de crescimento, sem IBEs. \*\*\*\*Indica diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,0001$ ) quando comparado com o grupo controle de crescimento, sem IBEs.

A microscopia confocal também mostrou que todos os compostos do estudo atuam sobre os biofilmes de *P. aeruginosa*. Na cepa forte formadora, todos os parâmetros analisados: biomassa, espessura média de toda a área, espessura média da biomassa, coeficiente de rugosidade e razão superfície/volume foram alterados para todos os compostos em comparação com o grupo não tratado. No entanto, para a cepa fraca formadora, poucos parâmetros foram alterados. Estes aumentaram a biomassa ( $p=0,0018$ ) e a espessura média de toda a área ( $p=0,0035$ ) e diminuíram o coeficiente de rugosidade ( $p=0,0031$ ) e a razão

superfície/volume ( $p=0,0115$ ) após o tratamento com fluoxetina. Quanto à prometazina e ao CCCP, apenas alteraram a biomassa média ( $p=0,0184$ ;  $p=0,0143$ ) (Figura 7, Figura 8).

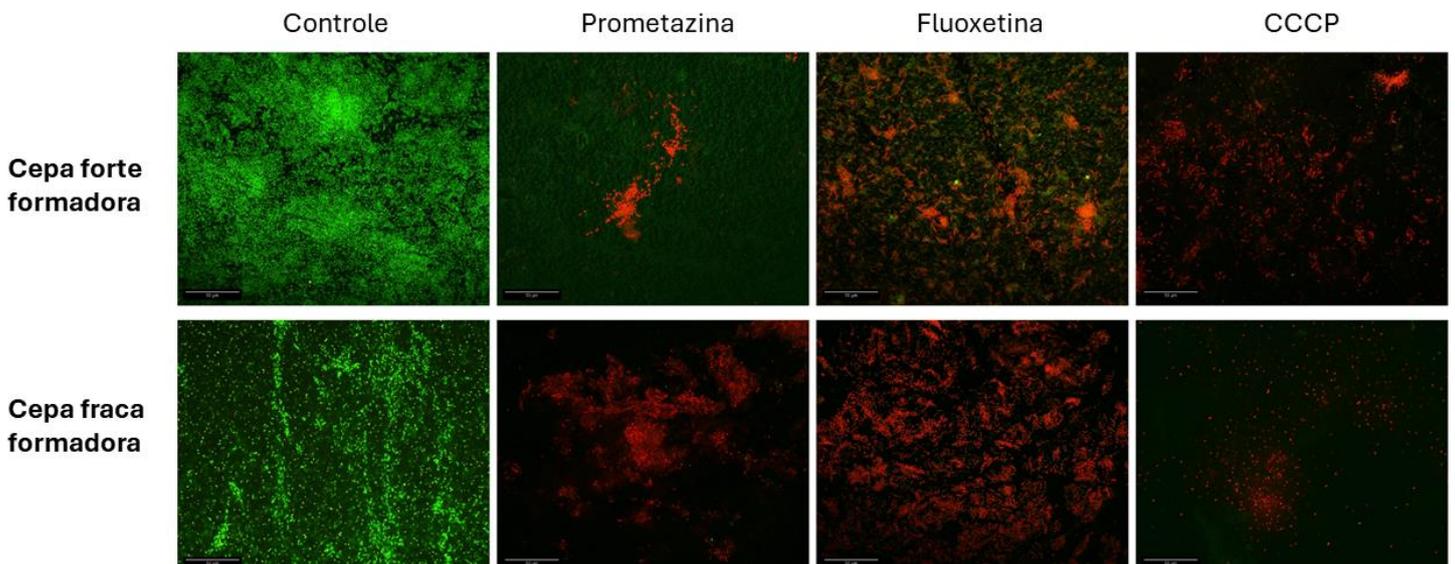
Figura 7 – Efeito dos inibidores de bombas de efluxo nos parâmetros estruturais de biofilmes maduros analisados por microscopia confocal em cepas forte e fraca formadoras de biofilme.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 7. Análises de microscopia confocal de uma cepa de *P. aeruginosa* com formação de biofilme forte (1) e fraca (1). \*Indica diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os biofilmes expostos a prometazina, fluoxetina e CCCP e o controle de crescimento.

Figura 8 – Análise tridimensional de biofilmes maduros de uma cepa forte (1) e fraca (1) formadoras de biofilme de *P. aeruginosa* expostas aos inibidores de bombas de efluxo.



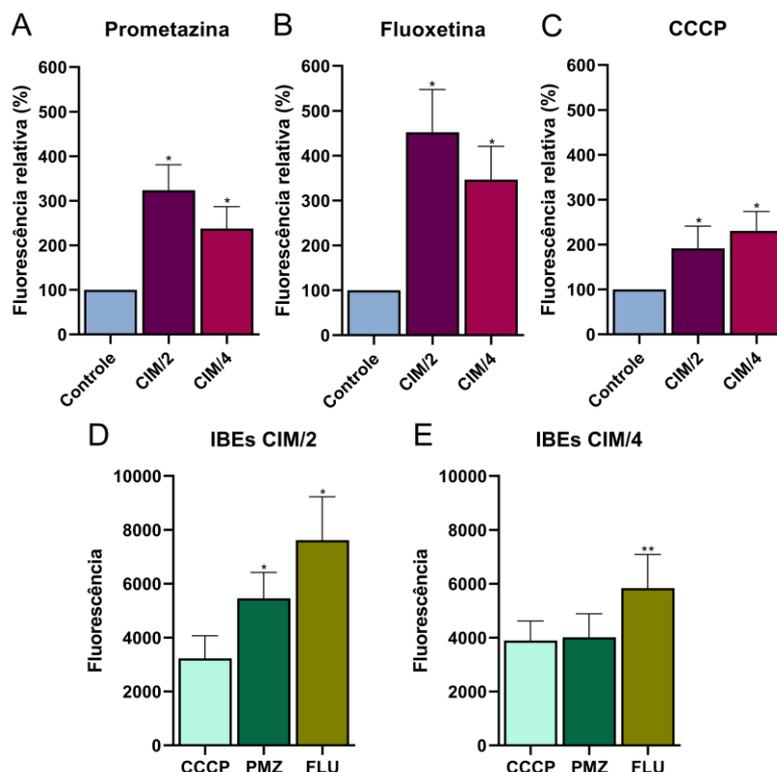
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 8. Análise tridimensional de biofilmes maduros de uma cepa forte (1) e fraca (1) formadoras de biofilme de *P. aeruginosa*. As imagens foram adquiridas por microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) utilizando o fluoróforo Live/Dead (Invitrogen™, MA, EUA), a 488 nm para a detecção de SYTO9, que identifica células bacterianas vivas (verde), e 561 nm para a detecção de iodeto de propídio, que identifica células bacterianas mortas/danificadas (vermelho). As imagens Z-stack foram analisadas com o software COMSTAT™. Ampliação: 600×; escala: 50 µm.

## 6.2 Atividade das bombas de efluxo das cepas e avaliação dos compostos como IBEs

Para avaliar a capacidade de inibir as bombas de efluxo, foram selecionadas duas concentrações subinibitórias dos IBEs (CIM/2 e CIM/4) para verificar o seu potencial para reduzir o efluxo do corante brometo de etídio, um intercalador de ácido nucleico que é um substrato para as bombas de efluxo. As células bacterianas tratadas com os IBEs aumentaram significativamente a sua fluorescência em comparação com os isolados não tratados. Nos tratamentos CIM/2, houve um aumento da fluorescência de 79,5% ( $p=0,0034$ ), 203,2% ( $p<0,0001$ ) e 350,1% ( $p<0,0001$ ), e com CIM/4 os aumentos foram de 120,3% ( $p<0,0001$ ), 279,0% ( $p<0,0001$ ) e 254,8% ( $p<0,0001$ ) para CCCP, prometazina e fluoxetina, respectivamente (Figura 9).

Figura 9 - Efeito dos IBEs no efluxo de brometo de etídio por *Pseudomonas aeruginosa* (n=31).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 9. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão da fluorescência das células bacterianas expostas ao corante fluorescente brometo de etídio. (A-C) Efeito das concentrações subinibitórias (CIM/2 e CIM/4) de PMZ, FLU e CCCP no acúmulo do brometo de etídio nas células bacterianas em comparação com o grupo não tratado com os IBEs (Controle). \*Indica diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), quando comparado com o controle de crescimento livre de IBE. (D-E) Comparação da fluorescência emitida pelos isolados tratados com os diferentes IBEs nas concentrações subinibitórias de CIM/2 e CIM/4. \*Indica diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), quando comparado com outro IBE. \*\*Indica diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), quando comparado com os outros dois IBEs.

### 6.3 Associação de inibidores da bomba de efluxo com ciprofloxacina, gentamicina e meropenem

Para avaliar a capacidade de inibir as bombas de efluxo, foram selecionadas duas concentrações subinibitórias dos IBEs (CIM/2 e CIM/4) para verificar o seu potencial para reduzir o efluxo do corante brometo de etídio, um intercalador de ácido nucleico que é um substrato para as bombas de efluxo. As células bacterianas tratadas com os IBEs aumentaram significativamente a sua fluorescência em comparação com os isolados não tratados. Nos tratamentos CIM/2, houve um aumento da fluorescência de 79,5% ( $p=0,0034$ ), 203,2% ( $p < 0,0001$ ) e 350,1% ( $p < 0,0001$ ), e com CIM/4 os aumentos foram de 120,3% ( $p < 0,0001$ ), 279,0% ( $p < 0,0001$ ) e 254,8% ( $p < 0,0001$ ) para CCCP, prometazina e fluoxetina, respectivamente (Figura 10).

A prometazina reduziu as CIMs da ciprofloxacina e do meropenem quando associada às CIM/2 e CIM/4, para a gentamicina a redução foi observada apenas para a associação com a CIM/2. No entanto, apenas a associação entre CIM/2 da prometazina e ciprofloxacina apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0134$ ) quando comparada às células bacterianas tratadas apenas com o antimicrobiano (Tabela 4).

Para as associações com fluoxetina e CCCP, as CIMs médias geométricas de todos os antimicrobianos foram reduzidas (Tabela 4). No entanto, apenas a associação da CIM/2 da CCCP e da gentamicina diferiu estatisticamente do antimicrobiano isolado ( $p=0,0307$ ).

As associações de PMZ, FLU e CCCP com antimicrobianos também foram efetuadas em biofilmes. Para o efeito, foram escolhidas as concentrações de CEMB/2 e CEMB/4 de cada EPI. Oito cepas categorizadas como fortes (4) e fracas (4) formadoras de biofilme foram utilizadas nesta análise. Os dados destas associações são apresentados na Tabela 5.

A prometazina (CEMB/2 e CEMB/4) reduziu significativamente as CEMBs para a ciprofloxacina ( $p=0,0014$  e  $p=0,0256$ , respectivamente) e o meropenem ( $p=0,0002$  e  $p=0,0145$ ,

respetivamente). Relativamente à gentamicina, apenas a associação com CEMB/2 reduziu significativamente as CEMB em comparação com o antimicrobiano isolado (0,0070).

A fluoxetina (CEMB/2 e CEMB/4) reduziu significativamente as CEMBs da gentamicina ( $p=0,0256$  e  $p=0,0256$ , respetivamente) e do meropenem ( $p=0,0005$  e  $p=0,0025$ , respetivamente). Também reduziu as CEMBs da ciprofloxacina, mas sem diferença estatística.

CCCP (CEMB/2 e CEMB/4) reduziu significativamente as CEMBs da gentamicina ( $p=0,0002$  e  $p=0,0070$ , respetivamente) e do meropenem ( $p=0,0005$  e  $p=0,0009$ , respetivamente). Mostrou também uma redução significativa das CEMBs da ciprofloxacina quando associada à CEMB/2 ( $p=0,0002$ ).

Embora não tenha havido correlação estatística para todas as associações, foi possível observar que os inibidores de bombas de efluxo favoreceram a redução de CEMB para todos os antimicrobianos testados, indicando a relevância das bombas de efluxo para a manutenção do biofilme.

O efeito das associações na biomassa do biofilme também foi avaliado. Foi demonstrado que as associações com CCCP reduzem significativamente a biomassa dos biofilmes quando comparadas com os antimicrobianos isoladamente. Os outros IBEs não pareceram melhorar a capacidade dos antimicrobianos para reduzir a biomassa dos biofilmes, apenas no caso do meropenem quando associado à fluoxetina (Figura 10).

Tabela 4 - Atividade antibacteriana da prometazina (PMZ), fluoxetina (FLU) e carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP) combinados com antibióticos.

Cepas	Isolado	Associado						Isolado	Associado						Isolado	Associado					
		PMZ		FLU		CCCP			PMZ		FLU		CCCP			PMZ		FLU		CCCP	
		CIP	CIM/2	CIM/4	CIM/2	CIM/4	CIM/2		CIM/4	GEN	CIM/2	CIM/4	CIM/2	CIM/4		CIM/2	CIM/4	MER	CIM/2	CIM/4	CIM/2
MB2	32	4	16	16	16	8	16	8	4	32	8	16	2	8	128	16	128	128	128	8	32
MB9	32	4	16	16	16	16	16	8	4	16	8	8	4	8	8	8	16	4	8	8	16
MB33	16	4	16	8	16	16	16	16	2	32	16	16	4	16	256	256	256	128	256	256	256
MB36	32	8	32	16	16	8	16	8	8	8	8	8	8	8	256	256	256	256	256	256	256
MB37	32	4	16	16	16	16	16	8	4	16	8	8	4	16	256	128	256	256	256	256	256
MB93	16	4	4	8	8	8	8	256	64	128	128	128	64	64	64	64	64	64	64	32	64
MB143	32	8	8	16	16	32	32	256	64	128	256	256	128	128	128	128	128	128	128	128	128
NID29	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
NID45	256	32	256	32	64	256	256	256	256	256	256	256	32	128	8	8	8	4	8	8	8
NID47	128	32	128	128	128	128	128	256	256	256	256	256	128	128	8	8	8	2	8	4	8
NID51	256	16	128	256	256	256	256	256	256	256	256	256	128	128	8	4	8	8	8	8	8
NID86	256	64	128	256	256	256	256	256	256	256	256	256	128	256	4	4	4	4	4	4	8
NID91	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	4	2	4	4	4	2	4
NID94	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	4	2	4	4	4	2	4
NID110	16	2	2	8	8	2	4	4	25	25	1	1	0,125	0,25	32	4	8	8	8	16	16
NID127	8	1	1	8	8	4	4	2	25	25	1	1	0,125	0,25	16	16	16	16	16	16	16
NID144	256	32	64	128	128	16	16	256	256	256	256	256	16	32	64	8	64	64	64	8	16
SRN1	256	256	256	128	256	64	256	64	64	64	64	64	32	128	256	256	256	128	256	256	256
SRN3	256	128	256	256	256	256	256	64	32	64	64	64	16	128	256	256	256	256	128	256	256
SRN7	256	128	256	256	256	256	256	64	32	32	64	64	32	64	32	32	32	4	4	8	16
SRN27	256	128	256	256	256	128	256	64	32	32	16	16	32	64	8	8	8	4	4	4	8
SRN35	256	128	256	256	256	256	256	128	32	64	128	128	32	64	256	256	256	256	256	128	256
SRN65	256	256	256	256	256	256	256	256	32	32	128	128	64	64	256	256	256	128	256	256	256
NEZ11	64	32	64	32	64	32	64	256	256	256	128	256	64	128	8	4	4	4	4	0,5	8
NEZ26	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	2	1	1	1	2	2	8
NEZ71	128	32	64	64	64	32	128	256	256	256	128	256	32	64	4	2	2	2	4	4	4
NEZ77	128	16	64	64	64	64	64	256	128	128	128	256	64	128	8	4	4	4	8	4	4
NEZ85	128	64	64	128	128	64	64	2	2	8	1	1	2	2	4	2	2	4	4	4	4
NEZ148	256	128	256	128	128	64	64	256	256	256	256	256	32	128	8	4	4	4	4	8	16
NEZ153	8	2	4	8	8	4	4	2	0,25	0,25	1	1	1	2	8	4	8	8	8	8	8
Média Geométrica	81,3	20,8*	46,4	51,7	57,5	40,6	51,7	51,7	34,8	57,0	37,5	41,7	21,3*	29,5	24,6	15,2	20,8	16,0	20,3	16,4	23,4

Fonte: Elaborada pelo autor.

GEN: Gentamicina; CIP: Ciprofloxacina; MER: Meropenem. \* Indica diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparada a média geométrica do grupo tratado com IBEs e o antimicrobiano isolado.

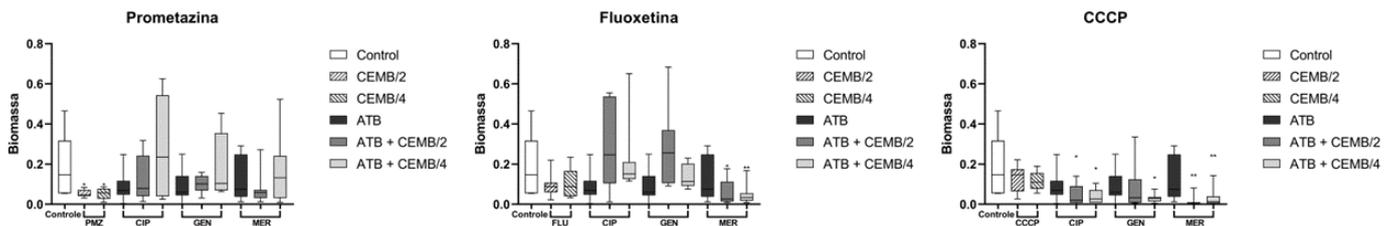
Tabela 5 – Atividade das associações de prometazina (PMZ), fluoxetina (FLU) e carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP) nas CEMBs dos antimicrobianos.

Cepas	Isolado	Associado		Isolado	Associado		Isolado	Associado	
	CIP	PMZ/2	PMZ/4		GEN	PMZ/2		PMZ/4	MER
MB2	>128	64	>128	>128	128	>128	>128	64	>128
SRN7	>128	32	64	>128	128	>128	128	<16	<16
NID110	>128	64	64	>128	64	128	>128	32	32
NID144	>128	128	>128	>128	128	128	128	<16	<16
NID45	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	64	>128
NEZ77	>128	32	64	>128	>128	>128	>128	<16	<16
NEZ85	>128	128	128	>128	128	>128	>128	<16	32
ATCC	>128	128	64	>128	128	>128	>128	<16	<16
<b>Média geométrica</b>	<b>256</b>	<b>83*</b>	<b>117*</b>	<b>256</b>	<b>140*</b>	<b>215</b>	<b>215</b>	<b>16*</b>	<b>27*</b>
Cepas	Isolado	Associado		Isolado	Associado		Isolado	Associado	
	CIP	FLU/2	FLU/4		GEN	FLU/2		FLU/4	MER
MB2	>128	>128	>128	>128	128	128	>128	128	>128
SRN7	>128	>128	>128	>128	64	64	128	<16	<16
NID110	>128	32	128	>128	32	128	>128	<16	<16
NID144	>128	>128	>128	>128	>128	>128	128	<16	<16
NID45	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	<16	<16
NEZ77	>128	<16	64	>128	>128	>128	>128	<16	<16
NEZ85	>128	128	128	>128	64	128	>128	<16	<16
ATCC	>128	32	128	>128	32	128	>128	<16	<16
<b>Média geométrica</b>	<b>256</b>	<b>91</b>	<b>166</b>	<b>256</b>	<b>99*</b>	<b>152*</b>	<b>215</b>	<b>11*</b>	<b>12*</b>
Cepas	Isolado	Associado		Isolado	Associado		Isolado	Associado	
	CIP	CCCP/2	CCCP/4		GEN	CCCP/2		CCCP/4	MER
MB2	>128	128	>128	>128	32	128	>128	128	128
SRN7	>128	128	>128	>128	32	64	128	<16	<16
NID110	>128	32	64	>128	<16	<16	>128	<16	<16
NID144	>128	128	>128	>128	128	>128	128	32	128
NID45	>128	32	>128	>128	128	>128	>128	32	64
NEZ77	>128	<16	32	>128	<16	32	>128	32	64
NEZ85	>128	32	<16	>128	<16	<16	>128	<16	64
ATCC	>128	<16	32	>128	32	32	>128	<16	<16
<b>Média geométrica</b>	<b>256</b>	<b>38*</b>	<b>83</b>	<b>256</b>	<b>27*</b>	<b>49*</b>	<b>215</b>	<b>19*</b>	<b>35*</b>

Fonte: Elaborada pelo autor.

GEN: Gentamicina; CIP: Ciprofloxacina; MER: Meropenem. \* Indica diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparada a média geométrica do grupo tratado com IBEs e o antimicrobiano isolado.

Figura 10 – Efeitos das associações dos antimicrobianos com PMZ, FLU e CCCP sobre a biomassa de biofilmes maduros de *P. aeruginosa* (n=8).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 10. Efeitos das associações dos antimicrobianos: ciprofloxacina, gentamicina e meropenem com os inibidores da bomba de efluxo PMZ, FLU e CCCP em biofilmes maduros de *P. aeruginosa* (n=8). Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão da biomassa do biofilme avaliada pela técnica de coloração com cristal violeta. \*Indica diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os biofilmes expostos a prometazina, fluoxetina e CCCP e o controle de crescimento. \*\*Indica diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,0071$ ) quando comparadas com o controle de crescimento. ATB: Antibiótico.

## 7 DISCUSSÃO

Dos vários mecanismos de resistência aos antibióticos, o efluxo ativo dos antimicrobianos representa uma importante via associada ao fenótipo multirresistente (MDR) em *Pseudomonas aeruginosa* (LISTER *et al.*, 2009). Por esse motivo, a busca de inibidores para bombas de efluxo (IBEs) se torna uma alternativa interessante no manejo da resistência antimicrobiana, uma vez que são capazes de reaver a ação de antibióticos que são expulsos da célula bacteriana por esses sistemas de efluxo (SHARMA *et al.*, 2019).

Para *P. aeruginosa*, quatro sistemas de efluxo ganham destaque, são eles: *MexAB-OprM*, *MexCD-OprJ*, *MexEF-OprN* e *MexXY-OprM*, conferindo resistência à uma extensa lista de antimicrobianos, dentre eles, as fluoroquinolonas, os aminoglicosídeos e os carbapenêmicos, em especial, meropenem (PAN *et al.*, 2016; ISLAMIEH *et al.*, 2018; LORUSSO *et al.*, 2022). Alguns IBEs já são descritos para essas bombas de efluxo na literatura, porém devido a problemas de toxicidade, alta especificidade para poucos sistemas de efluxo e outros fatores, nenhum deles chegou ao mercado comercial (NAKASHIMA *et al.*, 2013; ARON & OPPERMAN, 2016; SHARMA *et al.*, 2019).

Nesse contexto, a busca por novos inibidores que atuem em uma maior diversidade de sistemas de efluxo e não sejam tóxicos faz-se relevante. Prometazina e fluoxetina são fármacos já utilizados na prática clínica como anti-histamínico e antipsicótico, respectivamente, e são descritos como inibidores de bomba de efluxo para algumas espécies bacterianas e fúngicas (SIDRIM *et al.*, 2017; NZAKIZWANAYO *et al.*, 2017; BRILHANTE *et al.*, 2018; CORDEIRO *et al.*, 2020; GRIMSEY *et al.*, 2020). Porém, poucos trabalhos na literatura avaliam a ação desses medicamentos frente as bombas de efluxo presentes em *P. aeruginosa*.

Além destes, o CCCP, IBE clássico amplamente utilizado em outros estudos para avaliar a atividade de bomba de efluxo de células bacterianas (POURNARAS *et al.*, 2005; MALEK *et al.*, 2009; MOMBESHORA; MUKANGANYAMA, 2017; SANCHEZ-CARBONEL *et al.*, 2021), também foi avaliado frente às cepas clínicas de *P. aeruginosa* a fim de analisá-lo individualmente e compará-lo com os IBEs não clássicos do estudo, PMZ e FLU.

Prometazina apresentou CIMs variando de 195.3 a 781.2 µg/mL. Estudos com outros bacilos Gram negativos também encontraram efeitos antibacterianos sobre células planctônicas para prometazina com CIMs de 128 µg/mL para *Escherichia coli* e 780 µg/mL para *Burkholderia pseudomallei* (SIDRIM *et al.*, 2017; LEHTINEN & LILIUS, 2007).

Alguns mecanismos são propostos para a ação antimicrobiana das fenotiazinas, os principais deles estão alicerçados na inibição de bombas de efluxo, gerada pela capacidade desses compostos em impedir o transporte de cálcio e consequente inibição de funções enzimáticas dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , como a geração de energia para a célula necessária para ativação dos sistemas de efluxo, e na capacidade desses fármacos em se intercalar ao DNA bacteriano e inibir replicação do microrganismo (VARGA *et al.*, 2017).

Porém, como observado em nosso estudo e nos trabalhos supracitados com outros bacilos Gram negativos, as concentrações das fenotiazinas que apresentam efeito antimicrobiano *in vitro* seriam muito maiores do que as que podem ser alcançadas no paciente acometido por uma infecção com esse patógeno (MARTINS *et al.*, 2008). Deste modo, é importante trabalhar na perspectiva de utilizar a prometazina como um adjuvante, em associação com antimicrobianos clássicos, comumente utilizados na prática clínica.

Partindo desse princípio, concentrações subinibitórias da prometazina (CIM/2 e CIM/4) foram avaliadas quanto ao seu potencial em inibir bombas de efluxo nos isolados do presente estudo. Para isso, ensaios de acúmulo intracelular com brometo de etídio foram realizados. O brometo de etídio (EtBr) é o corante de ácido nucleico fluorescente mais utilizado para inferir indiretamente a atividade de efluxo de células bacterianas (FUJIWARA *et al.*, 2022). Medir a fluorescência de células tratadas com brometo de etídio permite avaliar o quanto o corante se acumulou na bactéria e fluoresceu, logo, quanto maior a atividade de efluxo na cepa bacteriana, menor será o acúmulo de corante devido à sua extrusão para o ambiente extracelular, consequentemente, menor será sua fluorescência (BLAIR; PIDDOCK, 2016).

A prometazina foi capaz de aumentar significativamente a fluorescência das células bacterianas em comparação às células não tratadas, aumentos em 223.6% e 137.9%, para CIM/2 e CIM/4, respectivamente. Logo, o maior acúmulo de brometo de etídio após o tratamento das células com prometazina permite comprovar sua ação em bombas de efluxo presentes em *P. aeruginosa*. Porém, a partir dessa metodologia, não é possível identificar como e quais bombas de efluxo estão sendo inibidas pelo composto.

Chan *et al.* (2007) hipotetizam que as fenotiazinas atuem nas bombas de efluxo RND através da sua capacidade de perturbar o gradiente de prótons da membrana, que é necessário para energizar o processo de extrusão do substrato antimicrobiano. Estudos que elucidem os mecanismos de ação da prometazina envolvidos na inibição de bombas de efluxo podem esclarecer de que forma este fármaco atua para além da perturbação do gradiente de prótons, como: alteração da regulação de expressão dos genes envolvidos na montagem das

proteínas que compõem as bombas, competição com os antimicrobianos por sítios de ligação em sua estrutura, modificação do design químico do antimicrobiano através da ligação com o mesmo, dentre outros (PUZARI & CHETIA, 2017). Essas informações poderão, também, verificar quais sistemas de efluxo são inibidos por este fármaco, podendo explicar as diferenças observadas nas reduções de CIMs entre os diferentes isolados e drogas antimicrobianas.

As CIMs de FLU variaram de 78.1 a 312.5 µg/mL. Sousa *et al.*, (2018) encontram CIM de 161 µg/mL para *P. aeruginosa*, porém, os autores do estudo afirmam que apesar da inibição de bombas de efluxo seja o mecanismo proposto para a atividade antibacteriana da fluoxetina, ainda não se sabe em detalhes os processos que levam a essa inibição. Para estudos em micologia, o efeito proposto para os inibidores seletivos da recaptção da serotonina, como a fluoxetina, é a apoptose celular por danos à membrana plasmática e mitocondrial (TEKINTAS *et al.*, 2020). Assim, hipotetiza-se que a fluoxetina atue gerando danos à membrana plasmática bacteriana.

No presente estudo, a fluoxetina também foi capaz de aumentar significativamente a fluorescência das células bacterianas em comparação às células não tratadas em 352% e 246.5%, em CIM/2 e CIM/4, respectivamente. Poucos estudos avaliam a atuação da fluoxetina como inibidor de bomba de efluxo. Nzakizwanayo *et al.*, (2017) também utilizando a metodologia de acúmulo intracelular com brometo de etídio, verificou que fluoxetina apresentou um maior aumento de fluorescência que uma fenotiazina utilizada em seu estudo, a tioridazina, fato também observado em nosso estudo, porém os autores analisaram a ação desses compostos sobre *Proteus mirabilis*, e não *P. aeruginosa*.

Nzakizwanayo *et al.*, (2017) avaliou, por *docking molecular*, que a fluoxetina se liga a um bolso de ligação rico em aminoácidos hidrofóbicos no sistema de efluxo *Bcr/ClfA* presente em *P. mirabilis*. Porém, assim como em PMZ, é importante elucidar como e quais sistemas de efluxo em *P. aeruginosa* podem ser inibidos por esse composto para que se explique as diferenças nas interações entre as diferentes cepas e drogas. Porém, é possível hipotetizar que a fluoxetina deve atuar inibindo sistemas de efluxo menos expressivos na modulação da resistência antimicrobiana em *P. aeruginosa* em comparação com a prometazina, uma vez que a prometazina causou reduções mais acentuadas nas CIMs dos antimicrobianos clássicos.

Para CCCP, as MICs variaram de 256 a 2048 µM. O mecanismo de ação do CCCP é bem elucidado na literatura, ele atua como inibidor de bomba de efluxo reduzindo a produção de ATP, atuando como um desacoplador da fosforilação oxidativa, e aumentando a

permeabilidade bacteriana a H<sup>+</sup>, consequentemente perturbando o gradiente de prótons, necessário para ativação dos sistemas de efluxo (FANÉLUS; DESROSIERS, 2013; RASHED *et al.*, 2020).

No presente estudo, esse composto foi capaz de aumentar significativamente a fluorescência das células bacterianas em comparação às células não tratadas em 91,5% e 130,7%, em CIM/2 e CIM/4, respectivamente. Apesar deste composto ser o IBE clássico utilizado no estudo, esses resultados representam o menor aumento de fluorescência quando comparado à prometazina e fluoxetina nas duas concentrações subinibitórias testadas.

No que diz respeito a associação dos IBEs com os antimicrobianos clássicos, foi possível observar que, de maneira geral, as CIMs de ciprofloxacina pareceram sofrer maiores reduções quando associadas aos IBEs, a exceção do CCCP que se associou melhor à gentamicina. Tal resultado, pode ser explicado pelo fato de que as fluorquinolonas são substratos para as quatro bombas de efluxo clinicamente relevantes em *P. aeruginosa*: *MexAB-OprM*, *MexCD-OprJ*, *MexEF-OprN* e *MexXY-OprM*, enquanto meropenem e gentamicina para apenas uma delas, *MexAB-OprM* e *MexXY-OprM*, respectivamente (REHMAN *et al.*, 2018; BIALVAEI *et al.*, 2021).

Além disso, as menores reduções de CIMs observadas para as associações com meropenem podem estar associadas ao fato de que a maioria das cepas são produtoras de carbapenemases, assim, apesar do possível aumento do influxo dos antimicrobianos gerado pelos IBEs do estudo, o antibiótico ainda teria que resistir à ação das enzimas, o que pode ter implicado em piores resultados nas associações.

Também é possível observar que, apesar da menor fluorescência gerada pelo tratamento com CCCP e PMZ, quando comparados à fluoxetina, são obtidos melhores resultados de associação que os obtidos para fluoxetina. Estes resultados podem indicar que PMZ e CCCP parecem atuar em bombas clinicamente mais relevantes no contexto da resistência às fluorquinolonas, aminoglicosídeos e carbapenêmicos quando comparados as bombas inibidas pela fluoxetina.

Observou-se também que as interações do CCCP foram melhores com gentamicina quando em comparação com os resultados obtidos por PMZ e FLU. Hipotetiza-se, então, que o CCCP pode atuar de maneira mais significativa nas bombas de efluxo que são responsáveis pelo efluxo de aminoglicosídeos, como a *MexXY-OprM*, por exemplo (THACHARODI; LAMOND, 2022). Porém, não há dados na literatura que permitem comprovar essa hipótese.

Além de modular a resistência antimicrobiana, as bombas de efluxo também atuam em outros aspectos da fisiologia bacteriana, dentre eles, a comunicação intercelular, *quorum sensing* e consequente formação de biofilme, extrusão de adesinas, toxinas e outros compostos proteicos. Logo, inibir esses sistemas de efluxo permite avaliar, também, sua contribuição para virulência e patogenicidade bacteriana (BLANCO *et al.*, 2018; DAVIN-REGLI *et al.*, 2021; HUANG *et al.*, 2022).

Os IBEs do estudo foram testados frente aos biofilmes de *P. aeruginosa*. Foram encontradas CEMBs para todos os compostos, demonstrando sua atuação na redução da atividade metabólica desses biofilmes. Além disso, concentrações subeliminatórias CEMB/2 e CEMB/4 de prometazina e CCCP reduziram a biomassa desses biofilmes, fato não observado para fluoxetina.

Prometazina também apresentou efeitos antibiofilme contra *Burkholderia pseudomallei*, Sidrim *et al.*, (2016) afirmam que esses resultados se devem ao fato de que as bombas de efluxo desempenham um importante papel na manutenção de biofilmes, uma vez que são responsáveis por eliminar substâncias tóxicas e demais resíduos que enfraqueceriam as células que compõe o biofilme. Fiallos *et al.* (2022) também demonstraram o efeito da prometazina sobre a biomassa de biofilmes de duas espécies de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, sendo responsável por significativa redução no teor de proteínas e carboidratos desses biofilmes, comprovando que a matriz desses biofilmes também é alterada na presença desse inibidor.

Quanto à ação do CCCP, Ikonmidis *et al.* (2008) também observaram sua atividade frente a biofilmes de *P. aeruginosa*, porém os autores desse estudo afirmam que é difícil estabelecer um mecanismo específico que explique a ação desse composto sobre os biofilmes, uma vez que o CCCP atua sobre todos os transportadores dependentes de força próton motiva na célula bacteriana, podendo desencadear efeitos diversos no metabolismo microbiano.

No presente estudo, o CCCP associado em CEMB/2 também gerou efeitos aditivos frente a atividade metabólica dos biofilmes para todos os antimicrobianos testados, porém esse IBE associado causou aumento nas biomassas de ciprofloxacina e meropenem em 19.6% e 10.8%, respectivamente, e uma redução de 47.1% na biomassa de gentamicina. Logo, assim como para as cepas planctônicas, observou-se uma melhor interação entre CCCP e gentamicina, quando comparada aos outros dois antimicrobianos.

Baugh *et al.*, (2014), utilizaram, dentre os IBEs do seu estudo, uma fenotiazina, a clorpromazina, e o CCCP, sobre biofilmes de algumas espécies bacterianas, dentre elas *P.*

*aeruginosa*. Os autores observaram que os dois inibidores tiveram ação significativa na redução da formação de biofilme nessa espécie e sugerem que, independentemente do mecanismo envolvido na inibição do efluxo, esse processo reprime componentes da matriz dos biofilmes, essenciais para maturação e manutenção destes. Logo, os dados das associações de CCCP gerando aumentos de biomassa, vai em desencontro ao observado na literatura (BAUGH *et al.*, 2014; IKONOMIDIS *et al.*, 2008).

Com relação à fluoxetina, há escassez de trabalhos a utilizando como IBE em biofilmes bacterianos, dificultando a comparação com outros resultados da literatura. Porém, Nzakizwanayo *et al.* (2017), utilizando fluoxetina na proposta de IBE, não observaram reduções significativas no número de células viáveis e na biomassa de biofilmes de *P. aeruginosa* formados em cateteres urinários.

No presente estudo, a fluoxetina foi capaz de inibir a atividade metabólica dos biofilmes maduros de *P. aeruginosa*. As associações desse composto com os antimicrobianos também geraram efeitos sinérgicos e aditivos sobre a redução na atividade metabólica destes, porém, assim como na pesquisa de Nzakizwanayo *et al.*, (2017) não foi capaz de reduzir sua biomassa. Oliveira *et al.*, (2018) observaram o mesmo fenômeno descrito em nosso estudo, onde FLU foi mais eficaz em prejudicar o metabolismo dos biofilmes de *Candida* do que em reduzir a biomassa destes, os autores dessa pesquisa hipotetizam que a baixa lipofilia da fluoxetina seja responsável por esses resultados, uma vez que as características lipofílicas da molécula podem permitir uma maior penetração no biofilme, destruindo sua matriz.

Silva *et al.*, (2017), também trabalhando com espécies de *Candida*, encontraram atividade antibiofilme para fluoxetina. Os autores propõem que o mecanismo de ação da fluoxetina no biofilme seja igual ao proposto para as células planctônicas, gerando distúrbios da membrana plasmática. Outro fato também observado por Silva *et al.*, (2017), é que as concentrações necessárias para eliminar os biofilmes são semelhantes às concentrações inibitórias para as células planctônicas. Em nosso estudo, as CIMs e CEMBs de fluoxetina são, também, mais próximas que as observadas em PMZ e CCCP, indicando que esse fármaco parece ter ação semelhante em células bacterianas.

Por fim, pontua-se que as concentrações subinibitórias e subeliminatórias de biofilmes para os IBEs utilizadas nas associações do presente estudo são maiores do que as que podem ser alcançadas no paciente acometido por uma infecção com esse patógeno, dificultando a visualização desses IBEs no cenário clínico.

Apesar disso, caracterizar esses novos inibidores de bombas de efluxo permite a disponibilidade de um maior arsenal de compostos a serem utilizados em pesquisas

laboratoriais, além da possibilidade de utilização desses compostos em dispositivos médicos de longa duração, como a impregnação em cateteres, que são amplamente encorajados por outras pesquisas (NZAKIZWANAYO *et al.*, 2017; SIDRIM *et al.*, 2019), especialmente no contexto de impossibilitar a formação de biofilmes microbianos nesses dispositivos.

## 8 CONCLUSÃO

No presente estudo, PMZ, FLU e CCCP apresentaram efeito antimicrobiano frente as cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* em sua forma planctônica e em biofilme. Além disso, os ensaios de acumulação intracelular de brometo de etídio possibilitaram comprovar a ação desses compostos como IBEs para *P. aeruginosa*.

Embora as cepas resistentes não tenham sido sensibilizadas após a associação com os compostos do estudo, importantes reduções nas CIMs dos antimicrobianos, em especial para ciprofloxacina, foram observadas. Os IBEs também geraram efeitos aditivos para ação dos antimicrobianos na redução da atividade metabólica dos biofilmes, embora reduções significativas na biomassa destes não tenham sido observados.

Logo, mais estudos são necessários a fim de caracterizar como e quais bombas de efluxo de *P. aeruginosa* são inibidas pelos IBEs utilizados nesta pesquisa, permitindo discutir as diferentes interações observadas a partir das associações IBEs-Antimicrobianos. Análises moleculares e estudos computacionais, utilizando *docking molecular*, podem ser ferramentas importantes para o avanço nesses estudos.

## REFERÊNCIAS

- ABUSHAHEEN, M. A.; MUZAHEED; FATANI, A. J.; ALOSAIMI, M.; MANSY, W.; GEORGE, M.; ACHARYA, S.; RATHOD, S.; DIVAKAR, D. D.; JHUGROO, C.; VELLAPPALLY, S.; KHAN, A. A.; SHAIK, J.; JHUGROO, P. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. **Disease-a-Month**, v. 66, n. 6, 2020.
- AHMADIAN, L.; BAZGIR, Z. N.; AHANJAN, M.; VALADAN, R.; GOLI, H. R. Role of Aminoglycoside-Modifying Enzymes (AMEs) in Resistance to Aminoglycosides among Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the North of Iran. **BioMed Research International**, v. 2021, 2021.
- ALAV, I.; SUTTON, J. M.; RAHMAN, K. M. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 8, 2018.
- ALENAZY, R. Drug Efflux Pump Inhibitors: A Promising Approach to Counter Multidrug Resistance in Gram-Negative Pathogens by Targeting AcrB Protein from AcrAB-TolC Multidrug Efflux Pump from *Escherichia coli*. **Biology (Basel)**, v. 11, n. 9, 2022.
- AL RASHED, N.; JOJI, R. M.; SAEED, N. K.; BINDAYNA, K. M. Detection of Overexpression of Efflux Pump expression in Fluoroquinolone-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **International journal of applied & basic medical research**, v. 10, n. 1, p. 37-42, 2020.
- ANES, J.; MCCUSKER, M. P.; FANNING, S.; MARTINS, M. The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015.
- ARON, Z.; OPPERMAN, T. J. Optimization of a novel series of pyranopyridine RND efflux pump inhibitors. **Current opinion in microbiology**, v. 33, 2016.
- AZAM, M. W.; KHAN, A. U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 1, p. 350-359, 2019.
- BARON, S. A.; ROLAIN, J. M. Efflux pump inhibitor CCCP to rescue colistin susceptibility in mcr-1 plasmid-mediated colistin-resistant strains and Gram-negative bacteria. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 7, 2018.
- BASSETTI, M.; VENA, A.; CROXATTO, A.; RIGHI, E.; GUERY, B. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Drugs in context**, v.7, p. 1-18, 29 maio 2018.
- BAUGH, S.; PHILLIPS, C. R.; EKANAYAKA, A. S.; PIDDOCK, L. J. V.; WEBBER, M. A. Inhibition of multidrug efflux as a strategy to prevent biofilm formation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 3, 2014.
- BIALVAEI, A. Z.; RAHBAR, M.; HAMIDI-FARAHANI, R.; ASGARI, A.; ESMAILKHANI, A.; DASHTI, Y. M.; SOLEIMAN-MEIGOONI, S. Expression of RND efflux pumps mediated antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 153, 2021.

BLAIR, J. M. A.; PIDDOCK, L. J. V. How to measure export via bacterial multidrug resistance efflux pumps. **mBIO**, v. 7, n. 4, 2016.

BLAIR, J. M. A.; RICHMOND, G. E.; PIDDOCK, L. J. V. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. **Future Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 1165–1177, 2014.

BLANCO, P.; SANZ-GARCÍA, F.; HERNANDO-AMADO, S.; MARTÍNEZ, J. L.; ALCALDE-RICO, M. The development of efflux pump inhibitors to treat Gram-negative infections. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 13, n.10, p. 919-931, 2018.

BOTELHO, J.; GROSSO, F.; PEIXE, L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* - Mechanisms, epidemiology and evolution. **Drug Resistance Updates**, v. 44, 2019.

BOYD, S. E.; LIVERMORE, D. M.; HOOPER, D. C.; HOPE, W. W. Metallo- $\beta$ -Lactamases: Structure, Function, Epidemiology, Treatment Options, and the Development Pipeline. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 10, 2020.

BRILHANTE, R. S. N.; DE OLIVEIRA, J. S.; DE JESUS EVANGELISTA, A. J.; PEREIRA, V. S.; ALENCAR, L. P.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; CÂMARA, L. M. C.; DE LIMA-NETO, R. G.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. In vitro effects of promethazine on cell morphology and structure and mitochondrial activity of azole-resistant *Candida tropicalis*. **Medical mycology**, v. 56, n. 8, p. 1012–1022, 2018.

BROOKS, G. F. CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; MIETZNER, T. A. **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 26. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

BURONI, S.; MATTHIJS, N.; SPADARO, F.; ACKER, H. V.; SCOFFONE, V. C.; PASCA, M. R.; RICCARDI, G.; COENYE, T. Differential roles of RND efflux pumps in antimicrobial drug resistance of sessile and planktonic *Burkholderia cenocepacia* cells. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 12, 2014.

CAI, B.; ECHOLS, R.; MAGEE, G.; FERREIRA, J. C. A.; MORGAN, G.; ARIYASU, M.; SAWADA, T.; NAGATA, T. Prevalence of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Infections in the United States Predominated by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Open Forum Infectious Diseases**, [S.L.], v. 4, n. 3, 2017.

CAMPANA, E. H.; XAVIER, D. E.; PETROLINI, F. V. B.; MOURA, J. R. C.; ARAUJO, M. R. E.; GALES, A. C. Carbapenem-resistant and cephalosporin-susceptible: a worrisome phenotype among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, 2017.

CANTISANI, C.; RICCI, S.; GRIECO, T.; PAOLINO, G.; FAINA, V.; SILVESTRI, E.; CALVIERI, S. Topical promethazine side effects: our experience and review of the literature. **BioMed research international**, 2013.

CDC. **Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019**. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019.

- CHAN, Y. Y.; ONG, Y. M.; CHUA, K. L. Synergistic interaction between phenothiazines and antimicrobial agents against *Burkholderia pseudomallei*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 2, 2007.
- CHEVALIER, S.; BOUFFARTIGUES, E.; BODILIS, J.; MAILLOT, O.; LESOUHAITIER, O.; FEUILLOLEY, M. G. J.; ORANGE, N.; DUFOUR, A.; CORNELIS, P. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 5, p. 698-722, 2017.
- CORDEIRO, R. A.; PORTELA, F. V. M.; PEREIRA, L. M. G.; ANDRADE, A. R. C.; SOUSA, J. K.; AGUIAR, A. L. R.; PERGENTINO, M. L. M.; SALES, G. S.; OLIVEIRA, J. S.; MEDRANO, D. J. A.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; SIDRIM, J. J. C. Efflux pump inhibition controls growth and enhances antifungal susceptibility of *Fusarium solani* species complex. **Future Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 9-20, 2020.
- COLCLOUGH, A. L.; ALAV, I.; WHITTLE, E. E.; PUGH, H. L.; DARBY, E. M.; LEGOOD, S. W.; MCNEIL, H. E.; BLAIR, J. M. A. RND efflux pumps in Gram-negative bacteria; regulation, structure and role in antibiotic resistance. **Future Microbiology**, v. 15, n. 2, 2020.
- DAVIN-REGLI, A.; PAGES, J. M.; FERRAND, A. Clinical status of efflux resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. **Antibiotics**, v.10, n. 9, 2021.
- DELMAR, J. A.; SU, C.; YU, E. W. Bacterial multidrug efflux transporters. **Annual Review of Biophysics**, v. 43, 2014.
- DIGGLE, S. P.; WHITELEY, M. Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. **Microbiology (Reading, England)**, v. 166, n. 1, p. 30–33, 2020.
- DOUAFER, H.; ANDRIEU, V.; PHANSTIEL IV, O.; BRUNEL, J. M. Antibiotic adjuvants: Make antibiotics great again! **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 19, 2019.
- DRISCOLL, J. A.; BRODY, S. L.; KOLLEF, M. H. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Drugs**, v. 67, n. 3, 2007.
- DU, D.; VOSS, J.; WANG, Z.; CHIU, W.; LUISI, B. F. The pseudo-atomic structure of an RND-type tripartite multidrug efflux pump. **Biological Chemistry**, v. 396, n. 9-10, p. 1073-1082, 2015.
- DU, J.; WANG-KAN, X.; NEUBERGER, A.; VEEN, H. W.; POS, K. M.; PIDDOCK, L. J. V.; LUISI, B. F. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. **Nature Reviews|Microbiology**, v. 16, 2018.
- EL ZOWALATY, M. E.; THANI, A. A. A.; WEBSTER, T. J.; EL ZOWALATY, A. E.; SCHWEIZER, H. P.; NASRALLAH, G. K.; MAREI, H. E.; ASHOUR, H. M. *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. **Future Microbiology**, v. 10, n. 10, 2015.
- EUCAST. Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 6, 2000.

- FANÉLUS, I.; DESROSIERS, R. R. Mitochondrial uncoupler carbonyl cyanide M-chlorophenylhydrazone induces the multimer assembly and activity of repair enzyme protein L-isoaspartyl methyltransferase. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 50, p. 411–423, 2013.
- FIALLOS, N. M.; AGUIAR, A. L. R.; SILVA, B. N.; PERGENTINO, M. L. M.; ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; CORDEIRO, R. A. The potential of phenothiazines Against endodontic pathogens: A focus on *Enterococcus-Candida* Dual-Species biofilm. **Antibiotics (basel)**, v. 11, n. 11, 2022.
- FIGUEREDO, A. C. F.; FREITAS, N. L.; DALMOLIN, T. V.; BRANDÃO, F. PSEUDOMONAS AERUGINOSA: panorama do perfil de resistência aos carbapenêmicos no brasil / *Pseudomonas aeruginosa*. **Brazilian Journal of Development**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 9661-9672, 2021.
- FRATINI, F.; MANCINI, S.; TURCHI, B.; FRISCIA, E.; PISTELLI, L.; GIUSTI, G.; CERRI, D. A novel interpretation of the Fractional Inhibitory Concentration Index: The case *Origanum vulgare* L. and *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst essential oils against *Staphylococcus aureus* strains. **Microbiological Research**, v. 195, 2017.
- FUJIWARA, M.; YAMASAKI, S.; MORITA, Y.; NISHINO, K. Evaluation of efflux pump inhibitors of *MexAB-* or *MexXY-OprM* in *Pseudomonas aeruginosa* using nucleic acid dyes. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 28, 2022.
- GARCÍA-BETANCUR, J. C.; APPEL, T. M.; ESPARZA, G.; GALES, A. C.; LEVY-HARA, G.; CORNISTEIN, W.; VEJA, S.; NUÑEZ, D.; CUELLAR, L.; BAVESTRELLO, L.; CASTAÑEDA-MÉNDEZ, P. F.; VILLALOBOS-VINDAS, J. M.; VILLEGAS, M. V. Update on the epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, 2020.
- GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and Disease**, v.67, n.3, p.159-173, 2013.
- GILLIS, R. J.; WHITE, K. G.; CHOI, K. H.; WAGNER, V. E.; SCHWEIZER, H. P.; IGLEWSKI, B. H. Molecular basis of azithromycin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 9, 2005.
- GRIMSEY, E. M.; FAIS, C.; MARSHALL, R. L.; RICCI, V.; CIUSA, M. L.; STONE, J. W.; IVENS, A.; MALLOCI, G.; RUGGERONE, P.; VARGIU, A. V.; PIDDOCK, L. J. V. Chlorpromazine and Amitriptyline Are Substrates and Inhibitors of the *AcrB* Multidrug Efflux Pump. **mBIO**, v. 11, n. 3, 2020.
- HALAT, D. H.; MOUBARECK, C. A. The Intriguing Carbapenemases of *Pseudomonas aeruginosa*: Current Status, Genetic Profile, and Global Epidemiology. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 95, n. 4, 2022.
- HILLIAM, Y.; KAYE, S.; WINSTANLEY, C. *Pseudomonas aeruginosa* and microbial keratitis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 69, n. 1, 2020.

HOOPER, D. C.; JACOBY, G. A. Topoisomerase Inhibitors: fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [S.L.], v. 6, n. 9, 22 jul. 2016.

HORCAJADA, J. P.; MONTERO, M.; OLIVER, A.; SORLÍ, L.; LUQUE, S.; GÓMEZ-ZORRILLA, S.; BENITO, N.; GRAU, S. Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v.32, n.4, 18 set. 2019.

HU, P.; CHEN, J.; CHEN, Y.; ZHOU, T.; XU, X.; PEI, X. Molecular epidemiology, resistance, and virulence properties of *Pseudomonas aeruginosa* cross-colonization clonal isolates in the non-outbreak setting. **Infection, genetics and evolution**, v. 55, 2017.

HUANG, L.; WU, C.; GAO, H.; XU, C.; DAI, M.; HUANG, L.; HAO, H.; WANG, X.; CHENG, G. Bacterial Multidrug Efflux Pumps at the Frontline of Antimicrobial Resistance: An Overview. **Antibiotics**, v.11, n.4, 2022.

IKONOMIDIS, A.; TSAKRIS, A.; KANELLOPOULOU, M.; MANIATIS, A. N.; POURNARAS, S. 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, 2008.

ISLAMIEH, D. I.; GOUDARZI, H.; KHALEDI, A.; AFSHAR, D.; ESMAEILI, D. Reduced efflux pumps expression of *Pseudomonas aeruginosa* with Satureja Khuzistanica essential oil. **Iranian Journal of Medical Sciences**, v.45, n.6, 2020.

ISLAMIEH, D. I.; AFSHAR, D.; YOUSEFI, M.; ESMAEILI, D. Efflux pump inhibitors derived from natural sources as novel antibacterial agents against *Pseudomonas aeruginosa*: A Review. **International Journal of Medical Reviews**, v.5, n.3, 2018.

JAMSHIDI, S.; SUTTON, J. M.; RAHMAN, K. M. An overview of bacterial efflux pumps and computational approaches to study efflux pump inhibitors. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 2, 2016.

JURADO-MARTÍN, I.; SAINZ-MEJÍAS, M.; McCLEAN, S. *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factor. **International Journal of Molecular Science**, v. 22, n. 6, 2021.

KHALILI, Y.; YEKANI, M.; GOLI, H. R.; MEMAR, M. Y. Characterization of carbapenem resistant but cephalosporin susceptible *Pseudomonas aeruginosa*. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 66, n. 4, p. 529–540, 2019.

KHAN, F.; LEE, J. W.; JAVAID, A.; PARK, S. K.; KIM, Y. M. Inhibition of biofilm and virulence properties of *Pseudomonas aeruginosa* by sub-inhibitory concentrations of aminoglycosides. **Microbial Pathogenesis**, v. 146, 2020.

KHAN, M.; SUMMERS, S.; RICE, S. A.; STAPLETON, F.; WILLCOX, M. D. P.; SUBEDI, D. Acquired fluoroquinolone resistance genes in corneal isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection, Genetics and Evolution**, [S.L.], v. 85, nov. 2020.

KONCHA, R. R.; RAMACHANDRAN, G.; SEPURI, N. B. V.; RAMAIAH, K. V. A. CCCP-induced mitochondrial dysfunction-characterization and analysis of integrated stress response to cellular signaling and homeostasis. **The Febs Journal**, v. 288, n. 19, 2021.

KUMAR, A.; THANKAPPAN, B.; JAYARAMAN, A.; GUPTA, A. Evaluation of Antibiotic Tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* for Aminoglycosides and Its Predicted Gene Regulations through In-Silico Transcriptomic Analysis. **Microbiology research**, v. 12, n. 3, 2021.

LABARCA, J. A.; SALLES, M. J. C.; SEAS, C.; GUZMÁN-BLANCO, M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 2, 2016.

LAGADINOU, M.; ONISOR, M. O.; RIGAS, A.; MUSETESCU, D. V.; GKENTZI, D.; ASSIMAKOPOULOS, S. F.; PANOS, G.; MARANGOS, M. Antimicrobial properties on non-antibiotic drugs in the Era of increased bacterial resistance. **Antibiotics**, v. 9, n. 3, 2020.

LANGENDONK, R. F.; NEILL, D. R.; FOTHERGILL, J. L. The building blocks of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Implications for current resistance-breaking therapies. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, 2021.

LEHTINEN, J.; LILIUS, E. M. Promethazine renders *Escherichia coli* susceptible to penicillin G: real-time measurement of bacterial susceptibility by fluoro-luminometry. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, n. 1, 2007.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 7 ed. - Porto Alegre: Artmed, 2006.

LI, X. Z.; PLÉSIAT, P.; NIKAIDO, H. The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p. 337-418, 2015.

LISTER, P. D.; WOLTER, D. J.; HANSON, N. D. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, 2009.

LIU, Q.; LI, X.; LI, W.; DU, X.; HE, J.; TAO, C.; FENG, Y. Influence of carbapenem resistance on mortality of patients with *Pseudomonas aeruginosa* infection: a meta-analysis. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 5, n. 1, 25 jun. 2015.

LORUSSO, A. B.; CARRARA, J. A.; BARROSO, C. D. N.; TUON, F. F.; FAORO, H. Role of Efflux pumps on antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 24, 2022.

LOWRENCE, R. C.; SUBRAMANIAPILLAI, S. G.; ULAGANATHAN, V.; NAGARAJAN, S. Tackling drug resistance with efflux pump inhibitors: from bacteria to cancerous cells. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 334-353, 2019.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; BENDER, K.; BUCKLEY, D.; STAHL, D. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. – Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, 2012.

MALEK, S. M. A.; AL-ADHAM, I. S.; MATAŁKA, K. Z.; COLLIER, P. J. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Resistance to Zinc Pyrithione: Phenotypic Changes Suggest the Involvement of Efflux Pumps. **Current Microbiology**, v. 59, 2009.

MATESANZ, M.; MENSA, J. Ceftazidime-avibactam. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 34, n. 1, 2021.

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

MEHLA, J.; MALLOCI, G.; MANSBACH, R.; LÓPEZ, C. A.; TSIVKOVSKI, R.; HAYNES, K.; LEUS, I. V.; GRINDSTAFF, S. B.; CASCELLA, R. H.; D'CUNHA, N.; HERNDON, L.; HENGARTNER, N. W.; MARGIOTTA, E.; ATZORI, A.; VARGIU, A. V.; MANRIQUE, P. D.; WALKER, J. K.; LOMOVSKAYA, O.; RUGGERONE, P.; GNANAKARAN, S.; RYBENKOV, V. V.; ZGURSKAYA, H. I. Predictive rules of efflux inhibition and avoidance in *Pseudomonas aeruginosa*. **mBIO**, v. 12, n. 1, 2021.

MIELKO, K. A.; JANBLONSKI, S. J.; MILCZEWSKA, J.; SANDS, D.; LUKASZEWICZ, M.; MLYNARZ, P. Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 11, 2019.

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, 2017.

MORITA, Y.; TOMIDA, J.; KAWAMURA, Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, 2014.

MURRAY, C. J. L. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v.399, n.10325, p.629-655, 2022.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 8 ed: Elsevier, 2017.

NAKASHIMA, R.; SAKURAI, K.; YAMASAKI, S.; HAYASHI, K.; NAGATA, C.; HOSHINO, K.; ONODERA, Y.; NISHINO, K.; YAMAGUCHI, A. Structural basis for the inhibition of bacterial multidrug exporters. **Nature**, v.500, 2013.

NEVES, P. R.; MAMIZUKA, E. M.; LEVY, C. E.; LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [S.L.], v. 47, n. 4, p. 409-420, ago. 2011.

NIKOO, H. R.; ARDEBILI, A.; MARDANEH, J. Systematic Review of Antimicrobial Resistance of Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates in Iran: an update. **Microbial Drug Resistance**, [S.L.], v. 23, n. 6, p. 744-756, set. 2017.

NZAKIZWANAYO, J.; SCAVONE, P.; JAMSHIDI, S.; HAWTHORNE, J. A.; PELLING, H.; DEDI, C.; SALVAGE, J. P.; HIND, C. K.; GUPPY, F. M.; BARNES, L. M.; PATEL, B. A.; RAHMAN, K. M.; SUTTON, M. J.; JONES, B. V. Fluoxetine and thioridazine inhibit efflux and attenuate crystalline biofilm formation by *Proteus mirabilis*. **Scientific reports**, v.7, 2017.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, 2003.

OLIVEIRA, A. S.; OLIVEIRA, J. M.; DONDEERS, G. G. G.; OLIVEIRA, R. P.; OLIVEIRA, A. P. Anti-*Candida* activity of antidepressants sertraline and fluoxetine: effect upon pre-formed biofilms. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 207, 2018.

ORLANDI, V. T.; BOLOGNESE, F.; CHIODAROLI, L.; TOLKER-NIELSEN, T.; BARBIERI, P. Pigments influence the tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to photodynamically induced oxidative stress. **Microbiology (Reading)**, v. 161, n. 12, 2015.

PALLERONI, N. J. *Pseudomonas*. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, 1–1, 2015.

PAN, Y.; XU, Y.; WANG, Z.; FANG, Y.; SHEN, J. Overexpression of MexAB-OprM efflux pump in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Archives of Microbiology**, v. 198, p. 565–571, 2016.

PANG, Z.; RAUDONIS, R.; GLICK, B. R.; LIN, T. J.; CHENG, Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnology advances**, v. 37, n. 1, 2019.

PATHANIA, R.; SHARMA, A.; GUPTA, V. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: from bench to bedside. **Indian Journal Of Medical Research**, v. 149, n. 2, 2019.

PEARSON, J. P.; DELDEN, C. V.; IGLEWSKI, B. H. Active Efflux and Diffusion Are Involved in Transport of *Pseudomonas aeruginosa* Cell-to-Cell Signals. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 4, 1999.

PEREZ-CABALLERO, L.; TORRES-SANCHEZ, S.; BRAVO, L.; MICO, J. A.; BERROCOSO, E. Fluoxetine: a case history of its discovery and preclinical development. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 9, n. 5, 2014.

POGUE, J. M.; KAYE, K. S.; VEVE, M. P.; PATEL, T. S.; GERLACH, A. T.; DAVIS, S. L.; PUZNIAK, L. A.; FILE, T. M.; OLSON, S.; DHAR, S.; BONOMO, R. A.; PEREZ, F. Ceftolozane/Tazobactam vs Polymyxin or Aminoglycoside-based Regimens for the Treatment of Drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 2, 2020.

POULIKAKOS, P.; FALAGAS, M. E. Aminoglycoside therapy in infectious diseases. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 14, n. 12, 2013.

POURNARAS, S.; MANIATI, M.; SPANAKIS, N.; IKONOMIDIS, A.; TASSIOS, P. T.; TSAKRIS, A.; LEGAKIS, N. J.; MANIATIS, A. N. Spread of efflux pump-overexpressing, non-metallo- $\beta$ -lactamase-producing, meropenem-resistant but ceftazidime-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* in a region with blaVIM endemicity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 4, 2005.

PUZARI, M.; CHETIA, P. RND efflux pump mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*: a major issue worldwide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 24, 2017.

RAMASWAMY, V. K.; CACCIOTTO, P.; MALLOCI, G.; VARGIU, A. V.; RUGGERONE, P. Computational modelling of efflux pumps and their inhibitors. **Essays in biochemistry**, v. 61, n. 1, 2017.

RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug Resistance Updates**, v. 13, n. 6, 2010.

RASHED, N. A.; JOJI, R. M.; SAEED, N. K.; BINDAYNA, K. M. Detection of Overexpression of Efflux Pump Expression in Fluoroquinolone-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. **International Journal of Applied and Basic Medical Research**, v. 10, n. 1, 2020.

REHMAN, A.; PATRICK, W. M.; LAMONT, I. L. Mechanisms of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: new approaches to an old problem. **Journal of Medical Microbiology**, v.68, n.1, p.1-10, 1 jan. 2018.

REYNOLDS, D.; KOLLEF, M. The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. **Drugs**, v. 81, n. 18, 2021.

RODRIGUES, L.; CRAVO, P.; VIVEIROS, M. Efflux pump inhibitors as a promising adjunct therapy against drug resistant tuberculosis: a new strategy to revisit mycobacterial targets and repurpose old drugs. **Expert Review Of Anti-Infective Therapy**, v. 18, n. 8, 2020.

SANCHEZ-CARBONEL, A.; MONDRAGÓN, B.; LÓPEZ-CHEGNE, N.; PENA-TUESTA, I.; HUAYAN-DÁVILA, G.; BLITCHTEIN, D.; CARRILLO-NG, H.; SILVA-CASO, W.; AGUILAR-LUIS, M. A.; VALLE-MENDOZA, J. D. The effect of the efflux pump inhibitor Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazone (CCCP) on the susceptibility to imipenem and cefepime in clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. **PLoS One**, v. 16, n. 12, 2021.

SANTOS, C. O.; ANDRADE, N. F. P.; CONCEIÇÃO NETO, O. C.; COSTA, B. S.; MARQUES, E. A.; SOUZA, C. M. R.; ASENSI, M. D.; CARVALHO-ASSEF, A. P. D. Epidemiology and antibiotic resistance trends in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Rio de Janeiro - Brazil: Importance of mutational mechanisms over the years (1995–2015). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 73, 2019.

SAVOIA, D. New perspectives in the management of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Future Microbiology**, v. 9, n. 7, 2014.

SEUKEP, A. J.; KUETE, V.; NAHAR, L.; SARKER, S. D.; GUO, M. Plant-derived secondary metabolites as the main source of efflux pump inhibitors and methods for identification. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 10, 2020.

SEUPT, A.; SCHNIEDERIAN, M.; TOMASCH, J.; HAUSSLER, S. Expression of the MexXY aminoglycoside Efflux Pump and presence of an Aminoglycoside-Modifying Enzyme in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates are highly correlated. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 65, n. 1, 2020.

SHARMA, A.; GUPTA, V. K.; PATHANIA, R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 149, n. 2, p. 129-145, 2019.

SHE, P.; LI, Z.; CHEN, L.; WU, Y. Efficacy of levofloxacin against biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with respiratory tract infections in vitro. **Microbiology open**, [S.L.], v. 8, n. 5, 5 set. 2018.

SIDRIM, J.J.C.; AMANDO, B.R.A.; GOMES, F.I.F.; AMARAL, M.S.M.G.; SOUSA, P.C.P.; OCADAQUE, C.J.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; ROCHA, M.F.G.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M. Chlorpromazine-impregnated catheters as a potential strategy to control biofilm-associated urinary tract infections. **Future microbiology**, v. 14, n.12, p. 1023–1034, 2019.

SIDRIM, J. J. C.; VASCONCELOS, D. C.; RIELLO, G. B.; GUEDES, G. M. M.; SERPA, R.; BANDEIRA, T. J. P. G.; MONTEIRO, A. J.; CORDEIRO, R. A.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; ROCHA, M. F. G.; BRILHANTE, R. S. N. Promethazine improves antibiotic efficacy and disrupts biofilms of *Burkholderia pseudomallei*. **Biofouling**, v. 33, p. 88-97, 2017.

SILVA JÚNIOR, V. V.; RAPOSO, B. L.; LOPES, A. C. S.; ARAÚJO, P. S. R.; FONTES, A.; CABRAL FILHO, P. E.; MACIEL, M. A. V. Activity of carbonyl cyanide-3-chlorophenylhydrazone on biofilm formation and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* using quantum dots-meropenem conjugates as nanotools. **Methods And Applications In Fluorescence**, v. 8, n. 4, 2020.

SILVA, R. A. C.; SILVA, C. R.; ANDRADE NETO, J. B.; SILVA, A. R.; CAMPOS, R. S.; SAMPAIO, L. S.; NASCIMENTO, F. B. S. A.; GASPAR, B. S.; FONSECA, S. G. C.; JOSINO, M. A. A.; GRANGEIRO, T. B.; GASPAR, D. M.; LUCENA, D. F.; MORAES, M. O.; CAVALCANTI, B. C.; JÚNIOR, H. V. N. In vitro anti-*Candida* activity of selective serotonin reuptake inhibitors against fluconazole-resistant strains and their activity against biofilm-forming isolates. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, 2017.

SOHEL, A. J.; SHUTTER, M. C.; MOLLA, M. Fluoxetine. **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**, p.1-9, 2022.

SOTO, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. **Virulence**, v. 4, n. 3, 2013.

SOUSA, A. K.; ROCHA, J. E.; SOUZA, T. G.; FREITAS, T. S.; RIBEIRO-FILHO, J.; COUTINHO, H. D. M. New roles of fluoxetine in pharmacology: Antibacterial effect and modulation of antibiotic activity. **Microbial Pathogenesis**, v. 123, 2018.

SOUTAR, M. P. M.; KEMPTHORNE, L.; ANNUARIO, E.; LUFT, C.; WRAY, S.; KETTELER, R.; LUDTMANN, M. H. R.; PLUN-FAVREAU, H. FBS/BSA media concentration determines CCCP's ability to depolarize mitochondria and activate PINK1-PRKN mitophagy. **Autophagy**, v. 15, n. 11, 2019.

SOUTHARD, B. T.; AL KHALILI, Y. Promethazine. **StatPearls**, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544361/>

SOUZA, G. H. A.; ROSSATO, L.; BRITO, G. T.; BET, G. M. S.; SIMIONATTO, S. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains: a worrying health problem in intensive care units. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 63, p. 63-71, 2021.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V.; DI BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S.; CIRKOVIC, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, n. 8, 2007.

SUN, J.; DENG, Z.; YAN, A. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 453, n. 2, 2014.

TAMMA, P. D.; SIMNER, P. J. Phenotypic detection of carbapenemase-producing organisms from clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 11, 2018.

TANG, Y.; LIU, D.; SUSSMAN, M.; POXTON, I.; SCHWARTZMAN, J. **Molecular Medical Microbiology**. 2nd ed: Academic Press, 2014.

TEIXEIRA, B.; RODULFO, H.; CARREÑO, N.; GUZMÁN, M.; SALAZAR, E.; DONATO, M. Aminoglycoside resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Cumana, Venezuela. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, n. 13, 2016.

TEKINTAS, Y.; TEMEL, A.; ATEŞ, A.; ERAC, B.; METİN, D. Y.; POLAT, S. H.; LIMONCU, M. H. Antifungal and Antibiofilm Activities of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors Alone and in Combination with Fluconazole. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 17, n. 6, 2020.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American journal of medicine**, v. 119, n. 6, p. S3-S10, 2006.

TERAHARA, F.; NISHIURA, H. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and carbapenem use in Japan: an ecological study. **Journal of International Medical Research**, v. 47, n. 10, p. 4711-4722, 2019.

THACHARODI, A.; LAMONT, I. L. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: the contribution of the MexXY-OprM efflux pump varies between isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 71, n. 6, 2022.

THACHARODI, A.; LAMONT, I. L. Aminoglycoside-Modifying Enzymes Are Sufficient to Make *Pseudomonas aeruginosa* Clinically Resistant to Key Antibiotics. **Antibiotics (basel)**, v. 11, n. 7, 2022.

THAKUR, V.; UNİYAL, A.; TIWARI, V. A comprehensive review on pharmacology of efflux pumps and their inhibitors in antibiotic resistance. **European Journal of Pharmacology**, v. 903, 2021.

TSUJI, B. T.; POGUE, J. M.; ZAVASCKI, A. P.; PAUL, M.; DAIKOS, G. L.; FORREST, A.; GIACOBBE, D. R.; VISCOLI, C.; GIAMARELLOU, H.; KARAIKOS, I.; KAYE, D.; MOUTON, J. W.; TAM, V. H.; THAMLIKITKUL, V.; WUNDERINK, R. G.; LI, K.; NATION, R. L.; SAYE, K. S. International Consensus Guidelines for the Optimal Use of the Polymyxins. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, [S.L.], v. 39, p. 10-39, jan. 2019.

VARGA, B.; CSONKA, A.; CSONKA, A.; MOLNAR, J.; AMARAL, L.; SPENGLER, G. Possible biological and clinical applications of phenothiazines. **Anticancer Research**, v. 37, n. 11, 5983–5993, 2017.

VARGIU, A. V.; PHAN, G.; VENTER, H.; BROUTIN, I. The structural and functional study of efflux pumps belonging to the RND transporters family from Gram negative bacteria. **Antibiotics (basel)**, v. 11, n. 4, 2022.

VENTER, H.; MOWLA, R.; OHENE-AGYEI, T.; MA, S. RND-type drug efflux pumps from Gram-negative bacteria: molecular mechanism and inhibition. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015.

WILSON, M G; PANDEY, S. *Pseudomonas aeruginosa*. **Statpearls Publishing**, Treasure Island, 28 ago. 2022.

ZAHEDI BIALVAEI, A.; RAHBAR, M.; HAMIDI-FARAHANI, R.; ASGARI, A.; ESMAILKHANI, A.; MARDANI DASHTI, Y.; SOLEIMAN-MEIGOONI, S. Expression of RND efflux pumps mediated antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 153, 2021.

ZGURSKAYA, H. I.; RYBENKOV, V. V. Permeability barriers of Gram-negative pathogens. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1459, n. 1, 2020.

ZHAO, L.; WANG, S.; LI, X.; HE, X.; JIAN, L. Development of in vitro resistance to fluoroquinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, 2020.