

ARTIGO DE REVISÃO

Resistência às Polimixinas: velhos antibióticos, últimas opções terapêuticas

Polymyxins resistance: old antimicrobials, last therapeutic options

Raquel Girardello¹, Ana Cristina Gales¹¹Laboratório Especial de Microbiologia Clínica - LEMC/Lab ALERTA, Universidade Federal de São Paulo.

Enviado em: 09/01/2012

Aceito em: 25/05/2012

raquelgirardello@gmail.com

DESCRITORES

*polimixinas
antimicrobianos
resistência*

KEYWORDS

*polimixins
antimicrobial
resistance*

RESUMO

Polimixinas são antimicrobianos polipeptídicos que agem nas membranas celulares promovendo a diminuição da integridade da parede celular e conseqüente morte celular bacteriana. Esses antimicrobianos são utilizados na prática clínica para o tratamento de infecções por bacilos Gram negativos multirresistentes, como última opção terapêutica. A resistência às polimixinas envolve modificações no lipopolissacarídeo da parede celular bacteriana, que diminuem a afinidade do antimicrobiano pela superfície celular. Essas modificações são reguladas por diferentes sistemas de dois componentes que são ativados por fatores ambientais como presença de cátions, pH ou presença do antimicrobiano. Esses fatores desencadeiam a ação uma cascata de genes que, por sua vez, desenvolvem o fenótipo de resistência às polimixinas. A manutenção da viabilidade das polimixinas é essencial para o tratamento de infecções por bactérias multirresistentes, enquanto novas opções terapêutica não estejam disponíveis.

ABSTRACT

Polymyxins are polypeptide antimicrobials that act in the cell membranes and promote decrease of the cell wall integrity. These antimicrobials are used in the clinical practice for treatment of the multi-drug resistant Gram negative bacilli infections as the last therapeutic option. The polymyxin resistance involves lipopolysaccharide modifications that decrease the affinity of the antimicrobial with the cell surface. These modifications are regulated by two component systems that are active by environmental influences as cation presence, pH or polymyxin exposure. The environmental influences initiate the action of the genes that develop the polymyxins resistant phenotype. The polymyxins viability maintenance is essential for the treatment for multi-drug resistant bacilli infections, while new therapeutic options are not available.

As polimixinas são antimicrobianos polipeptídicos descobertos em 1947 como produto do microrganismo de solo *Bacillus polymyxa*. Esses antimicrobianos são utilizados na prática clínica nas formas de polimixina B e E, essa última também chamada de colistina. Ambas polimixinas apresentam a mesma atividade *in vitro*, sendo a única diferença apresentada na sua estrutura química, a presença de um aminoácido D-Leucina na molécula de colistina na mesma posição onde existe um D-fenilalanina da molécula da polimixina B.^{1,2} A polimixina B é utilizada na forma de sulfato de polimixina B, enquanto a colistina é uma pró-droga, utilizada na forma de colistimetato de sódio que, após ser metabolizado é transformado em colistina base, que é o princípio ativo. Até a década de 1960 essas drogas eram as opções terapêuticas usadas para infecções graves por bactérias Gram-negativas, no entanto, elas apresentavam altas taxas de nefrotoxicidade e neurotoxicidade associada ao seu uso prolongado. Dessa forma, a partir da década de 1970, as polimixinas passaram, gradativamente, a ser substituídas por cefalosporinas de amplo espectro e aminoglicosídeos que apresentavam o mesmo espectro de atividade, mas com menor toxicidade dos que as mesmas. Até a década de 1990, as polimixinas eram utilizadas somente em formulações tópicas e no tratamento de infecções leves.

Atualmente, as taxas de infecções por bactérias Gram-negativas resistentes à maioria dos antimicrobianos utilizados comumente na prática clínica tem aumentado com grande rapidez, restringindo cada vez mais as opções terapêuticas. Associado a esse fato, a indústria farmacêutica não tem produzido novos antimicrobianos com mecanismos de ação diferentes, para os quais as bactérias ainda não tenham desenvolvido mecanismo de resistência. Dessa forma, as polimixinas foram novamente introduzidas na prática clínica, em alguns casos, como última opção terapêutica ainda disponível.

A molécula de polimixina consiste de uma cadeia lateral de ácidos graxos ligada a um anel peptídeo policatiônico composta de oito a dez aminoácidos³. Os antimicrobianos dessa classe agem nas membranas celulares bacteriana, removendo moléculas de cálcio e magnésio que estabilizam a parede celular, promovendo o aumento da permeabilidade das membranas e liberação dos componentes celulares, levando à morte celular bacteriana⁴.

Antimicrobianos dessa classe possuem um espectro de ação contra bactérias Gram-negativas, com algumas exceções como *Proteus* spp., *Burkholderia* spp., *Serratia* spp. e *Providencia* spp., que apresentam resistência intrínseca a esse agente antimicrobiano. A resistência às polimixinas ainda é rara entre microrganismos não fermentadores. Um estudo recente do Sentry Antimicrobial Surveillance Program apontou que Polimixina B ainda apresenta excelente atividade contra bactérias Gram-negativas, incluindo aquelas que apresentam resistência aos carbapenems. No entanto, esses autores observaram uma tendência a um aumento da resistência às polimixinas entre os isolados de *Klebsiella pneumoniae* de hospitais localizados na América Latina. Esses isolados apresentam Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) de polimixinas mais elevadas do que as observadas entre isolados não fermentadores que apresentaram esse fenótipo¹.

RESISTÊNCIA ÀS POLIMIXINAS

O mecanismo de resistência às polimixinas não está completamente elucidado até o momento. Em geral, são observados dois fenótipos de resistência às polimixinas. O primeiro, denominado resistência natural, provavelmente resultante de mutação no genoma bacteriano e que promove resistência com CIMs próximas aos pontos de corte da categoria de resistência⁵. O segundo fenótipo de resistência às polimixinas é denominado mecanismo adaptativo, no qual a bactéria, inicialmente sensível, se torna resistente após o uso da droga em concentrações subótimas. Esse último mecanismo pode levar a CIMs bem mais elevadas, acima de 128 µg/mL e é um fenótipo reversível na ausência da pressão seletiva estabelecida pela droga⁶.

Estudos em *Salmonella enterica* foram os primeiros a mostrar o envolvimento de alterações no lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano e diminuição da atividade das polimixinas. Essa alteração se dá por uma adição de 4-amino-arabinose na porção do lipídio A do LPS, um dos principais componentes da parede celular de bactérias Gram-negativas^{7,8}. Logo após os estudos com *S. enterica*, essas alterações de LPS também foram descritas em outras espécies, inclusive entre microrganismos não fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa*^{9,10,11}. Em *Acinetobacter baumannii* a adição de 4-amino-arabinose ainda não foi descrita. Nessa espécie, a modificação no LPS bacteriano é devido à adição de fosfoetanolamina ao lipídio A^{12, 13}. Entre isolados de *K. pneumoniae*, a resistência às polimixinas foi relacionada com o aumento da produção de cápsula polissacarídica, o que diminui a interação da droga com a superfície celular^{14,15,16}.

A regulação gênica do desenvolvimento de resistência às polimixinas, conhecida até o momento, envolve sistemas de dois componentes ("Two Component Systems"). Esses sistemas são influenciados por fatores ambientais como presença de ferro, concentrações elevadas de cálcio ou baixas de magnésio, ou ainda, alterações de pH no meio¹⁷. Os sistemas de dois componentes são sistemas globais de regulação gênica, utilizados por diversas espécies bacterianas para regulação da expressão de diferentes fatores de resistência e também de virulência. Eles são constituídos por uma proteína sensor de histidina quinase que percebe estímulos ambientais, sofrendo uma reação de autofosforilação, ativando uma segunda proteína citoplasmática, por uma reação de transfosforilação. A segunda proteína, então, promove a ativação ou repressão dos genes alvo, desencadeando a resistência às polimixinas¹⁸.

Estudos com isolados de *K. pneumoniae* mostraram a participação dos sistemas PhoPQ e PmrAB em diferentes condições ambientais para o desenvolvimento de resistência às polimixinas^{19,20}. Mitrophanov *et al*¹⁹ observaram que em baixas concentrações de magnésio, o sistema PhoPQ é ativado promovendo a expressão do gene *pmrD*. Tanto a expressão de *pmrD*, quando a presença de ferro que estimulam a ativação do sensor quinase *pmrB*, promovem a ativação de *pmrA*, que por sua vez, leva a modificações no LPS bacteriano em *K. pneumoniae* levando à resistência às polimixinas. O mesmo grupo de pesquisa, em estudos anteriores avaliando outras enterobactérias como *S. enterica*

e *E. coli*, mostraram a participação desses dois sistemas. No entanto, nessas duas espécies, tanto o sistema PhoPQ quanto o sistema PmrAB ativam diretamente o gene *pmrD*^{21,22}.

A resistência às polimixinas entre isolados de *P. aeruginosa* envolve uma complexa rede de sistemas de dois componentes. Nessa espécie já foram descritos três sistemas envolvidos com resistência às polimixinas, o sistema PmrAB, PhoPQ e, mais recentemente, o sistema ParRS^{13,23,25}. Alterações no sistema PmrAB, por meio de mutações no gene *pmrB*, o qual sua expressão é dependente de *pmrA*, representam importantes mecanismos de regulação de resistência às polimixinas^{23,25}. O sistema PhoPQ está envolvido na modificação do lipídio A do LPS de bactérias Gram-negativas, devido à mutações que levam a perda de função do gene *phoQ* e contribuem para o desenvolvimento de altos níveis de resistência às polimixinas^{13,23}. Ambos os sistemas, PmrAB e PhoPQ, promovem modificações na expressão do operon *arnBCADTEF* responsável pela adição de 4-amino-arabinose no lipídio A, que leva à alteração no fenótipo de resistência às polimixinas em *P. aeruginosa*. O sistema de dois componentes ParRS foi o último descrito até o momento em isolados de *P. aeruginosa* com resistência adaptativa às polimixinas. Esse sistema foi relacionado a mutações no operon *arnBCADTEF* na presença de concentrações subinibitórias de polimixina, que levam a modificações no LPS e consequente resistência à mesma²⁴.

Em *A. baumannii*, somente o operon *pmrCAB* foi descrito, até o momento, sendo relacionado com a resistência às essas drogas. Seus genes compõem um sistema de dois componentes, onde o *pmrB* é o sensor de histidina quinase e o *pmrA* é a proteína reguladora da resposta. Esse sistema controla a expressão do gene *pmrC* o qual é responsável pela adição de fosfoetanolamina ao lipídio A do LPS da parede celular bacteriana. Assim como em *P. aeruginosa*, mutações no gene *pmrB* promovem diminuição da sensibilidade às polimixinas^{12,26}.

Em 2010, Moffat *et al*²⁷ sugeriram a hipótese de perda total do LPS bacteriano em isolados de *A. baumannii* com resistência *in vitro* à colistina. Esses autores observaram mutação no gene que codifica o LPS, *lpxA*, que levou a perda total do LPS da parede celular bacteriana e foi responsável pelo fenótipo de resistência em isolados de *A. baumannii*. Esses autores afirmam que a perda do LPS promoveu a diminuição da integridade da parede celular bacteriana e, conseqüentemente levou a mudanças no perfil de sensibilidade dos isolados de *A. baumannii*. Alguns estudos descrevem a mudança do perfil de sensibilidade com reversão da resistência aos antimicrobianos, incluindo aqueles para os quais os isolados de *Acinetobacter* spp. são

intrinsecamente resistentes²⁸. Moffat *et al*²⁷ ainda sugerem que esses isolados de *A. baumannii* com resistência induzida às polimixinas, conseguem elaborar uma parede celular na ausência de LPS para sobreviver às pressões externas e internas sofridas pela célula bacteriana.

Em 2006, Li *et al*²⁹ descreveram o aparecimento de heterorresistência à colistina em isolados de *A. baumannii*. Heterorresistência é denominada quando é detectado o surgimento de uma subpopulação resistente em uma população de isolados sensíveis à colistina. Após esse estudo, outros relatos de heterorresistência à colistina começaram a ser publicados em todo o mundo^{30,31,32,33}. Entretanto, o conceito de heterorresistência ainda não é consenso entre pesquisadores. Ainda não se sabe se a base para essa resistência é a presença de uma população de indivíduos geneticamente distintos ou se a variação no sistema regulatório entre indivíduos idênticos pode ser suficiente para a expressão de resistência às polimixinas²⁶. Segundo Cai *et al*³⁴, a prévia exposição à colistina contribui para o desenvolvimento de heterorresistência, selecionando isolados com CIMs mais elevadas, o que pode levar a falha terapêutica. Lopez-Rojaz *et al*³⁵ sugerem que as taxas de resistência às polimixinas ainda são baixas devido à um custo energético sofrido pelo isolado bacteriano para o desenvolvimento do fenótipo de resistência, reduzindo seu fitness. Entretanto, Rolain *et al*³⁶ afirmam que essas taxas de resistência aumentarão assim que o uso da droga se tornar mais comum, levando ao desenvolvimento de resistência por adaptação à pressão seletiva exercida pela droga. Al-Sweih *et al*³⁷ prevê grandes problemas clínicos assim que a atividade das polimixinas for reduzida e não existirem outras opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de infecções por bacilos Gram-negativos multirresistentes.

A resistência aos diversos antimicrobianos apresentada por grande parte dos microrganismos causadores de infecções há algumas décadas vem aumentando as taxas de mortalidade por infecções que anteriormente eram facilmente tratadas com beta-lactâmicos, em hospitais brasileiros e em todo o mundo. Novos alvos terapêuticos precisam ser descobertos já que esses microrganismos possuem um arsenal pronto para defesa contra os antimicrobianos já existentes. Dessa forma, as polimixinas tornaram-se a última opção para tratamento de infecções por bacilos Gram-negativos multirresistentes. Devido ao longo tempo em que esse antimicrobiano ficou em desuso, as taxas de sensibilidade a eles ainda são elevadas. No entanto, atualmente o conhecimento dos mecanismos de resistência às polimixinas tornou-se essencial para manter a viabilidade dessa droga até que novas opções terapêuticas estejam prontas para serem utilizadas.

REFERÊNCIAS

1. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006–09). *J. Antimicrob. Chemother.* 2011; 66:2070–2074.
2. Sader HS, Farrell DJ, Jones RN. Susceptibility of *Klebsiella* spp. to colistin and polymyxin B: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006–2009). *International J. Antimicrob. Agents.* 2011; 37:174–185.
3. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-

- negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). *Clin. Microbiol. Infect.* 2006; 12(4):315-321.
4. Gales AC, Reis AO, Jones RN. Contemporary Assessment of Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for Polymyxin B and Colistin: Review of Available Interpretative Criteria and Quality Control Guidelines. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(1):183-190.
 5. CLSI. Clinical Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-First Informational Supplement. Document M100-S22, Wayne, Pa. 2012.
 6. Skiada A, Markogiannakis A, Plachouras D et al. Adaptive resistance to cationic compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2011; 37:187-193.
 7. Castelli MA, Vécovi EG, Soncini FC. The Phosphatase Activity Is the Target for Mg²⁺ Regulation of the Sensor Protein PhoQ in *Salmonella*. *J. Biol. Chem.* 2000; 275(30):22948-22954.
 8. Navarre WW, Halsey TA, Walthers D et al. Co-regulation of *Salmonella enterica* genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ. *Mol. Microbiol.* 2005; 56(2):492-508.
 9. Gunn JS, Lim KB, Kruger J et al. PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol. Microbiol.* 1998;27(6):1171-1182.
 10. Moskowitz SM, Ernst RK, Miller SI. PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *J. Bacteriol.* 2004; 186(2):575-579.
 11. Winfield MD, Latifi T, Groisman EA. Transcriptional regulation of the 4-amino-4-deoxy-L-arabinose biosynthetic genes in *Yersinia pestis*. *J. Biol. Chem.* 2005; 280(15):14765-14772.
 12. Arroyo LA, Herrera CM, Fernandez L et al. The pmrCAB Operon Mediates Polymyxin Resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and Clinical Isolates through Phosphoethanolamine Modification of Lipid A. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55(8):3743-3751.
 13. Miller AK, Brannon MK, Stevens L et al. PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55(12):5761-5769.
 14. Campos MA, Vargas MA, Rigueiro V et al. Capsule Polysaccharide Mediates Bacterial Resistance to Antimicrobial Peptides. *Infect. Immun.* 2004; 72(12):7107-7114.
 15. Llobet E, Toma's JM, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiol.* 2008; 154:3877-3886.
 16. Cheng HY, Chen YF, Peng HL. Molecular characterization of the PhoPQ-PmrDPmrAB mediated pathway regulating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *J. Biomed. Sci.* 2010; 17:60.
 17. Groisman EA, Kayser J, Soncini FC. Regulation of Polymyxin Resistance and Adaptation to Low-Mg²⁺ Environments. *J. Bacteriol.* 1997; 179(22):7040-7045.
 18. Gooderham WJ; Hancock REW. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev.* 2009; 33:279-294.
 19. Mitrophanov AY, Jewett MW, Hadley TJ, Groisman EA. Evolution and dynamics of regulatory architectures controlling polymyxin B resistance in enteric bacteria. *PLoS Genet.* 2008; 4(10):e1000233.
 20. Mitrophanov AY, Groisman EA. Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes Dev.* 2008; 22(19):2601-2611. Review.
 21. Kato A, Latifi T, Groisman EA. Closing the loop: the PmrA/PmrB two-component system negatively controls expression of its posttranscriptional activator PmrD. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(8):4706-4711.
 22. Kato A, Mitrophanov AY, Groisman EA. A connector of two-component regulatory systems promotes signal amplification and persistence of expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(29):12063-12068.
 23. Barrow K, Kwon DH. Alterations in two-component regulatory systems of phoPQ and pmrAB are associated with polymyxin B resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53(12):5150-5154.
 24. Fernández L, Gooderham WJ, Bains M et al. Adaptive resistance to the "last hope" antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54(8):3372-3382.
 25. Moskowitz SM, Brannon MK, Dasgupta N et al. PmrB mutations promote polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56(2):1019-1030.
 26. Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S et al. Resistance to Colistin in *Acinetobacter baumannii* Associated with Mutations in the PmrAB Two-Component System. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009;53(9):3628-3634.
 27. Moffatt JH, Harper M, Harrison P et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(12):4971-4977.
 28. Gordon NC, Png K, Wareham DW. Potent synergy and sustained bactericidal activity of a vancomycin-colistin combination versus multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(12):5316-5322.
 29. Li J, Rayner CR, Nation RL et al. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50:2946-2950.
 30. Ko KS, Suh JY, Kwon KT et al. High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 60(5):1163-1167.
 31. Yau W, Owen RJ, Poudyal A et al. Colistin hetero-resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from the Western Pacific region in the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Infect.* 2009; 58(2):138-144.
 32. Rodríguez CH, Bombicino K, Granados G et al. Selection of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in postneurosurgical meningitis in an intensive care unit with high presence of heteroresistance to colistin. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009; 65(2):188-191.
 33. Chang KC, Lin MF, Lin NT et al. Clonal spread of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in eastern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 2012; 45(1):37-42.
 34. Cai Y, Chai D, Wang R et al. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012. [Epub ahead of print].
 35. López-Rojas R, Domínguez-Herrera J, McConnell MJ et al. Impaired virulence and in vivo fitness of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Infect Dis.* 2011; 203(4):545-548.
 36. Rolain JM, Roch A, Castanier M et al. *Acinetobacter baumannii* resistant to colistin with impaired virulence: a case report from France. *J Infect Dis.* 2011; 204(7):1146-1167.
 37. Al-Sweih NA, Al-Hubail MA, Rotimi VO. Emergence of tigecycline and colistin resistance in *Acinetobacter* species isolated from patients in Kuwait hospitals. *J Chemother.* 2011; 23(1):13-16.