

# Mecanismos de resistência antimicrobiana em *Pseudomonas aeruginosa*

## *Mechanisms responsible for antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa*

Ingrid de Arruda Lucena dos Santos<sup>1</sup>

Joseli Maria da Rocha Nogueira<sup>2</sup>

Flávia Coelho Ribeiro Mendonça<sup>3</sup>

### Resumo

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria de grande importância para indivíduos imunocomprometidos. No Brasil, ela é um dos principais agentes em infecções hospitalares e pode provocar diversos tipos de processos clínicos. Atualmente, um dos maiores desafios em infecções provocadas por *P. aeruginosa* é a resistência apresentada diante de inúmeros antimicrobianos. Além da resistência intrínseca de *P. aeruginosa*, essa bactéria facilmente desenvolve mecanismos de resistência adicionais, através de mutações e da aquisição de elementos genéticos móveis, por exemplo. Dessa forma, *P. aeruginosa* é considerada um patógeno multirresistente, o que limita as alternativas terapêuticas capazes de combatê-lo. Portanto, compreender os mecanismos que levam a essa resistência é de extrema importância para enfrentar as infecções por *P. aeruginosa*.

### Palavras-chave

*Pseudomonas aeruginosa*; Farmacorresistência bacteriana múltipla; Infecção hospitalar

## INTRODUÇÃO

*Pseudomonas aeruginosa* é uma das bactérias de maior relevância clínica e epidemiológica.<sup>(1)</sup> Ela é a principal causa de infecções hospitalares dentre os bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose<sup>(2)</sup> e a maior causa de infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos.<sup>(3)</sup> *P. aeruginosa* é um dos principais agentes etiológicos de infecções nosocomiais no Brasil,<sup>(4)</sup> podendo causar desde infecções localizadas, em sítios de processos cirúrgicos ou queimaduras, até septicemias graves.<sup>(5)</sup>

*P. aeruginosa* está sob contínua pressão seletiva em ambientes hospitalares<sup>(6)</sup> e é considerada pela comunidade científica internacional um patógeno multirresistente.<sup>(7,8)</sup>

O desenvolvimento de diferentes mecanismos de resistência tem um impacto clínico considerável<sup>(9)</sup> já que compromete a eficácia de quase todas (ou mesmo todas) as drogas utilizadas como tratamento contra *P. aeruginosa*,<sup>(10)</sup> acarretando um alto custo da terapêutica dos pacientes infectados,<sup>(11)</sup> além do aumento da duração da hospitalização e da mortalidade.<sup>(12)</sup>

## ENZIMAS B-LACTAMASES

Dentre os mecanismos de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, o mais importante é a produção de enzimas  $\beta$ -lactamases, no entanto, a resistência também pode ser ocasionada pela hiperexpressão de sistemas de efluxo, pela alteração da permeabilidade da membrana<sup>(10)</sup> e pela síntese de proteínas de ligação à penicilina (PBPs) com baixa afinidade por  $\beta$ -lactâmicos. Em *P. aeruginosa*, todos esses mecanismos podem existir simultaneamente.<sup>(13)</sup>

Atualmente, vários grupos e classes de  $\beta$ -lactamases vêm sendo descritos<sup>(14)</sup> e um número significativo das diversas classes é encontrado em *P. aeruginosa*.<sup>(13)</sup> As  $\beta$ -lactamases são capazes de inativar os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos pela quebra do anel  $\beta$ -lactâmico,<sup>(12)</sup> rompendo sua ligação amida, de forma que os produtos obtidos deixam de possuir atividade antibacteriana.<sup>(13)</sup> A hidrólise dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos ocorre pela formação de uma ligação éster entre o sítio ativo de serina (ou com íons de zinco, no caso das metalo- $\beta$ -lactamases) da enzima  $\beta$ -lactamase e o anel  $\beta$ -lactâmico do antimicrobiano. Em bactérias Gram-negativas, como *P. aeruginosa*, essas enzimas se localizam no espaço periplasmático e inativam os  $\beta$ -lactâmicos logo que eles

<sup>1</sup>Técnica em Análises clínicas/ Bolsa de Iniciação Científica Júnior – PIBIC-EM – Fiocruz – Rio de Janeiro, RJ.

<sup>2</sup>Doutor em Ciências/ENSP/Fiocruz (Chefe do laboratório de Microbiologia do DCB - ENSP/Fiocruz) – Rio de Janeiro, RJ.

<sup>3</sup>Doutor em Ciências/IPEC/Fiocruz (Professora Pesquisadora da EPSJV/Fiocruz) – Rio de Janeiro, RJ.

Artigo recebido em 25/04/2014

Aprovado em 13/01/2015

Conflito de interesse: Não há conflito de interesse

atravessam a membrana externa, antes que atinjam as PBPs.<sup>(15)</sup>

A maioria dos genes que codificam as enzimas  $\beta$ -lactamases está localizada em regiões móveis do DNA bacteriano, como plasmídios e integrons de classe 1 (apesar de alguns serem encontrados em integrons das classes 2 e 3),<sup>(12)</sup> o que contribui para a disseminação da resistência entre bactérias da mesma espécie e de espécies diferentes.<sup>(15)</sup> Ademais, múltiplos fatores de resistência podem ser disseminados através do mesmo plasmídio.<sup>(12)</sup>

### $\beta$ -lactamases da classe A de Ambler

As  $\beta$ -lactamases mais frequentemente adquiridas são as enzimas específicas de *Pseudomonas* (PSEs) PSE-1 e PSE-4.<sup>(16)</sup> Na classe A de Ambler, dentro do grupo funcional 2c de Bush, quatro  $\beta$ -lactamases do tipo PSE que hidrolisam carbenicilina foram encontradas em *P. aeruginosa*: PSE-1 (CARB-2), PSE-4 (CARB-1), CARB-3 e CARB-4 (cujo gene acredita-se ter sido adquirido de outra espécie bacteriana).<sup>(13)</sup> Seu perfil de substrato inclui carboxipenicilinas, ureidopenicilinas e cefsulodina. A presença de PSEs pode ser contornada, já que cepas produtoras de carbenicilinas apresentam suscetibilidade variável à cefepima, cefpiroma e aztreonam e suscetibilidade total para ceftazidima e carbapenêmicos.<sup>(13)</sup> Genes que codificam enzimas similares a PSE-4 fazem parte de transposons contendo diversos genes de resistência.<sup>(17)</sup>

Ao contrário das PSEs, as  $\beta$ -lactamases de amplo espectro (ESBLs) da classe molecular A e do grupo funcional 2b' conduzem ao desenvolvimento da resistência não somente às carboxipenicilinas e ureidopenicilinas, mas também às cefalosporinas de amplo espectro.<sup>(13)</sup> Essas enzimas podem ter uma atividade hidrolítica mais ampla, inclusive sobre carbapenêmicos, embora quase todas sejam inibidas por ácido clavulânico. A frequência das enzimas ESBLs, amplamente reportadas em enterobactérias, tem aumentado em isolados de *P. aeruginosa*.<sup>(12)</sup>

As ESBLs do grupo 2b' de Bush são dos tipos TEM (*Temoniera*) e SHV (*Sulphydryl Variable*), bem conhecidos na família Enterobacteriaceae, do tipo PER (*Pseudomonas Extended Resistance*), majoritariamente originado de isolados da Turquia, do tipo VEB (*Vietnamese Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase*), do Sudeste da Ásia, França e Bulgária, dos tipos GES (*Guiana Extended Spectrum*) e IBC (*Integron-Borne  $\beta$ -lactamase*), reportados na França, Grécia e África do Sul e do tipo BEL (*Belgium Extended  $\beta$ -lactamase*). Esses seis tipos de enzimas são, do ponto de vista genético, remotamente relacionados, embora compartilhem perfis hidrolíticos semelhantes.<sup>(13)</sup>

Os genes  $bla_{TEM}$ ,  $bla_{SHV}$  e  $bla^{PER-1}$  são parte de estruturas transposonais, ao passo que os genes  $bla_{VEB}$  e  $bla_{GES}$  estão na forma de cassetes em integrons da classe 1.<sup>(18)</sup> Os integrons que contêm genes para enzimas dos tipos VEB e

GES podem conter também outros genes de  $\beta$ -lactamases dos tipos OXA (oxacilinas).<sup>(19)</sup>

As  $\beta$ -lactamases do tipo CTX-M (cefotaximases), também incluídas na classe A de Ambler, têm sido relatadas como uma família que apresenta alto nível de atividade hidrolítica, especialmente contra cefotaxima e ceftriaxona,<sup>(20)</sup> tendo sido a primeira enzima capaz de hidrolisar cefalosporinas de espectro ampliado a um nível clinicamente significativo. Seus genes e variantes subsequentes são uma ameaça mundial.<sup>(14)</sup>

A  $\beta$ -lactamase PER-1 foi a primeira ESBL identificada e totalmente caracterizada em *P. aeruginosa*. Ela foi encontrada em um paciente turco hospitalizado na região de Paris, França, em 1991, e sua codificação era cromossômica. Posteriormente, enzimas PER-1 codificadas por plasmídios foram reportadas.<sup>(13)</sup> Ainda assim, em *P. aeruginosa*, os genes blaPER são majoritariamente codificados por cromossomos.<sup>(19)</sup> Cepas de *P. aeruginosa* produtoras de PER-1 também foram isoladas na Itália, Bélgica e Polônia,<sup>(13)</sup> e o gene  $bla_{PER-1}$  vem sendo muito difundido na Turquia.<sup>(19)</sup> PER-1 apresenta o perfil de substrato típico das ESBLs clássicas e é moderadamente inibida por inibidores de  $\beta$ -lactamase e imipenem.<sup>(13)</sup> Dessa forma, apesar de conferir resistência de alto nível à ceftazidima, a suscetibilidade pode ser restaurada pela adição de clavulanato.<sup>(16)</sup>

Com relação às enzimas dos tipos TEM e SHV, o primeiro caso associado a *P. aeruginosa* ocorreu em 1996 e, atualmente, ambos os tipos são descritos com maior frequência na Europa.<sup>(12)</sup> A enzima SHV-2 hidrolisa fortemente cefalosporinas de quarta geração, ao passo que SHV-5 determina alto nível de resistência a ceftazidima e monobactâmicos. O espectro hidrolítico do tipo TEM inclui penicilinas de espectro restrito, cefalosporinas de amplo espectro e aztreonam.<sup>(13)</sup> Apesar dessas enzimas terem sido relacionadas a plasmídios,<sup>(12)</sup> o gene  $bla_{TEM-21}$  já foi identificado como parte de um transposon localizado em cromossomo.<sup>(19)</sup>

O primeiro isolamento da  $\beta$ -lactamase VEB-1 ocorreu em 1998, na França. Em 2002, foi encontrada uma alta prevalência de genes do tipo  $bla_{VEB}$  em isolados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes à ceftazidima em um hospital tailandês. O mesmo estudo identificou um novo gene,  $bla_{VEB-2}$ .<sup>(13)</sup> As enzimas VEB conferem resistência à maioria das cefalosporinas de terceira e quarta geração, incluindo a cefepima, cefotaxima, cefpiroma, cefpodoxima, ceftazidima, ceftriaxona e cefuroxima. Notável é sua grande capacidade de hidrolizar a ceftazidima e o aztreonam, o que pode dificultar a antibioticoterapia contra *P. aeruginosa*.<sup>(12)</sup> A enzima VEB-2 difere da VEB-1 somente por uma mudança de aminoácido, localizado fora do sítio ativo da enzima. O perfil de substrato das enzimas VEB é idêntico ao da PER-1, isto é, alta afinidade para penicilinas de espectro limitado e cefalosporinas de espectros limitado e estendido. Essas ESBLs têm baixos níveis de afinidade pelos carbapenêmicos e são moderadamente inibidas por ácido clavulânico e imipenem. Além disso, VEB-1, assim como PER-1, é bem inibida por cefoxitina.

Os genes do tipo  $bla_{VEB}$  são, principalmente, codificados por cromossomos em *P. aeruginosa*.<sup>(19)</sup>

Ao final do século 20, foi descrita uma nova família de ESBLs, referida como GES, devido ao país de origem do primeiro isolado, a Guiana Francesa. GES-1, peculiar em seu baixo nível de atividade catalítica, baixa afinidade pela maioria dos substratos e um perfil de inibição que inclui ácido clavulânico e imipenem, foi encontrada na França e no Brasil. Ao contrário da maioria das ESBLs da classe A, tem uma forte afinidade pela ceftoxitina.<sup>(13)</sup> A enzima GES é capaz de hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro, suas variantes GES-2, GES-4, GES-5 e GES-6 possuem também a capacidade de hidrolisar os carbapenêmicos.<sup>(12)</sup> A GES-2, por exemplo, hidrolisa também o imipenem. Essa enzima foi identificada em uma cepa de *P. aeruginosa* de um paciente hospitalizado no hospital universitário de Pretória, África do Sul.<sup>(19)</sup> Isolados de *P. aeruginosa* produtores de GES de diferentes variantes já foram descritos em vários locais da Europa, China e África do Sul.<sup>(12)</sup> Tais informações sugerem que esses genes codificadores de  $\beta$ -lactamases podem ter maior distribuição aleatória do que os das enzimas VEB e PER.<sup>(19)</sup>

O gene estruturalmente relacionado ao  $bla_{GES-1}$ , o  $bla_{IBC-2}$ , foi relatado em *P. aeruginosa* a partir de um isolado grego em Tessalônica.<sup>(12)</sup> A IBC-2 difere por um único resíduo de aminoácido da GES-1 e confere resistência a ceftazidima e outras oximino-cefalosporinas, sendo inibida por imipenem, tazobactam e ácido clavulânico. A enzima IBC-2 difere da IBC-1 por uma mudança de aminoácido, sendo ambas as enzimas relacionadas à linhagem de GES-1 e GES-2. Tanto os genes  $bla_{GES}$  quanto os  $bla_{IBC}$  foram encontrados como sendo codificados, em *P. aeruginosa*, por plasmídios ou no cromossomo.<sup>(19)</sup>

Também foi relatada uma  $\beta$ -lactamase designada BEL-1, que é remotamente relacionada a outras  $\beta$ -lactamases da classe A, apesar das propriedades bioquímicas serem semelhantes. Essa enzima foi identificada a partir de uma cepa clínica de *P. aeruginosa* isolada em um hospital de Flandres, na Bélgica. Os parâmetros cinéticos de BEL-1 mostraram sua atividade de amplo espectro contra a maioria dos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo cefalosporinas de espectro estendido e aztreonam, além de baixa suscetibilidade a sulbactam e tazobactam. Conforme observado com muitas ESBLs, BEL-1 possui baixa afinidade por ceftazidima. Sua atividade é muito bem inibida por ácido clavulânico e em menor escala por moxalactam, sendo também inibida por imipenem (como observado para VEB-1 e GES-1) e por ceftoxitina (conforme observado para VEB-1). O gene  $bla_{BEL-1}$  está na forma de um cassete gênico que faz parte de um integron de classe 1, localizado em um transposon cromossômico.<sup>(18)</sup>

### Cefalosporinases (enzimas AmpC)

Parte da resistência intrínseca aos  $\beta$ -lactâmicos é ocasionada pela produção de uma enzima codificada

cromossomicamente, a AmpC, da classe C de Ambler.<sup>(21)</sup> A hiperprodução dessa enzima, chamada desrepressão estável, é o mecanismo mais frequentemente responsável pela resistência a cefalosporinas de terceira geração. Sendo ceftoxitina utilizada como marcador das cepas produtoras de AmpC.<sup>(13)</sup> O gene que codifica a AmpC (geralmente reprimido) pode ser induzido pela exposição bacteriana a baixas concentrações de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, particularmente, o imipenem,<sup>(21)</sup> e por inibidores de  $\beta$ -lactamases, como o ácido clavulânico.<sup>(22)</sup> Desse modo, ocorre a produção reversível da enzima.<sup>(21)</sup> Disso decorre que um isolado inicialmente sensível a cefalosporinas de amplo espectro pode desenvolver resistência a partir do início da terapia, por meio da indução dessa enzima.<sup>(12)</sup> Também pode ocorrer uma produção constante de AmpC, desencadeada por mutações.<sup>(21)</sup>

Embora o nível da resistência dependa do grau da desrepressão,<sup>(16)</sup> em *P. aeruginosa*, esse mecanismo costuma ser responsável pela resistência aos  $\beta$ -lactâmicos (incluindo cefalosporinas de amplo espectro), com exceção dos carbapenêmicos.<sup>(21)</sup> Geralmente, a enzima é produzida em baixas quantidades e determina resistência a aminopenicilinas e à maioria das primeiras cefalosporinas. A atividade da AmpC não é inibida por inibidores de  $\beta$ -lactamases usados na prática clínica, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam.<sup>(13)</sup>

A existência de plasmídios transferíveis que podem adquirir genes para enzimas do tipo AmpC torna possível o advento dessa resistência em bactérias que não a possuem ou em bactérias que expressem fracamente o gene cromossômico  $bla_{AmpC}$ ,<sup>(12)</sup> embora cefalosporinases mediadas por plasmídios ainda não tenham sido encontradas em *P. aeruginosa*.<sup>(13)</sup>

### $\beta$ -lactamases da classe D de Ambler

A classe D de  $\beta$ -lactamases abrange ESBLs do tipo OXA-18, OXA-2, OXA-10 (PSE-2), OXA-21, ARI-1 (*Acinetobacter Resistant to Imipenem*). Essas enzimas possuem características variadas,<sup>(21)</sup> mas são estruturalmente relacionadas e exibem uma ótima atividade hidrolítica contra oxacilina e compostos similares.<sup>(12)</sup>

As clássicas enzimas OXA (OXA-1, OXA-2, OXA-10) determinam resistência a carboxipenicilinas e ureidopenicilinas, mas não à ceftazidima. Por isso, oxacilinas que hidrolisam ceftazidima têm a maior importância clínica. Seu espectro hidrolítico também inclui cefotaxima, cefepima, ceftiproma, aztreonam e moxalactam. Com exceção de OXA-18, que é totalmente inibida por ácido clavulânico e cujas propriedades hidrolíticas se assemelham às das ESBLs da classe A, a atividade dessas enzimas não é suprimida por inibidores de  $\beta$ -lactamases.<sup>(13)</sup>

A maioria das oxacilinas de espectro estendido é codificada por genes localizados em plasmídios ou integrons, o que contribui para sua disseminação e para sua prevalência

umentada em isolados de *P. aeruginosa*.<sup>(13)</sup> Assim, a despeito do espectro estreito (aminopenicilinas, carboxipe-nicilinas e cefalosporinas de primeira e segunda gerações) apresentado pela maioria das variantes OXA, a crescente importância clínica dessa classe se deve a sua atividade em potencial contra carbapenêmicos e cefalosporinas de amplo espectro.<sup>(12)</sup> De fato, várias oxacilinas (OXA-2, OXA-10 e OXA-18) que possuem perfis de substrato ampliados, incluindo cefalosporinas de espectro estendido, têm sido reportadas em *P. aeruginosa*.<sup>(19)</sup> Essas enzimas têm sido reportadas na Turquia e na França, especificamente em *P. aeruginosa*.<sup>(22)</sup>

### Metallo- $\beta$ -lactamases

Enquanto as  $\beta$ -lactamases das famílias A, C e D de Ambler usam um resíduo de serina como nucleófilo para a catálise, as metallo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ LS), inseridas na classe B de Ambler e na classe 3 de Bush-Jacoby-Medeiros, utilizam cátions divalentes, geralmente, Zn<sup>+2</sup>, como cofator para sua atividade catalítica. Outra característica que diferencia as M $\beta$ LS das serina- $\beta$ -lactamases é a baixa suscetibilidade aos inibidores de  $\beta$ -lactamases (tazobactam, sulbactam e ácido clavulânico). Além disso, as M $\beta$ LS possuem atividade contra os carbapenêmicos, não hidrolisam os monobactâmicos, como o aztreonam, e são inibidas por agentes quelantes.<sup>(21)</sup> Geralmente, as linhagens produtoras de M $\beta$ LS demonstram resistência a múltiplos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo cefalosporinas, penicilinas e carbapenêmicos (imipenem e meropenem).<sup>(10)</sup> A produção de metalcarbapenemases é um dos mecanismos de resistência aos carbapenêmicos mais emergentes em *P. aeruginosa*.<sup>(22)</sup> Ademais, a maioria dos cassetes gênicos que carregam uma M $\beta$ LS também contém um gene *aacA4* que confere resistência a amicacina, neomicina e estreptomina, da classe dos aminoglicosídeos.<sup>(10)</sup>

A partir do início da década de 1990, uma grande diversidade de novos genes que codificam M $\beta$ LS tem sido descrita em patógenos clinicamente importantes, como *P. aeruginosa*.<sup>(12)</sup> Em *P. aeruginosa*, os genes de M $\beta$ LS se localizam em estruturas móveis.<sup>(21)</sup> Até o momento, são conhecidas seis subclasses de M $\beta$ LS adquiridas: IMP (*Imipenemase*), VIM (*Verona Imipenemase*), SPM (*São Paulo Metallo- $\beta$ -lactamase*), GIM (*German Imipenemase*), SIM (*Seoul Imipenemase*) e, mais recentemente, AIM (*Australian Imipenemase*).<sup>(10)</sup> Em *P. aeruginosa*, já foram identificados os tipos IMP, VIM, SPM e GIM.<sup>(13)</sup>

A diversidade de M $\beta$ LS tem aumentado nos últimos anos. No Brasil, há descrição de ocorrência de isolados de *P. aeruginosa* carregando genes *bla*<sub>IMP-1</sub>, *bla*<sup>IMP-16</sup>, *bla*<sub>SPM-1</sub> e *bla*<sub>VIM-2</sub>.<sup>(12)</sup> A disseminação de *P. aeruginosa* produtora dessas enzimas parece estar mais relacionada a clones específicos do que à transferência horizontal de genes, apesar de serem mediados por plasmídios transferíveis.<sup>(22)</sup> É importante notar que esses isolados foram encontrados quase unicamente

no ambiente hospitalar, e as linhagens produtoras de M $\beta$ LS têm sido identificadas entre os principais patógenos nosocomiais.<sup>(10)</sup>

A primeira carbapenemase comprovada em *P. aeruginosa* foi a IMP-1, encontrada no Japão durante um estudo entre 1992 e 1994. Em 2002, a IMP-16 foi encontrada em uma cepa de *P. aeruginosa* no Brasil.<sup>(13)</sup> Os genes para as enzimas IMP costumam ser encontrados em cassetes gênicos em integrons das classes 1 e 3, no cromossomo ou em plasmídios.<sup>(12)</sup>

Em 1999, em Verona, Itália, foi identificada a VIM-1, a partir de uma amostra de *P. aeruginosa*.<sup>(21)</sup> As enzimas VIM assemelham-se às IMPs, considerando suas propriedades hidrolíticas. Ambas hidrolisam rapidamente penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos.<sup>(16)</sup> O gene para VIM-1 é parte de um cassete gênico inserido em um integron de classe 1 que carrega, ainda, um gene de resistência a aminoglicosídeos, *aacA4*. VIM-2, intimamente relacionada à VIM-1, foi originalmente identificada em um isolado de *P. aeruginosa* da corrente sanguínea de um paciente neutropênico, em Marselha, sul da França, e seu gene foi localizado em um plasmídio.<sup>(13)</sup>

Também, foi detectada, em 1999, pela primeira vez, a enzima SPM-1,<sup>(12)</sup> a partir de uma amostra clínica de *P. aeruginosa* recuperada do trato urinário de um paciente hospitalizado no complexo Hospital São Paulo, da Universidade Federal de São Paulo.<sup>(10)</sup> Sua sequência de aminoácidos difere consideravelmente das encontradas nos tipos IMP e VIM. Essa diferença confere maior força de ligação e hidrólise dos  $\beta$ -lactâmicos à SPM-1,<sup>(12)</sup> que se liga a cefalosporinas mais fortemente do que a penicilinas.<sup>(13)</sup> O gene *bla*<sub>SPM-1</sub> faz parte de uma ilha de patogenicidade genômica móvel localizada em um plasmídio. Visto que, até o momento, a enzima SPM-1 não foi identificada em nenhum outro microrganismo, acredita-se que o gene que a codifica esteja especificamente relacionado à *P. aeruginosa*.<sup>(12)</sup> Os isolados produtores de enzimas SPM-1 parecem ser endêmicos e provocar altos índices de mortalidade.<sup>(4)</sup> Além de São Paulo, sua ocorrência já foi relatada em outros estados do Brasil.<sup>(21)</sup> Mais recentemente, a enzima SPM foi relatada na Suíça.<sup>(22)</sup>

Em 2002, a quarta subclasse de M $\beta$ LS adquirida, GIM-1, foi reportada em uma amostra clínica de *P. aeruginosa* proveniente da Alemanha. Sua sequência de aminoácidos possui baixa identidade com outros genes de M $\beta$ LS de importância clínica. Apesar de apresentar um perfil hidrolítico similar ao de IMP-1, GIM-1 é uma enzima consideravelmente mais fraca. O *bla*<sub>GIM-1</sub> está situado em um cassete gênico em integrons de classe 1, contido em um plasmídio, como observado na maior parte dos genes para M $\beta$ LS.<sup>(12)</sup>

Recentemente, em Florença, Itália, foi encontrada uma nova M $\beta$ LS, denominada FIM-1 (*Florence Imipenemase*), a partir de um isolado clínico de *P. aeruginosa* multirresistente, que apresentava o gene para a enzima inserido no cromossomo. Seus substratos preferenciais são penicilinas e carbapenêmicos.<sup>(23)</sup>

## BOMBAS DE EFLUXO

A habilidade de bombear antibióticos para fora das células é a forma mais comum de resistência à maioria das classes de antibióticos.<sup>(14)</sup> Em *P. aeruginosa*, o efluxo ativo é um importante mecanismo não enzimático de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos.<sup>(13)</sup> Além de antibióticos, biocidas e detergentes, essas bombas exportam diversas outras moléculas.<sup>(24)</sup> A expressão de bombas de efluxo é um dos mecanismos responsáveis pela resistência antimicrobiana em biofilmes.<sup>(25)</sup>

Os genes que codificam bombas de efluxo localizados no cromossomo estão frequentemente relacionados à resistência intrínseca. A resistência adquirida pode ocorrer devido a mutação e amplificação dos genes que codificam transportadores multidrogas, alterando seu nível de expressão ou atividade, a mutações em genes específicos ou genes regulatórios globais, resultando em uma maior expressão desses transportadores, e transferência de genes entre bactérias, através de plasmídios ou transposons.<sup>(26)</sup>

Uma bomba de efluxo pode apresentar especificidade por um determinado substrato<sup>(12)</sup> ou pode agir sobre uma ampla variedade de drogas (bombas de efluxo multidrogas), de forma que um único sistema de efluxo pode diminuir a suscetibilidade da célula a um amplo espectro de antimicrobianos, o que representa um dos principais problemas em medicina.<sup>(26)</sup>

De acordo com a estrutura, a fonte de energia utilizada e os tipos de moléculas exportadas, os sistemas de efluxo são classificados em seis famílias: *major facilitator superfamily* (MFS), *ATP-binding cassette* (ABC) *superfamily*, *small multidrug resistance* (SMR) *family*, *resistance-nodulation-division* (RND) *superfamily*, *multidrug and toxic compound extrusion* (MATE) e *drug metabolite transporter* (DMT) *superfamily*.<sup>(25)</sup> Os sistemas de efluxo de maior relevância clínica em bactérias Gram-negativas são os da família RND, vários dos quais são expressos por *P. aeruginosa*. Dentre eles, MexA-MexB-OprM, MexC-MexD-OprJ, MexE-MexF-OprN e MexX-MexY-OprM são determinantes significativos para a resistência a diversas drogas.<sup>(27)</sup> Essas bombas são sistemas com três componentes. O primeiro componente é uma proteína localizada na membrana citoplasmática (MexB, MexD, MexF e MexY), que opera como uma bomba dependente de energia com ampla especificidade de substratos. O segundo componente é uma proteína de membrana externa, uma porina (OprM, OprJ e OprN). E a terceira proteína (MexA, MexC, MexE e MexX) se localiza no espaço periplasmático e liga as outras duas.<sup>(13)</sup> A energia utilizada para o transporte pode ser proveniente da hidrólise de trifosfato de adenosina (ATP) ou do gradiente eletroquímico de prótons.<sup>(26)</sup>

Em 1993, foi descoberto o primeiro sistema de efluxo multidrogas do tipo RND, em *P. aeruginosa*, o MexAB-OprM.<sup>(27)</sup> Esse sistema remove  $\beta$ -lactâmicos, cloranfenicol, macrolídeos, novobiocina, sulfonamidas, tetraciclina e

trimetoprima, assim como vários corantes e detergentes. MexAB-OprM é o sistema de efluxo mais comum, e sua superexpressão resulta em resistência às quinolonas, penicilinas e cefalosporinas. A sensibilidade ao meropenem também pode ser reduzida.<sup>(22)</sup> Esse sistema contribui para a resistência natural de *P. aeruginosa* a inibidores de  $\beta$ -lactamases e sua expressão constitutiva produz resistência intrínseca a fluoroquinolonas.<sup>(10)</sup> A superprodução de MexAB-OprM, geralmente, é resultado da transcrição aumentada do operon mexA-mexB-oprM, devido a mutações no gene cromossomal que codifica a proteína repressora MexR.<sup>(13)</sup>

O sistema MexXY, descoberto em 1999, no Japão, é um determinante significativo de resistência a aminoglicosídeos somente em *P. aeruginosa*, com muitos relatos de isolados clínicos durante a última década.<sup>(27)</sup> O sistema MexXY-OprM é expresso constitutivamente em cepas de *P. aeruginosa*, o que pode conferir multirresistência intrínseca, caso haja sua indução por concentrações subinibitórias de seus substratos. MexXY-OprM é capaz de exportar, além dos aminoglicosídeos, tetraciclina.<sup>(12)</sup> Também foi observado que ele participa da resistência a quinolonas, macrolídeos, cloranfenicol, lincomicina e a maioria dos  $\beta$ -lactâmicos. Observou-se que, em *P. aeruginosa*, esse sistema funciona cooperativamente com OprM.<sup>(27)</sup> As proteínas MexXY podem ser constitutivamente superproduzidas devido a mutações no repressor *mexZ*,<sup>(13)</sup> o qual controla negativamente a expressão do operon.<sup>(27)</sup>

Os sistemas MexCD-OprJ e MexEF-OprN participam da resistência adquirida ao serem induzidos por alguns substratos.<sup>(12)</sup> O operon *mexC-mexD-oprJ* é superexpresso em *P. aeruginosa* com mutações no gene *nfxB*, que codifica um repressor transcricional do operon.<sup>(28)</sup> O perfil de substrato de MexCD-OprJ abrange  $\beta$ -lactâmicos, fluoroquinolonas, macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclina, novobiocina, trimetoprima e outros compostos.<sup>(24)</sup> A expressão desse sistema é induzida por biocidas catiônicos, o que sugere que ocorre em resposta a danos na membrana.<sup>(28)</sup> Já o operon *mexE-mexF-oprN* determina resistência a quinolonas, cloranfenicol e trimetoprima, sendo superexpresso em *P. aeruginosa* com mutações no gene *nfxC*.<sup>(13)</sup> A expressão de MexEF-OprN depende da presença da proteína MexT,<sup>(4)</sup> que atua como ativadora pós-transcricional.<sup>(29)</sup>

## PERDA DE PORINAS

Em bactérias Gram-negativas, a penetração de compostos hidrofílicos e a excreção de metabólitos são mediadas por canais proteicos inespecíficos de difusão, as porinas.<sup>(29)</sup> A modificação de porinas na membrana externa de *P. aeruginosa* pode conferir permeabilidade diminuída a diversos antibióticos.<sup>(6)</sup> A ausência dessas porinas em *P. aeruginosa* confere resistência intrínseca a um grande número de antibióticos,<sup>(21)</sup> e sua perda ou expressão reduzida ainda não foi relacionada a elementos genéticos móveis.<sup>(12)</sup>

Geralmente, os carbapenêmicos, antibióticos pequenos e hidrofílicos, penetram na célula de *P. aeruginosa* através de porinas.<sup>(30)</sup> Essa classe é usada como último recurso terapêutico diante de infecções hospitalares causadas por Gram-negativos resistentes aos demais antibióticos.<sup>(4)</sup> A produção de enzimas carbapenemases, principalmente, as MβLs, é o mecanismo mais grave de resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa*.<sup>(10)</sup> Mas, na ausência dessas enzimas, o mecanismo mais comum de resistência aos carbapenêmicos é a perda de porinas.<sup>(21)</sup>

A principal porina para entrada dos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* é a OprD, cuja inativação por mutações tem sido documentada como causadora de resistência ao imipenem e, em menor escala, ao meropenem e ao doripenem.<sup>(30)</sup> A OprD é uma porina que forma estreitos canais transmembranares, acessíveis a carbapenêmicos, mas não a outros β-lactâmicos.<sup>(16)</sup> As mutações no gene oprD podem conduzir à inativação da OprD, com perda da porina na membrana externa, o que aumenta as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para os carbapenêmicos. Menos frequentemente, a regulação negativa do gene oprD pode acontecer em mutantes nos quais MexEF-OprN é superexpresso, mediante o regulador MexT.<sup>(30)</sup> Além dos mecanismos já citados, a reduzida sensibilidade ao imipenem pode resultar da presença de PBPs com baixa afinidade por carbapenêmicos.<sup>(4)</sup>

A porina OprE, homóloga à OprD, tem como substratos específicos as cefalosporinas, de forma que sua deficiência prejudica a sensibilidade bacteriana a essa classe de antimicrobianos.<sup>(12)</sup> Mas, em *P. aeruginosa*, a principal porina expressa é a OprF, a qual permite a entrada de diversos substratos e, por isso, é considerada inespecífica.<sup>(29)</sup> Provavelmente, essa é a porina mais utilizada para penetração da maioria dos β-lactâmicos na célula bacteriana.<sup>(4)</sup>

## RESISTÊNCIA A FLUOROQUINOLONAS

Os principais mecanismos de resistência às fluoroquinolonas em *P. aeruginosa* se baseiam em alterações na DNA-girase e/ou na topoisomerase IV (alvos das fluoroquinolonas), provocadas por mutações cromossômicas nos genes que as codificam, e em mutações nos genes que regulam a expressão dos sistemas de efluxo. Há três mecanismos descritos de resistência a quinolonas mediada por genes plasmídicos. Um desses genes, qepA, codifica uma bomba de efluxo pertencente à MFS.<sup>(15)</sup> O segundo mecanismo é uma aminoglicosídeo-N-acetiltransferase, capaz de modificar uma amina secundária nas fluoroquinolonas, conduzindo a uma atividade reduzida.<sup>(14)</sup> O terceiro mecanismo, a proteína QnrA, faz parte de um grupo de proteínas codificadas por determinantes qnr e se liga à DNA girase e à topoisomerase IV, de forma a impedir sua ligação com as quinolonas.<sup>(15)</sup>

## RESISTÊNCIA A AMINOGLICOSÍDEOS

A resistência aos aminoglicosídeos tem sido descrita como um processo multifatorial, decorrente do somatório de diferentes mecanismos de resistência.<sup>(22)</sup> Os mecanismos mais comuns de resistência adquirida são a atividade de enzimas modificadoras, sistemas de efluxo ativo e redução da permeabilidade da célula bacteriana.<sup>(10)</sup> Pode ocorrer, ainda, alteração dos ribossomos por mutação, que reduz sua afinidade para esses antibióticos, e proteção ribossomal<sup>(15)</sup> pela metilação sítio-específica da subunidade 16S do rRNA (RNA ribossômico), realizada por enzimas metilases 16S rRNA.<sup>(4)</sup>

As enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, codificadas por plasmídios, reduzem a afinidade de ligação dos antibióticos modificados a alvos na célula bacteriana, a subunidade ribossomal 30S.<sup>(13)</sup> Os aminoglicosídeos são inativados enzimaticamente por reações de fosforilação (através das aminoglicosídeo-fosforiltransferases, APHs), acetilação (por ação das aminoglicosídeo-acetiltransferases, AACs) e adenilação (por intermédio das aminoglicosídeo-nucleotiltransferases, ANTs).<sup>(10)</sup> As enzimas mais frequentemente expressas por *P. aeruginosa* são: AAC(6')-II, que confere resistência a gentamicina, tobramicina e netilmicina; AAC(3)-I, que determina resistência a gentamicina; AAC(3)-II, com o mesmo perfil de resistência da AAC(6')-II; AAC(6')-I, de resistência a tobramicina, netilmicina e amicacina; e ANT(2')-I, que confere resistência a gentamicina e tobramicina.<sup>(13)</sup> Além disso, o aminoglicosídeo-3'-adenililtransferase confere resistência a estreptomomicina e espectinomomicina.<sup>(18)</sup>

A produção de uma metilase de rRNA 16S, recentemente, emergiu como um mecanismo de alto nível de resistência aos aminoglicosídeos do grupo das desoxiestreptaminas 4,6-dissubstituídas, tais como amicacina, tobramicina e gentamicina.<sup>(10)</sup> A metiltransferase ribossomal A (RmtA) e a RmtD são enzimas que realizam a metilação do rRNA 16S.<sup>(13)</sup> Todos os genes responsáveis pelas metiltransferases de rRNA 16S foram encontrados associados a transposons ou elementos semelhantes.<sup>(10)</sup>

## RESISTÊNCIA A POLIMIXINAS

As polimixinas são moléculas anfipáticas tensoativas, capazes de interagir com os fosfolípidos das membranas celulares, o que altera a permeabilidade celular.<sup>(31)</sup> Consequentemente, a resistência às polimixinas pode ser provocada por mutações que alteram a constituição da membrana externa da bactéria, através de redução de proteínas específicas da membrana externa, redução do conteúdo de íons de magnésio e cálcio e alterações lipídicas.<sup>(15)</sup>

## CONCLUSÃO

*P. aeruginosa* apresenta diversos mecanismos de resistência intrínseca e adquirida, o que, frequentemente,

resulta em uma multirresistência, favorecida pelo intenso uso de antibióticos nos ambientes hospitalares. A limitação crescente das alternativas terapêuticas eficazes contra infecções por *P. aeruginosa* enaltece a importância de se esclarecerem os mecanismos celulares, moleculares e genéticos que fundamentam a resistência.

Para além do campo teórico/experimental, são cada vez mais urgentes medidas de controle de infecções hospitalares, capazes de prevenir a transmissão de cepas resistentes, bem como o uso criterioso dos antimicrobianos. Também é essencial a implementação e manutenção de um programa de monitoramento que permita a vigilância destas cepas multirresistentes, possibilitando detectar, avaliar e minimizar a sua circulação em ambientes hospitalares e cujos dados permitam integrar e fortalecer os serviços de saúde.

### Abstract

*Pseudomonas aeruginosa* is a bacterium of great importance for immunocompromised individuals. In Brazil, it is one of the leading causes of hospital infections and can cause many types of infections. Currently, one of the biggest challenges in infections caused by *P. aeruginosa* is the resistance presented against numerous antimicrobials. In addition to the intrinsic resistance of *P. aeruginosa*, inherent in the species, this bacterium easily acquire additional mechanisms of resistance via mutation and acquisition of mobile genetic elements, for example. Accordingly, *P. aeruginosa* is considered a multidrug-resistant pathogen, which limits the therapeutic alternatives able to fight it. Therefore, understanding the mechanisms that lead to this resistance is of utmost importance to tackle infections by *P. aeruginosa*.

### Keywords

*Pseudomonas aeruginosa*; Drug resistance, Multiple, Bacterial; Cross infection

## REFERÊNCIAS

- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Pediatria: prevenção e controle de infecção hospitalar. Brasília: Ministério da Saúde; 2005. p. 64.
- Ferreira H, Lala ERP. *Pseudomonas aeruginosa*: um alerta aos profissionais de saúde. Rev Panam Infectol. 2010;12(2):44-50.
- Oliveira C, Malheiros PS, Montagner M, Rossi EM, Brandelli A. Perfil de resistência a antimicrobianos de cepas *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de ralos e pias de enfermarias hospitalares em Santa Catarina, Brasil. Rev Bras Anal Clin. 2011;43(3):192-6.
- Neves PR, Mamizuka EM, Levy CE, Lincopan N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. J Bras Patol Med Lab. 2011 ago;47(4):409-20.
- Nogueira JMR, Miguel LFS. Bacteriologia. In: Molinaro E, Caputo L, Amendoeira R (Org.). Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 4. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC; 2009. p. 339-340.
- Vahaboglu H, Coskuncan F, Tansel O, Ozturk R, Sahin N, Koksali I, et al. Clinical importance of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (PER-1-type)-producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains. J Med Microbiol. 2001 Jul;50(7):642-5.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por micro-organismos multirresistentes. 2010 25out [acesso em 14 de jan 2013]. Disponível em: [http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/ih/pdf/nota\\_tecnica2\\_IH.pdf](http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/ih/pdf/nota_tecnica2_IH.pdf).
- Santos DA, Nascimento MM, Vitali LH, Martinez R. In vitro activity of antimicrobial combinations against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Soc Bras Med Trop. 2013 May-Jun;46(3):299-303.
- Doi Y, Garcia DO, Adams J, Paterson DL. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo- $\beta$ -lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Mar;51(3):852-6.
- Fuentefria DB. Detecção de metalo  $\beta$ -lactamases e similaridade genética em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* de efluente hospitalar e água superficial. Porto Alegre. Tese [Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente] - Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Investigação e controle de bactérias multirresistentes. 2007 mai [acesso em 14 de jan 2013]; p. 11. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/reniss/manual%20controle\\_bacterias.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/reniss/manual%20controle_bacterias.pdf).
- Spindler A. Caracterização de cepas de *Pseudomonas* spp isoladas de efluente hospitalar não tratado: resistência a beta-lactâmicos e presença de integrons. Porto Alegre. Dissertação [Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente] - Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009
- Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. J Med Microbiol. 2009 Sep;58(Pt.9):1133-48.
- Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 2010 Sep;74(3):417-33.
- Tortas LM. Caracterização de integrons de classe 1 em *Pseudomonas aeruginosa*. Aveiro. Dissertação [Mestrado em Microbiologia] - Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro; 2009.
- Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? Clin Infect Dis. 2002 Mar;34(5):634-40.
- Sanschagrín F, Bejaoui N, Levesque RC. Structure of CARB-4 and AER-1 carbenicillin-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 1998 Aug;42(8):1966-72.
- Poirel L, Brinas L, Verlinde A, Ide L, Nordmann P. BEL-1, a novel clavulanic acid-inhibited extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, and the class 1 integron In120 in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2005 Sep;49(9):3743-8.
- Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Aug;47(8):2385-92.
- Shibata N, Kurokawa H, Doi Y, Yagi T, Yamane K, Wachino J, Set al. PCR classification of CTX-M-type  $\beta$ -lactamase genes identified in clinically isolated Gram-negative bacilli in Japan. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Feb;50(2):791-5.
- Martins AF. Caracterização de metalo- $\beta$ -lactamases produzidas por amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em dois hospitais de Porto Alegre. Porto Alegre. Dissertação [Mestrado em Ciências Farmacêuticas] - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.
- Clímaco EC. Análise molecular de mecanismos determinantes de resistência a antibióticos em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. Ribeirão Preto. Tese [Doutorado em Ciências] - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2011.
- Pollini S, Maradei S, Pecile P, Olivo G, Luzzaro F, Docquier JD, Rossolini GM. FIM-1, a new acquired metallo- $\beta$ -lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy. Antimicrob Agents Chemother. 2013 Jan;57(1):410-6.

24. Schweizer HP. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res.* 2003 Mar;2(1):48-62.
25. Soto SM. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence.* 2013 Apr;4(3):223-9.
26. Moreira MAS, Souza EC, Moraes CA. Multidrug efflux systems in Gram-negative bacteria. *Braz J Microbiol.* 2004 May;35(1-2):19-28.
27. Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.* 2012 Nov;3(408):1-13.
28. Fraud S, Campigotto AJ, Chen Z, Poole K. MexCD-OprJ multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement in chlorhexidine resistance and induction by membrane-damaging agents dependent upon the AlgU stress response sigma factor. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Dec;52(12):4478-82.
29. Soares MCST. Estudo de resistência aos antimicrobianos em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em hospitais da cidade de Niterói-RJ. Niterói. Dissertação [Mestrado em Patologia Experimental] - Universidade Federal Fluminense; 2005.
30. Ocampo-Sosa AA, Cabot G, Rodríguez C, Roman E, Tubau F, Macia MD, et al; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Alterations of OprD in carbapenem-intermediate and -susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bacteremia in a Spanish multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Apr;56(4):1703-13.
31. Chambers HF. Inibidores da síntese proteica e antibacterianos diversos. In: Goodman LS, Gilman AG. *As bases farmacológicas da terapêutica.* 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2005. p. 945-946.

---

Correspondência

**Ingrid de Arruda Lucena dos Santos**  
Fundação Oswaldo Cruz / Fiocruz  
Rua Leopoldo Bulhões, 1480  
Antigo Prédio da Escola Politécnica de Saúde  
Joaquim Venâncio, sala 21A - Manginhos  
21041-210 - Rio de Janeiro, RJ