

ANTIMICROBIANOS

META

Introduzir os conceitos inerentes aos antimicrobianos, importantes na compreensão de seu emprego no tratamento de doenças infecciosas.

OBJETIVOS

Ao final desta aula, o aluno deverá definir antimicrobianos e termos relacionados ao assunto como agentes bactericidas, bacteriostático, toxicidade seletiva, conhecer os mecanismos de ação dos antimicrobianos, compreender os mecanismos genéticos e bioquímicos envolvidos na resistência aos antimicrobianos.

PRÉ-REQUISITO

Para acompanhar esta aula, o aluno deverá ter noções de morfologia, fisiologia de microrganismos, microbiota normal, infecções comunitárias e hospitalares.



Cápsulas de medicamentos antimicrobianos. De acordo com os pesquisadores, o uso abusivo e indiscriminado dos medicamentos antimicrobianos pode levar à emergência e ao aumento da resistência microbiana.

(Fontes: <http://www.fiocruz.br/>)

INTRODUÇÃO

Antimicrobianos são substâncias químicas, que provocam morte ou inibição do crescimento de microrganismos, cuja essência é a toxicidade seletiva, ou seja, não devem afetar o hospedeiro. Podem ser produzidos pelos próprios microrganismos, como bactérias e fungos, e denominados antibióticos, ou serem sintetizados total ou parcialmente, os quimioterápicos.

Constituem-se em produtos de enorme importância não apenas na área de saúde, como também na economia, visto que somente nos Estados Unidos, cerca de 100.000 toneladas são produzidas anualmente. Embora aproximadamente 8000 substâncias com atividade antimicrobiana sejam conhecidas e, a cada ano, centenas de novas substâncias sejam descobertas, pouquíssimas são efetivamente aproveitadas e utilizadas como agentes antimicrobianos, visto que muitas destas não atendem aos requisitos mínimos para seu emprego terapêutico.

Paralelamente, não podemos deixar de mencionar o crescente problema em relação ao surgimento de espécies bacterianas resistentes aos diferentes antimicrobianos. Este talvez corresponda ao principal desafio dos pesquisadores, visto que a multirresistência vem se tornando diariamente mais disseminada nas populações microbianas, sejam patogênicas ou não.

Mais recentemente, outro aspecto que vem sendo cada vez mais levado em consideração refere-se à ocorrência dos biofilmes e sua importância na terapêutica antimicrobiana, pois o conhecimento sobre a ocorrência de

biofilmes microbianos em nosso organismo levou a uma quebra do paradigma de tratamento das doenças infecciosas. Certamente, para que os antimicrobianos possam ser empregados de forma mais eficaz, será necessário um maior conhecimento acerca dos biofilmes formados naturalmente em nosso organismo. Somente a partir da elucidação da ecologia dos biofilmes naturais do homem, teremos maiores chances de tratar de forma adequada as várias doenças infecciosas.



Fotografia representativa da atividade antimicrobiana do extrato da *Punica granatum* Linn sobre *Staphylococcus aureus* de origem bovina.

(Fontes: <http://eduep.uepb.edu.br>)

HISTÓRICO

Há muito tempo o homem utiliza substâncias para combater agentes infecciosos. As primeiras descrições sobre o uso de antimicrobianos datam de 3000 anos atrás. Hindus, babilônios, sumérios e egípcios empregavam plantas medicinais e derivados, sais e óxidos para tratar de doenças. Os chineses usavam bolores para tratar tumores inflamados e feridas infectadas. Apesar disso, somente no século XVI, com o desenvolvimento da alquimia, as drogas medicinais passaram a ser obtidas por métodos laboratoriais. Várias substâncias obtidas funcionavam como anti-sépticos ou desinfetantes, não apresentando uma especificidade microbiana e muitas vezes, uma elevada toxicidade para os tecidos animais. A partir do século XIX e início do século XX, foram isoladas substâncias que apresentavam uma especificidade contra células microbianas, tais como a quinina, para combater o parasito da malária, o “salvarsan”, um composto derivado do atoxil, contra a sífilis e posteriormente, em 1930, as sulfonamidas contra infecções bacterianas sistêmicas.

Entretanto, a descoberta da penicilina, o primeiro antibiótico de utilidade clínica, ocorreu quando Alexander Fleming estudava culturas de *S. aureus* em 1928. Tais culturas bacterianas haviam sido contaminadas por fungos do gênero *Penicilium* e que ao redor do fungo contaminante não havia crescido bactérias. Estudando este fungo, demonstrou que a substância era filtrável, não tóxica para animais e que exercia atividade antibacteriana não só contra estafilococos, mas também contra meningococos, gonococos, estreptococos e bacilo diftérico. Fleming denominou a substância de penicilina. Pelas dificuldades de extração e purificação do princípio ativo do antimicrobiano, não foi valorizada imediatamente. Na década de 40, foi isolada e utilizada na segunda Guerra mundial para tratar infecções bacterianas dos soldados feridos. No mesmo período, foi desenvolvida a estreptomina, um antibiótico derivado de um actinomiceto, o *Streptomyces*.

A era da antibioticoterapia se iniciava, com a busca de novos produtos a partir de microrganismos do solo, especialmente fungos e bactérias. Embora muitos produtos antibacterianos tenham sido descobertos, vários deles não puderam ser utilizados, ou pela molécula não ser tão estável, ou por ter uma porção tóxica, ou ainda por não serem absorvidos por via oral ou parenteral. Sendo assim, várias destas drogas, a partir da engenharia bioquímica, foram melhoradas em laboratório, dando origem aos antimicrobianos semi-sintéticos. Atualmente, vários antimicrobianos são totalmente sintéticos, isto é, sintetizados em laboratório.

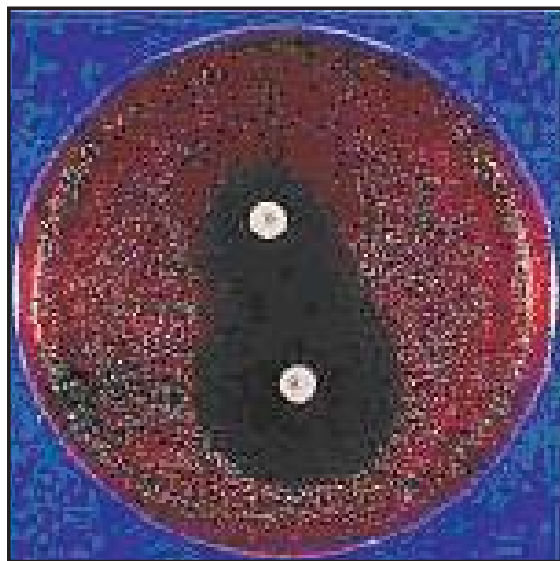
EFEITOS BACTERIOSTÁTICO E BACTERICIDA

Um agente antibacteriano corresponde ao produto natural ou sintético que mata ou inibe o crescimento de bactérias. Supondo ser o microrganismo sensível à droga, a sua ação pode provocar dois tipos de efeitos: a morte do microrganismo, conhecido como efeito bactericida, ou a interrupção de seu crescimento e da divisão celular, denominado efeito bacteriostático. Estes efeitos são variáveis de acordo com a concentração do antimicrobiano no meio onde se encontra a bactéria. Desta forma, em termos teóricos, seria possível obter o efeito bactericida de qualquer antimicrobiano sobre uma bactéria sensível, desde que se aumentasse a concentração da droga. Porém, in vivo, as concentrações destes antimicrobianos são restringidas por limitações ligadas à sua absorção e distribuição, bem como pela toxicidade para o organismo do hospedeiro.

Com relação ao espectro de ação, os antimicrobianos de amplo espectro atuam indiscriminadamente sobre as bactérias (Gram positivas e negativas) enquanto os de espectro estreito atuam sobre Gram positivos ou Gram negativos.

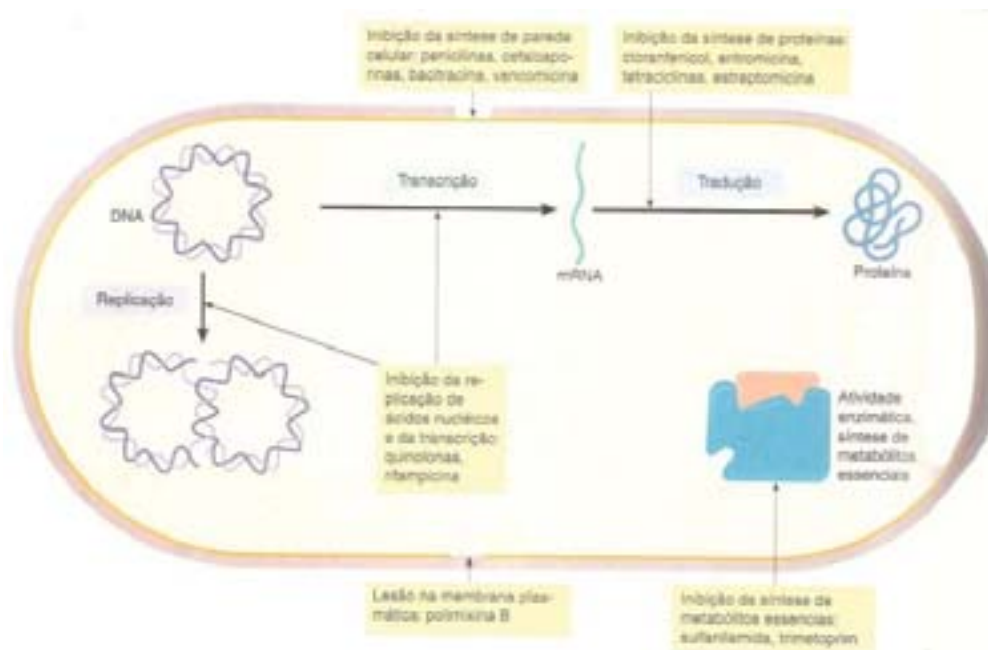
ASSOCIAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS

De modo geral são empregados antimicrobianos combinados para obtenção de efeito sinérgico (que pode ser observado em teste in vitro na figura 2), onde um potencializa a ação do outro; prevenir ou retardar emergência de microrganismos persistentes, como isoniazida, rifampicina e pirazinamida para tuberculose; tratar infecções polimicrobianas, por exemplo, abscesso intra-abdominal, onde diferentes microrganismos apresentam diferentes susceptibilidades e, tratar infecção séria antes do agente ter sido identificado.



MECANISMOS DE AÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS

Apesar do desenvolvimento de um número cada vez maior de diversas classes de antibióticos, o mecanismo de ação dos mesmos sobre a célula microbiana se resume essencialmente por: (i) inibição da síntese da parede celular, (ii) inibição da síntese protéica, (iii) inibição da replicação de ácidos nucléicos e da transcrição, (iv) lesão da membrana citoplasmática e (v) inibição da síntese de metabólitos essenciais (figura 3).



INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE PAREDE CELULAR

As eubactérias, com exceção das micoplasmas, apresentam uma parede celular ou parede de mureína constituída de cadeias contendo ligações cruzadas de peptideoglicanos que formam um arcabouço rígido e resistente, capaz de impedir a ruptura da célula pela elevada pressão osmótica interna e permitindo à bactéria reter nutrientes, proteínas e ácidos nucléicos no seu interior e manter certas moléculas em seu exterior. Bactérias desprovidas de parede de mureína, sofrem lise osmótica. Bactérias sem parede celular podem ser obtidas em laboratório desde que o meio seja hipertônico, sendo então denominadas protoplastos ou esferoplastos. Micoplasmas, bactérias que não apresentam parede celular, só sobrevivem em ambientes limitados, como por exemplo, no meio intracelular do hospedeiro. Os antibióticos polipeptídicos, como a bacitracina, os beta-lactâmicos e os antibióticos glicopeptídicos, a exemplo da vancomicina e teicoplanina, agem interferindo em uma ou algumas etapas da síntese destas macromoléculas de peptideoglicanos.

FOSFOMICINA

O primeiro passo na síntese do peptídeo glicano é a formação de um nucleotídeo derivado do ácido N-acetilmurâmico, o ácido UDP-N-acetilmurâmico, reação catalisada pela enzima piruviltransferase. A fosfomicina liga-se a e inibe irreversivelmente esta enzima, bloqueando o prosseguimento da síntese. A resistência está associada a degradação enzimática e a alteração no transporte ativo da droga.

CICLOSERINA

A cicloserina, um análogo da D-alanina, pode impedir a incorporação de D-alanina nas unidades peptídicas que compõem o mucopeptídeo por competir com as enzimas que sintetizam o dipeptídeo D-alanil-D-alanina, bloqueando assim, a segunda etapa de síntese do peptídeo glicano. A cicloserina é um antibiótico de amplo espectro, embora com ação limitada por ser tóxica às células do Sistema Nervoso Central do hospedeiro. É utilizada na poliquimioterapia para o tratamento de infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. A resistência está associada a alteração no transporte ativo da droga.

BACITRACINA

A bacitracina atua na terceira etapa de formação do peptídeo glicano, que é a transferência da molécula de N-acetil-murâmico-pentapeptídeo por um receptor fosfolipídico de membrana, de alta energia, conhecido como bactoprenol. Esta molécula desfosforilada realiza a ligação do ácido N-acetil-murâmico com outro açúcar, o ácido N-acetil glicosamina, formando o dissacarídeo do peptídeo glicano. O antibiótico impede a defosforilação desse lipídeo transportador, bloqueando a formação do dissacarídeo. É um antibiótico peptídico, constituído por aminoácidos associados a um lipídeo. Apresenta ação secundária sobre a membrana citoplasmática, sendo empregada apenas para uso tópico devido a sua toxicidade sistêmica. É mais efetivo contra Gram positivos.

GLICOPEPTÍDEOS

A vancomicina e teicoplanina são glicopeptídeos que se complexam com as subunidades dissacarídicas-peptídicas (ligam a D-ala-D-ala), interrompendo as reações de transglicosilação e da ligação cruzada com outro pentapeptídeo. Não atuam sobre Gram negativos, intrinsecamente resistentes, pois as drogas não penetram na membrana externa. A vancomicina

é um produto de *Streptomyces orientalis*, é eficiente somente contra Gram positivos e atua de maneira secundária sobre a membrana citoplasmática, alterando a sua permeabilidade sendo, por isso, altamente tóxica para as células de mamíferos. A resistência em Gram negativos é intrínseca e em Gram positivos pode ocorrer a partir do espessamento da parede celular ou de alteração do sítio alvo.

BETA-LACTÂMICOS

Têm como estrutura básica um anel beta lactâmico, um anel tiazolidina e uma cadeia lateral (grupamento N-acil), sendo o anel betalactâmico essencial para a sua atividade. A cadeia lateral determina, na maior parte das vezes, o espectro e as propriedades farmacológicas. Ou seja, derivados da penicilina apresentam diferenças essencialmente na cadeia lateral. As penicilinas, sintéticas ou naturais, atuam na inibição da função das transpeptidases, ou seja, inibem a formação das pontes cruzadas entre os pentapeptídeos (reação de transpeptidação), a última etapa de biossíntese do peptidoglicano. A transpeptidação é realizada por uma série de enzimas, transpeptidases, carboxipeptidases e endopeptidases, denominadas de forma geral como proteínas ligantes às penicilinas (PBPs). Os antibióticos β -lactâmicos se ligam irreversivelmente a essas PBPs, não permitindo a incorporação de novos peptidoglicanos de parede durante o crescimento celular. Além disso, a ligação antibiótico - PBP dispara a liberação de autolisinas, responsáveis pela digestão da parede celular, e que contribuirão, juntamente com a pressão osmótica intracelular, para a ruptura da célula bacteriana.

PENICILINAS

Normalmente atuam sobre Gram positivos, pois os Gram negativos são impermeáveis à penetração da droga. Além disso, as Gram-positivas apresentam seu envelope essencialmente constituído por peptidoglicano. Evidências recentes sugerem que possivelmente que as penicilinas atuem inibindo a síntese de RNA em algumas bactérias, causando morte sem que ocorra lise celular. Entretanto a importância clínica destas observações não foi comprovada.

CEFALOSPORINAS

Diferem dos derivados da penicilina por apresentarem anel dihidrotiazina. Apresentam o mesmo mecanismo de ação das penicilinas, se ligando irreversivelmente às PBPs. São semi-sintéticos e apresentam, em geral, maior resistência às beta-lactamases, sendo, por esta razão, mais empregados.

MONOBACTÂMICOS

São beta-lactâmicos constituídos de várias cadeias laterais ligadas a um único monocíclico. O aztreonam é o único monobactâmico em utilização clínica e atua se ligando a PBPs de aeróbios Gram negativos, desestabilizando a estruturação da parede celular.

CARBAPENEMAS

Classe de beta-lactâmicos que apresenta o maior espectro de ação. Diferenciam-se da penicilina pela cadeia N-acetil. Ligam-se as PBP1 e PBP2 de Gram positivos e Gram negativos. São resistentes às beta-lactamases cromossomiais e plasmidiais. Entretanto, algumas bactérias sintetizam carbapenemases que hidrolisam o núcleo carbapenêmico e alteram porinas na parede celular bacteriana, reduzindo, assim, a permeabilidade à droga.

Os antibióticos mencionados apresentam um efeito bactericida, porque, embora estes antibióticos atuem em diferentes fases da síntese de peptídeoglicano, o resultado será o mesmo: havendo ausência de parede ou formação de uma frágil parede defeituosa haverá lise e morte bacteriana. A resistência aos betalactâmicos pode ser mediada por alteração na ligação do antibiótico com a PBP ou pela destruição do mesmo por beta-lactamases.

INIBIÇÃO DA SÍNTESE PROTÉICA

Pelo fato das proteínas serem essenciais para o funcionamento de células, drogas que inibam a síntese protéica podem ser usadas para matar ou impedir o crescimento de uma população bacteriana. Essa ação pode acontecer em uma ou mais etapas da síntese protéica: na síntese RNA-ribossomal ou RNA-transportador; na fixação do RNAm ao ribossoma; por alteração ribossomal; na fixação do RNAt ao ribossoma e no alongamento da cadeia polipeptídica. O RNA ribossomal bacteriano é composto pelas subunidades 23S e 5S, que juntas formam a subunidade 50S, e a subunidade 16S, que juntamente com proteínas forma a subunidade 30S.

MACROLÍDEOS

São compostos por uma estrutura em anel rica em carbonos, um anel macrolídico associado a duas cadeias de açúcares que se diferem pelo tamanho (uma com 14 e outra com 16 átomos). São primariamente bacteriostáticos por atuarem na síntese de polipeptídeos da célula, inibindo a síntese protéica diretamente dependente de RNA. Macrolídeos, tais como

a eritromicina e azitromicina e também o ácido fusídico se ligam à subunidade 50S do ribossomo ainda livres inibindo a translocação do RNAt, bloqueando, assim, a formação da cadeia polipeptídica. Estes antibióticos são mais efetivos contra cocos e bacilos gram-positivos, como *Streptococcus pyogenes*, estafilococos (em pacientes alérgicos à penicilina) e contra o bacilo da difteria. Embora menos eficientes contra bacilos Gram negativos, eles atuam bem em infecções por *Legionella*, *Bordetella* e *Pasteurella*. Gram negativos são resistentes à eritromicina devido a restrição da sua entrada na célula. São exemplos, além da eritromicina, a claritromicina e a azitromicina. A resistência a macrolídeos está associada a bombas de efluxo e a metilação do ribossomo, principalmente.

CETOLÍDEOS

São derivados semi-sintéticos da eritromicina que apresentam um grupamento cetona em sua composição, o que lhes confere maior estabilidade na sua estrutura química em meio ácido. Essas drogas interagem com a subunidade 23S do RNAr também são capazes de inibir a formação da subunidade 30S. A resistência pode ser associada a bombas de efluxo e alteração do sítio alvo.

LINCOSAMINAS

Ligam-se à subunidade 50S dos ribossomos apenas quando estão livres, causando um bloqueio da peptidil-transferase, o que impede, por sua vez, a síntese protéica. Os sítios ribossomais são os mesmos ou muito similares aos utilizados pelos macrolídeos e estreptograminas, daí o fenótipo de resistência MLSb. São exemplos a clindamicina e lincomicina. A resistência pode ser associada a alteração no sítio alvo (resistência MLSb) ou a presença do gene *linB*.

ESTREPTOGRAMINAS

Classe de antibióticos onde cada membro é uma combinação de ao menos dois componentes não relacionados estruturalmente, estreptograminas grupos A e B, que atuam em sinergismo. Essas drogas penetram na célula via difusão passiva e então se ligam ao alvo específico de modo irreversível. Primeiramente a estreptogramina A se associa à subunidade 50S do ribossomo, o que induz uma modificação conformacional no sítio alvo, aumentando, conseqüentemente, sua afinidade pela estreptogramina B. As estreptograminas A previnem as ligações peptídicas diretamente ao passo que as do grupo B liberam as cadeias polipeptídicas incompletas da subunidade 50S. Quinupristina-dalfopristina é a combinação de estreptograminas

em uso. A resistência em estreptograminas B é associada a modificação do sítio alvo (resistência MLSb). O efluxo ativo da droga confere resistência a ambas as estreptograminas, assim como a inativação enzimática das drogas.

CLORANFENICOL

É um antibiótico de amplo espectro que apresenta-se estruturalmente composto por um anel benzeno. É considerada bacteriostática por se ligar de modo reversível à subunidade 50S do ribossoma, impedindo a ligação do RNAt e inibindo a ação de peptidiltransferases, assim bloqueando a união dos aminoácidos na formação do polipeptídeo. Por mecanismos ainda não bem compreendidos, este antibiótico em alta concentração tem efeito bactericida sobre *E. coli*, *S. typhi* e *S. aureus*. A toxicidade seletiva desta droga é moderada, uma vez que ela apresenta pouca afinidade com as subunidades 80S ribossomais das células de mamíferos. Contudo, a síntese das proteínas das mitocôndrias é similar ao ribossoma 70S das bactérias, e sua inibição pelo cloranfenicol é responsável pela toxicidade hematológica, com depressão medular no hospedeiro. A resistência está associada principalmente à degradação enzimática da droga (pelas cloranfenicol acetil-transferases, codificadas pelos genes *cat*). Entretanto esta pode ocorrer devido ao efluxo ativo da droga, que confere resistência a cloranfenicol mas não a florfenicol.

LINEZOLIDE

O antibiótico se associa à subunidade 50S do ribossomo, deslocando o sítio de ligação para RNA transportador e inibindo a formação do complexo de iniciação 70S, o que, por sua vez, bloqueia o processo de síntese protéica. A resistência está associada a mutações no sítio alvo.

AMINOGLICOSÍDEOS

São antibióticos bactericidas compostos de resíduos de amino-açúcares modificados, os quais incluem a estreptomicina, gentamicina, neomicina, amicacina e tobramicina. Interferem na síntese protéica produzindo seu bloqueio ou causando a formação de proteínas errôneas, dependendo da fração do ribossomo à qual a droga se liga. Em concentrações terapêuticas, a droga se liga à subunidade 30S provocando uma distorção no RNAm que está ligado a essa fração. Com isto, a ligação dos aminoácidos se faz de maneira diferente da codificada geneticamente, originando proteínas errôneas. Essas proteínas e enzimas não-funcionais ao serem incorporadas à membrana atuam nas enzimas respiratórias e outras atividades, alterando funções que levam a morte da bactéria. Em concentrações sub-inibitórias, estas drogas ligam-se à fração 50S, inibindo a síntese protéica ao impedirem

o processo de acoplamento dos aminoácidos que provoca a formação e o alongamento do polipeptídeo. Esta ação tem efeito bacteriostático.

Para exercerem sua atividade, os aminoglicosídeos devem ser transportados através da membrana celular, agindo com eficiência sobre bactérias Gram-negativas como *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, etc. Não atuam sobre anaeróbias e Gram-positivas. A captura destes agentes pelas bactérias é favorecida por inibidores de síntese de parede celular, como beta-lactâmicos e glicopeptídeos. A resistência está associada a quatro mecanismos: modificação do sítio alvo, perda da permeabilidade celular, expulsão da droga por bombas de efluxo e inativação enzimática (o mais importante deles).

TETRACICLINAS

São caracterizados pela presença de quatro anéis fusionados, o que acarreta a necessidade de transporte ativo para a entrada da droga na célula. Essas drogas ligam-se à subunidade 30S do RNA ribossomal quando esta se encontra associada ao complexo 70S, bloqueando a ligação dos receptores do RNAt ao complexo ribossomo e impedindo assim o aporte de aminoácidos e crescimento da cadeia peptídica. Em concentrações elevadas podem exercer uma atividade quelante sobre íons metálicos, como o Mg^{++} . A resistência está associada ao efluxo da droga e alteração do sítio ativo.

MUPIROCINA

Se complexa ao RNA transportador por ser confundido pela célula com isoleucina. A sua adição à cadeia polipeptídica causa a parada da síntese protéica. O fenótipo de resistência MupI está relacionado a baixos níveis de resistência enquanto o MupR está relacionado a altos níveis de resistência.

INIBIÇÃO DA REPLICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS E DA TRANSCRIÇÃO

Existem antimicrobianos que atuam em etapas de síntese e replicação de DNA, seja diretamente sobre enzimas que participam da replicação do ácido nucléico, seja interferindo na síntese de precursores dos constituintes da molécula de DNA.

RIFOCINAS

Esses antibióticos semi-sintéticos ligam-se de maneira específica e irreversível às RNA-polimerases das bactérias, bloqueando a iniciação da ca-

deia de RNAm, comprometendo todo o processo de síntese protéica e tendo um efeito bactericida, pois não há renovação de seus constituintes vitais. A rifampicina é particularmente ativa contra Gram positivos e micobactérias. Em *Mycobacterium tuberculosis* tratados com rifampicina, por exemplo, ocorre degeneração dos ribossomos, a célula pára de se dividir e morre. A resistência está associada à alteração do sítio de ligação do antibiótico.

QUINOLONAS

São considerados antibióticos bactericidas e atuam bloqueando a atividade da DNA-girase (topoisomerase II) enzima fundamental para a estabilização da molécula recém-construída de DNA, no mecanismo da força. Sem esta estabilidade do enrolamento da cadeia, na dupla hélice, a molécula não será sintetizada. A enzima alvo é essencial para os processos de replicação, recombinação e reparo do DNA. Contudo a atividade das quinolonas é diminuída na presença de pH baixo, urina e íons Mg^{2+} e Ca^{2+} . A resistência ocorre principalmente por alteração nas enzimas topoisomerase. As bombas de efluxo também têm importância ao reduzir o acúmulo da droga no meio intracelular. Entretanto, estas em seu estado natural são associadas a um baixo nível de resistência a quinolona ao passo que mutações nos genes regulatórios destas bombas acarretando aumento na sua expressão são associadas a franca resistência.

FLUROQUINOLONAS

Também apresenta as DNA girases como alvo (topoisomerase IV além da I).

METRONIDAZOL

É degradado através da nitroso-reductase formando produtos tóxicos que se intercalam na molécula de DNA, resultando na sua clivagem. Deste modo, o metronidazol pode ser considerado um quimioterápico que impede a síntese de DNA sendo, portanto, bactericida.

RIFAMPICINA

Combina-se de maneira irreversível com as RNA-polimerases, bloqueando a transcrição do DNA. É um antibiótico bactericida e sua ação seletiva é explicada pelas diferenças existentes entre as RNA-polimerases encontradas em células bacterianas e em eucarióticas.

Estudos recentes têm mostrado que os derivados quinolônicos também interferem na síntese de DNA, inibindo a ação das girases. A função destas enzimas é promover o enrolamento e desenrolamento da molécula de DNA, para que ocupe o menor espaço dentro da célula.

LESÃO DA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA

A membrana citoplasmática é o sítio de ação de outros agentes antimicrobianos que provocam alterações físico-químicas levando à morte bacteriana. Neste mecanismo de ação a permeabilidade seletiva é rompida, havendo a saída de elementos vitais à célula, como fosfatos, íons, purinas e entrada de substâncias nocivas ao metabolismo. Além disso, a morte pode ocorrer por alterações do sistema respiratório da célula, uma função exercida pela membrana em células procariontes.

POLIMIXINAS

Constituem-se de um polipéptido cíclico associado a uma cadeia de ácidos graxos. E é esta cadeia que possibilita a sua penetração através da membrana citoplasmática. Atuam como detergentes, aumentando a permeabilidade seletiva e, assim, ocasionando a lise celular por impedir a integridade osmótica celular. Logo, possuem atividade bactericida e não apresentam toxicidade seletiva, atuando também sobre as células do hospedeiro. Tem melhor efeito sobre Gram negativos uma vez que estes microrganismos apresentam duas membranas (interna e externa). A polimixina B se liga a uma fosfatidiletanolamina, um fosfolípido abundante em membrana externa e citoplasmática de bacilos Gram negativos e é muito utilizada contra *P. aeruginosa*. Não atua sobre *Proteus*, *Serratia*, *Neisseria* e *Brucella*.

DAPTOMICINA

INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE METABÓLITOS ESSENCIAIS

SULFONAMIDAS

As sulfonamidas são análogas do ácido paraminobenzóico (PABA), um fator essencial para a síntese do ácido fólico pelas células bacterianas. O ácido fólico, por sua vez, é essencial para a composição das bases purínicas e pirimidínicas, constituintes da molécula de DNA. O bloqueio da síntese dessas bases, não oferece matéria prima para a síntese de novas moléculas

de DNA, impedindo a duplicação do material genético e a divisão das células bacterianas. Quando este antibiótico está presente, a enzima que se ligaria ao substrato PABA na célula bacteriana, passa a se ligar à sulfa. A sua ligação ao antibiótico, ao invés do PABA, não gera moléculas com atividade funcional. Com isso, não há formação de ácido fólico, por competição dos substratos ao sítio da enzima.

TRIMETOPRIM

Trimetoprim é um inibidor da enzima diidrofolato-redutase, responsável pela conversão do composto intermediário ácido diidrofolico a ácido tetrahidrofolico . O trimetoprim é um antibiótico de amplo espectro muito utilizado no tratamento de infecções intestinais e infecções urinárias por *E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella* e *Enterobacter*. Uma vez que os dois antibióticos bloqueiam diferentes etapas de síntese do ácido fólico, são, normalmente, utilizados em conjunto, promovendo um sinergismo medicamentoso.

MECANISMOS GENÉTICOS ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Três condições devem ser preenchidas para que um antibacteriano iniba ou mate uma bactéria: a existência de um alvo; capacidade de atingir o alvo; e não ser inativado antes de atingi-lo.

As bactérias podem ser classificadas como sensíveis e resistentes aos antimicrobianos. São consideradas resistentes, as bactérias que crescem *in vitro*, em presença do antimicrobiano na concentração que esse atinge no sangue quando administrado para uso clínico.

Desde a descoberta e uso dos primeiros antimicrobianos já era observada uma variação na sensibilidade bacteriana aos antimicrobianos, inclusive dentro da mesma população ou espécie. Entretanto, os problemas relacionados a esta resistência só foram reconhecidos como relevantes a partir da década de 80, devido aos casos de insucesso na antibioticoterapia de certas infecções.

Apesar de existir um mecanismo intrínseco de resistência, conhecido inclusive como resistência natural, a resistência bacteriana aos antibióticos é um fenômeno genético e adquirido, de genes que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação destas drogas. Sabe-se também que a capacidade dos germes serem resistentes às drogas antimicrobianas não é uma propriedade nova ou dependente do emprego destes antibióticos, uma vez que estafilococos isolados em 1937 e preservados em cultura já apresentavam resistência contra a penicilina. Ainda, amostras de *Bacillus licheniformes* preservados em raiz de planta armazenada desde 1689 no Museu Britânico produziam beta-lactamase.

RESISTÊNCIA INTRÍNSECA

A resistência intrínseca compõe a herança genética cromossômica de uma determinada espécie bacteriana. Geralmente uma resistência é intrínseca ou natural quando o microrganismo não possui receptores para o antibiótico, quando a estrutura alvo do antibiótico está ausente na célula, quando há impermeabilidade à droga ou ainda quando há incapacidade de incorporar e transportar a droga via membrana citoplasmática. Micoplasmas, por exemplo, são eubactérias que apresentam uma resistência natural aos β -lactâmicos, pois estas células não sintetizam parede de peptidoglicano e conseqüentemente não produzem PBPs, o alvo destes antibióticos. Um segundo exemplo, é a resistência intrínseca de bactérias gram-negativas aos macrolídeos, uma vez que estas bactérias não apresentam receptores ribossomais para este fármaco. As bactérias Gram negativas são resistentes à penicilina G por não conseguir atravessar a membrana externa.

RESISTÊNCIA ADQUIRIDA

A resistência adquirida consiste no surgimento da resistência a um ou vários antimicrobianos numa população bacteriana originalmente sensível a estes mesmos antimicrobianos. Trata-se, portanto, de uma nova propriedade que surge em exemplares de uma espécie. A resistência bacteriana aos antibióticos pode ser adquirida por mecanismos de mutação e de transferência horizontal de genes entre as bactérias. Embora uma única mutação num gene chave bacteriano possa apenas reduzir levemente a sua susceptibilidade ao antibacteriano, este fenômeno pode ser suficiente para permitir sobrevivência inicial do microrganismo até ele adquirir mutações adicionais ou informação genética adicional, desta vez resultando em resistência franca ao antibacteriano.

EVOLUÇÃO VERTICAL

A resistência adquirida que se desenvolve devido a mutações e seleção dos mutantes é denominada evolução vertical. As mutações são fenômenos espontâneos, possíveis de acontecer durante a divisão celular e transmitida verticalmente da célula-mãe para as células-filhas. Para a maioria dos antibióticos, a resistência por mutação estabelece-se por múltiplas etapas, sendo necessárias seguidas mutações em um mesmo gene para que sejam atingidos altos níveis de resistência. A resistência cromossômica por mutação em múltiplas etapas é observada em relação às penicilinas, tetraciclinas e clo-ranfenicol. Algumas vezes, no entanto, uma única mutação é suficiente para conferir resistência. Esse é o caso com a resistência a fluoroquinolona pela mutação pontual do gene codificador da DNA-girase, tornando a enzima

incapaz de se ligar à droga. Esse tipo de mutação única gerando resistência também ocorre em relação a estreptomicina, dapsona, rifampicina e outros medicamentos usados nas infecções por micobactérias, constituindo-se um problema médico no tratamento da tuberculose e hanseníase. As cepas bacterianas carreando mutações conferindo resistência são selecionadas pela utilização do antibiótico.

EVOLUÇÃO HORIZONTAL

As bactérias também desenvolvem resistência através da aquisição de material genético de microrganismos resistentes, fenômeno denominado evolução horizontal. Esta pode ocorrer entre cepas da mesma espécie ou entre espécies e até mesmo gêneros diferentes. Os mecanismos de transferência incluem conjugação, transformação e transdução e para cada um destes processos, os transposons podem facilitar a transferência e incorporação dos genes de resistência adquiridos no cromossomo ou em plasmídios.

Embora a bactéria possa adquirir genes de resistência aos antibióticos por transformação e transdução, a principal forma de transferência desses genes ocorre por fenômeno de conjugação. A conjugação consiste no contato e na passagem de elementos genéticos de uma bactéria para outra, através de complexos protéicos que transitam pelas membranas citoplasmáticas de ambas. Existem dois tipos de elementos conjugativos: plasmídeos e transposons conjugativos.

MECANISMOS BIOQUÍMICOS ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Os mecanismos genéticos que codificam a resistência bacteriana se apresentam fenotipicamente em mecanismos bioquímicos de ação passíveis de classificação em seis grupos. 1. Inativação da droga por enzimas; 2. Alteração da permeabilidade à droga; 3. Alteração dos sistemas de transporte do fármaco na célula; 4. Retirada ativa do antimicrobiano do meio intracelular (mecanismo de efluxo); 5. Alteração do receptor alvo da droga e 6. Modificação do sistema metabólico alvo da droga e síntese de vias alternativas.

INATIVAÇÃO DA DROGA POR ENZIMAS

BETA-LACTAMASES

São membros da superfamília das serina-proteases. As β -lactamases podem atuar hidrolizando o anel β -lactâmico, provocando a degradação do antibiótico ou ainda interagir com o substrato do mesmo, resultando num

bloqueio da atividade da droga, sem ocorrência de hidrólise. Esta última ação enzimática é conhecida como barreira não-hidrolítica. Podem ser classificadas de acordo com dois esquemas. Segundo o esquema de Amber, são classificadas em A, C, D (serina-proteases) e B (metalo-protease, necessita de zinco ou outro metal pesado para a sua atividade). O esquema de Bush-Jacob-Medeiros as classifica de acordo com suas similaridades funcionais.

As duas beta-lactamases classe A TEM-1 e SHV-1 são penicilinas com pouca ou nenhuma atividade contra cefalosporinas que deram origem as ESBL (beta-lactamases de espectro estendido). Estas últimas causam a hidrólise da maioria das cefalosporinas. Existem, ainda, variantes das beta-lactamases que conferem resistência aos inibidores de beta-lactamase e que conferem resistência a carbapenemas. As enzimas da classe B são inibidas pela presença de quelantes (devido a necessidade de metal pesado para a sua atividade). São subdivididas em três classes (B1, B2 e B3) e conferem resistência a vários betalactâmicos como carbapenemas e cefamecinas e sua expressão pode ser constitutiva ou induzida. As enzimas da classe C apresentam melhor capacidade de hidrólise de cefalosporinas que de penicilinas. Em Gram negativos clinicamente importantes, a síntese de tais enzimas está reprimida sob condições normais, e a sua síntese está diretamente relacionada com a ruptura da parede celular. As enzimas de classe D conferem resistência a penicilinas, oxacilinas e meticilina. Várias beta-lactamases tipo Oxa estão associadas ao fenótipo ESBL.

ENZIMAS MODIFICADORAS DE AMINOGLICOSÍDEOS

A inativação enzimática dos aminoglicosídeos, realizada por diversas espécies bacterianas, constitui a principal estratégia de resistência do microrganismo a esta droga. Essas enzimas não agem por hidrólise, como ocorre com as β -lactamases. Elas são capazes de fosforilar, acetilar ou adenilar os aminoglicosídeos, sendo por isso, conhecidas como aminoglicosídeo-fosforilases, aminoglicosídeo-acetiltransferase e nucleotidiltransferase, respectivamente. A sua atuação faz com que as drogas não mais se liguem ao ribossomo. Uma enzima bifuncional, capaz de acetilar e fosforilar a droga, foi detectada em estafilococos, enterococos e alguns estreptococos, sendo responsável por altos índices de resistência.

CLORANFENICOL-ACETILTRANSFERASE

São enzimas codificadas pelos genes *cat* e causam a inativação da droga pela sua acetilação enzimática. Desta forma a molécula é incapaz de se ligar a subunidade 50S do ribossomo.

ENZIMAS SULFIDRILADAS

Um mecanismo de modificação enzimática da fosfomicina também já foi descrito, onde os microrganismos produzem enzimas sulfidriladas que modificam a fosfomicina dentro da célula, de tal maneira que a droga não mais atua em seu receptor.

ESTREPTOGRAMINA A ACETILASE E ESTREPTOGRAMINA B HIDROLASE

Estas enzimas conferem às bactérias resistência à quinupristina-dalfopristina.

ALTERAÇÃO DA PERMEABILIDADE AO ANTIMICROBIANO

A alteração da permeabilidade da membrana de bactérias às drogas é uma estratégia desempenhada por vários microrganismos, podendo ser um mecanismo constitutivo, ou adquirido por mutação ou transferência genética. Os Gram negativos são intrinsecamente resistentes aos glicopeptídeos porque estas drogas são incapazes de penetrar na sua membrana externa.

ALTERAÇÃO EM PORINAS

Esta alteração da permeabilidade se dá através de mutações nas porinas de membrana externa, que impedem a passagem da droga. É também o mecanismo responsável pela resistência dos estafilococos à meticilina, dos anaeróbios aos beta-lactâmicos e dos bacilos gram-negativos às quinolonas. Está associado a resistência a carbapenemas.

ESPESSAMENTO DA PAREDE CELULAR

O espessamento da parede além de impedir a penetração dos glicopeptídeos até as camadas mais profundas da parede leva ao bloqueio da ação da droga. Ao que parece o evento é estimulado pela presença da droga.

ALTERAÇÃO DOS SISTEMAS DE TRANSPORTE DO ANTIMICROBIANO NA CÉLULA

A passagem de antibióticos aminoglicosídeos através das membranas bacterianas está associada com a diferença de potencial elétrico existente

entre o exterior e interior celular. Estes antibióticos têm carga elétrica positiva e são transportados para o meio intracelular negativo associados a cátions bivalentes. O transporte ativo desses antibióticos é dependente de energia, derivada da passagem de elétrons, usando oxigênio ou alternativamente, nitratos. Esta passagem, portanto, é realizada em condições aeróbicas. Isto explica porque o transporte deste antibiótico para dentro de células bacterianas é reduzido em condições de baixa ou ausência de oxigênio e porque as bactérias anaeróbicas são naturalmente resistentes a estes fármacos. Alterações no transporte ativo também é o mecanismo de resistência para a cicloserina e a fosfomicina, observadas em mutantes de bacilos Gram negativos.

RETIRADA ATIVA DO ANTIMICROBIANO DO MEIO INTRACELULAR (MECANISMO DE EFLUXO)

Muitos antibióticos que atuam sobre a síntese protéica bacteriana devem penetrar na célula para chegar ao citoplasma e se acumularem até uma concentração suficiente para permitir sua ligação ao ribossomos. Uma estratégia bacteriana utilizada para impedir a atividade destas drogas é a utilização de um mecanismo de expulsão rápida destes antibióticos de dentro do citoplasma para fora através de um complexo de proteínas. Esse mecanismo é conhecido com efluxo ou “pumps”. Os genes tet codificam proteínas de efluxo que conferem resistência à tetraciclina. Bombas de efluxo codificados pelos genes *mef* têm sido relacionados à resistência aos macrolídeos. Mecanismos de efluxo também foram associados à resistência a quinolonas a estreptograminas A e B (neste último associados aos genes *vgaA* e *vgaB*) e a aminoglicosídeos.

As bombas de efluxo do tipo MDR (multi drug resistance) que existem tanto em Gram positivos quanto e Gram negativos utilizam o cloranfenicol como substrato. Há, entretanto, mecanismos de efluxo específicos para cloranfenicol, mas não específico para florfenicol, e outro que utiliza ambas as drogas como substrato.

ALTERAÇÃO DO RECEPTOR ALVO DO ANTIMICROBIANO

Outro mecanismo bioquímico de resistência aos antimicrobianos refere-se a estratégia de alteração do receptor da droga. Um dos principais mecanismos deste tipo está relacionado a algum evento que envolva as proteínas ligadoras de penicilina (PBPs). Um destes eventos é o aumento na expressão da PBP específica a qual o antibiótico se ligaria. Outro é um

processo de recombinação entre os genes de PBPs sensíveis com os genes de variáveis mais resistentes, que geralmente resulta em PBPs cujos genes codificantes apresentam padrão mosaico. Este é um mecanismo que envolve a mutação por recombinação com DNA exógeno. O último evento é uma modificação no sítio de ligação das PBPs, de forma a causar a diminuição da afinidade pelos beta-lactâmicos. Esta pode ser o resultado de mutações pontuais no gene para PBPs.

Mecanismo de alteração de receptores-alvo de antimicrobiano também foi observado na resistência à vancomicina e teicoplanina. O gene *vanA* está associado ao fenótipo de resistência em enterococos. A porção terminal da seqüência D-ala-D-ala por D-ala-D-lactato causa o não reconhecimento do sítio alvo pelo antimicrobiano.

Modificações ou ausência de proteínas como receptores ribossomais resultam em resistência aos macrolídeos e aos aminoglicosídeos. Alterações no RNA ribossomal, principalmente através de metilação, também são comuns na resistência a eritromicina (macrolídeos), sendo associada aos genes *erm*. Alguns genes *erm* codificam a resistência a eritromicina e também a clindamicina (fenótipo MLB, que apresenta resistência a macrolídeo, lincosamina e estreptogramina B devido a similaridade entre os sítios alvo destas drogas). Mutações pontuais na subunidade 23S do ribossomo são associadas à resistência à linezolid e cepas resistentes de *Enterococcus faecium*, *E. faecalis* e *Staphylococcus aureus* já foram descritas.

Alterações na constituição das DNA-girases são observadas na resistência bacteriana a quinolonas. Mutações no gene *rpoB* conferem resistência à rifampicina uma vez que causam a modificação do sítio receptor de suas RNA-polimerases.

Proteínas de proteção ribossomal conferem às bactérias resistência à tetraciclina. Estas proteínas apresentam homologia com fatores de alongamento EF-TU e EF-G e uma vez associadas a ribossomos, alteram a sua conformação de modo a evitar a ligação destes ao antibiótico.

Modificação do sistema metabólico alvo do antimicrobiano e síntese de vias alternativas.

O último mecanismo bioquímico de resistência aos antimicrobianos é a capacidade que algumas bactérias adquiriram de alterar os sistemas metabólicos ativos para a droga ou utilizar uma via metabólica alternativa para escapar da ação de um antibiótico. Um exemplo clássico deste mecanismo ocorre na resistência às sulfonamidas e ao trimetoprim. As bactérias podem produzir uma dihidro-redutase modificada, apresentando menor suscetibilidade à inibição pelas sulfas, ou ainda hiperproduzir PABA, ultrapassando o efeito competidor da sulfa, produzir uma diidro-sintetase adicional resistente à inibição das sulfas, ou ainda obtenção de fontes endógenas de timina e timidina, sem a necessidade da realização da via metabólica. A resistência ao trimetoprim pode ocorrer pela produção de uma diidro-redutase com

menor afinidade pela droga; pela capacidade da bactéria realizar uma via metabólica alternativa de folato que não sofra a ação do fármaco; um exemplo que ocorre em mutantes de *E. faecalis* ou ainda pela produção de uma redutase adicional que não sofra inibição da droga.

FATORES DE VIRULÊNCIA BACTERIANOS ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA

Os mecanismos de virulência, ou seja, as armas que os microrganismos desenvolvem para agredir o hospedeiro podem ser relevantes para a resistência à antimicrobianos e vice-versa. A capacidade de uma bactéria alcançar o meio intracelular do hospedeiro, por exemplo, favorece uma resistência intrínseca aos antibióticos, uma vez que as células de mamíferos são pobremente permeáveis a estas drogas ou apresentam mecanismos de expulsão das mesmas. Bactérias que são capazes de formar biofilme dificultariam a difusão do antimicrobiano. Toxinas secretadas por diversas bactérias podem levar a necrose local ou formar abscessos, dificultando a disponibilidade e difusão da droga ou sua inativação no local, seja pela alteração do pH, proteínas livres ou DNA.

ATIVIDADES

1. Defina antimicrobianos.
2. Conceitue agentes bactericida e bacteriostático.
3. Explique como atuam os antimicrobianos de amplo espectro.
4. Conceitue os mecanismos de ação dos antimicrobianos; citar exemplos.
5. Comente sobre a resistência aos antimicrobianos.
6. Cite os mecanismos bioquímicos envolvidos na resistência aos antimicrobianos; comente sobre um deles.
7. Dê exemplo de fator de virulência que pode estar associado à resistência a antimicrobianos.
8. Pesquise em sites na internet sobre a descoberta da penicilina.



COMENTÁRIO SOBRE AS ATIVIDADES

1. Refere-se a substâncias usadas principalmente no tratamento de infecções que atuam sobre a célula bacteriana.
2. Embora os antibacterianos sejam normalmente divididos nas duas categorias, deve ser lembrado que algumas drogas, tipicamente bacteriostáticas, podem ser bactericidas para determinadas espécies

de bactérias. Por exemplo, o cloranfenicol é um agente bacteriostático por excelência, mas funciona como bactericida para o *Haemophilus influenzae* e o *Streptococcus pneumoniae*, enquanto as penicilinas são drogas bactericidas típicas que em certas circunstâncias funcionam como bacteriostáticas.

3. É preciso compreender o significado de espectro antimicrobiano.
4. As interações dos antibacterianos com a célula bacteriana podem ocorrer na estrutura e biossíntese da parede celular entre outros.
5. Um conceito importante que deve ficar claro é que na verdade o antimicrobiano não é capaz de induzir a resistência, porém de selecionar os mais resistentes existentes em uma população.
6. Após ler sobre todos os mecanismos, escolha um para dissertar.
7. Lembre-se que fator de virulência é uma estratégia desenvolvida pelo microrganismo para vencer as adversidades.
8. Uma das mais poderosas armas da Medicina contra as infecções foi descoberta por acaso: no mofo de uma cultura de bactérias que estragou uma pesquisa.

CONCLUSÃO

Antimicrobianas são substâncias químicas que provocam morte (agentes bactericidas) ou inibição do crescimento de microrganismos (agentes bacteriostáticos), cuja essência é a toxicidade seletiva, ou seja, não devem afetar o hospedeiro. Podem ser produzidos pelos próprios microrganismos, como bactérias e fungos, e denominados antibióticos, ou serem sintetizados total ou parcialmente, os quimioterápicos.

Os mecanismos de ação dos antimicrobianos, ou seja, inibição da síntese de parede celular, da síntese protéica, da replicação de ácidos nucléicos e de transcrição, da síntese de metabólitos essenciais e lesão da membrana citoplasmática constituem-se na forma de como os mesmos agem para destruir ou inibir a célula bacteriana.

Um conceito importante que deve ficar claro é que o antimicrobiano não é capaz de induzir a resistência, porém de selecionar os mais resistentes existentes em uma população. A aquisição de resistência por uma célula bacteriana sensível é sempre decorrência de uma alteração genética que se expressa bioquimicamente. As alterações genéticas podem ser originadas por mutações cromossômicas espontâneas ou pela aquisição de genes de resistência através de plasmídios e elementos genéticos móveis.

RESUMO

A essência da quimioterapia antimicrobiana é a toxicidade seletiva – matar ou inibir o microorganismo sem afetar o hospedeiro. Os antibióticos e os quimioterápicos interferem em diferentes atividades da célula bacteriana, causando a morte ou somente inibindo o seu crescimento. Os primeiros são chamados bactericidas e os segundos bacteriostáticos. Embora os antibacterianos sejam normalmente divididos nas duas categorias, deve ser lembrado que algumas drogas, tipicamente bacteriostáticas, podem ser bactericidas para determinadas espécies de bactérias. Por exemplo, o cloranfenicol é um agente bacteriostático por excelência, mas funciona como bactericida para o *Haemophilus influenzae* e o *Streptococcus pneumoniae*, enquanto as penicilinas são drogas bactericidas típicas que em certas circunstâncias funcionam como bacteriostáticas.

**REFERÊNCIAS**

- JAWETZ E, MELNICK J & ADELBERG E. Microbiologia Médica. 21^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000.
- KATZUNG BG. Farmacologia Básica & Clínica. 9^a . Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005.
- SCHAECHTER, M. Mecanismos das doenças Infeciosas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002.
- STROHL WA, ROUSE H & FISHER B. Microbiologia Ilustrada. 1^a Ed. Porto Alegre: Artmed. 2004.
- TORTORA GJ, FUNKE BR & CASE CL. Microbiologia. 8^a Ed. Porto Alegre: Guanabara Koogan. 2002.
- TRABULSI LR & ALTERTHUM F. 2004. Microbiologia. 3^a Ed. Rio de Janeiro: Atheneu. 2004.
- WALTER TAVARES et. al., Antibióticos e Quimioterápicos Para o Clínico. 1^a . Ed. Rio de Janeiro: Atheneu. 2007