

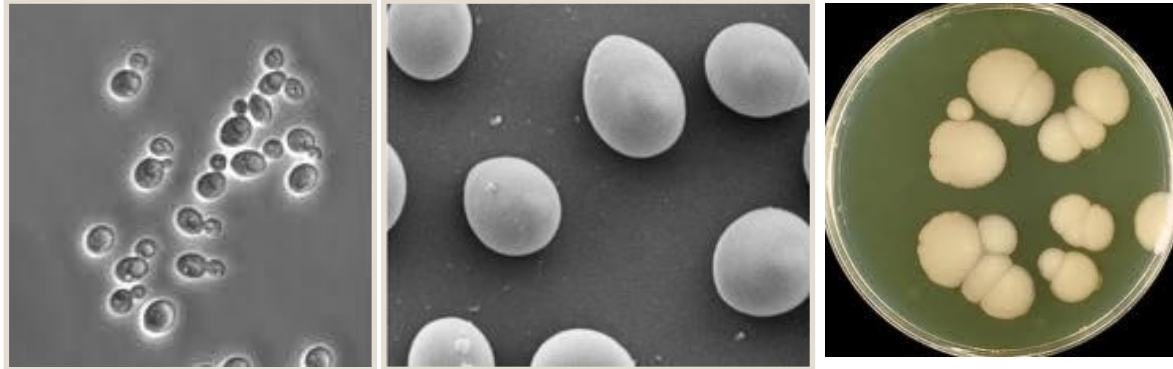
Antifúngicos: Mecanismos de ação e Resistência

Profa. Dra. Kelly Ishida

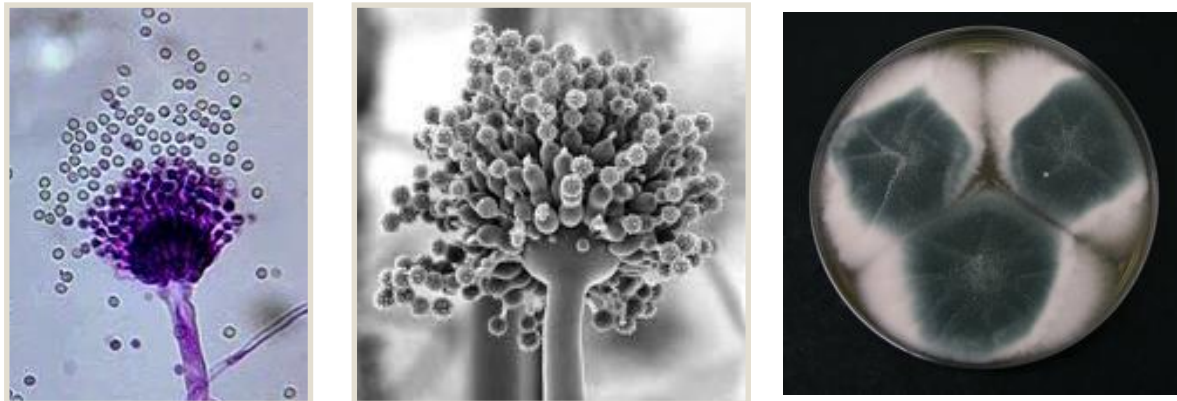
Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Microbiologia

Relembrando... Morfologia dos fungos

- Unicelulares → fungos leveduriformes



- Pluricelulares → fungos filamentosos (“bolor”)
Hifa/micélio



Relembrando... Importância dos fungos

Indústria alimentícia



Relembrando... Importância dos fungos



Ambiental: Decompositores e reciclam matéria orgânica – fungos saprofíticos (degradação de celulose)



Doenças em plantas e animais



Produtores de toxinas
(Ex. aflatoxina de *Aspergillus* sp.)



Indústria farmacêutica – produtores de antibióticos (penicilina), imunossupressores (ciclosporina) e hormônios (esteróide)

Classificação das micoses

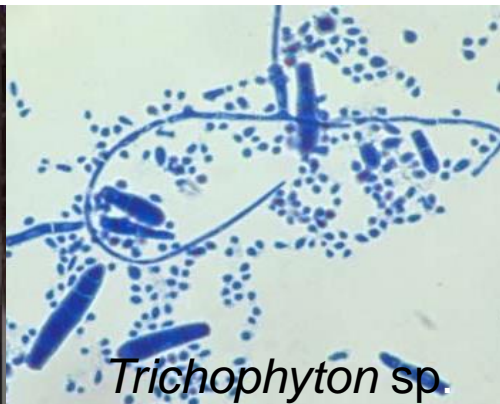
Micose	Tecido	Espécies
Superficial	Extrato córneo do tecido epitelial, pelo e cabelo	<i>Malassezia furfur</i> <i>Hortaea werneckii</i> <i>Piedraia hortae</i> <i>Trichosporon beigeli</i>
Cutâneo	Porções queratinizadas da pele, pelo e cabelo	<i>Trichophyton</i> spp. <i>Microsporum</i> spp. <i>Epidermophyton floccosum</i>
Subcutâneo	Derme, músculos e tecido conjuntivo	<i>Sporothrix</i> spp. <i>Fonsecaea pedrosoi</i> e outros
Sistêmico endêmico	Inicia-se com uma infecção pulmonar podendo atingir qualquer órgão	<i>Paracoccidioides</i> spp. <i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Coccidioides immitis</i>
Sistêmico	Qualquer tecido	<i>Candida</i> spp. <i>Cryptococcus</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp. <i>Fusarium</i> spp. Zigomycetes- <i>Rhizopus</i> spp.

- Micoses superficiais e cutâneas

- Afeta pele, cabelo e unha
- Dermatófitos



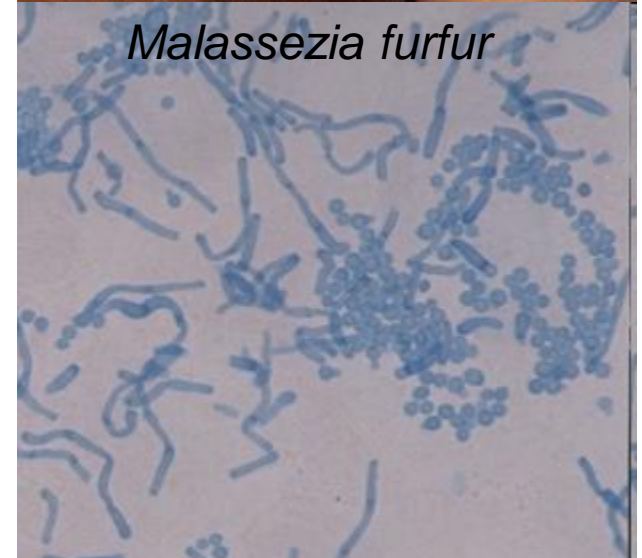
Tínea capitis



Trichophyton sp.



Ptiríase versicolor



Malassezia furfur



Onicomicoses

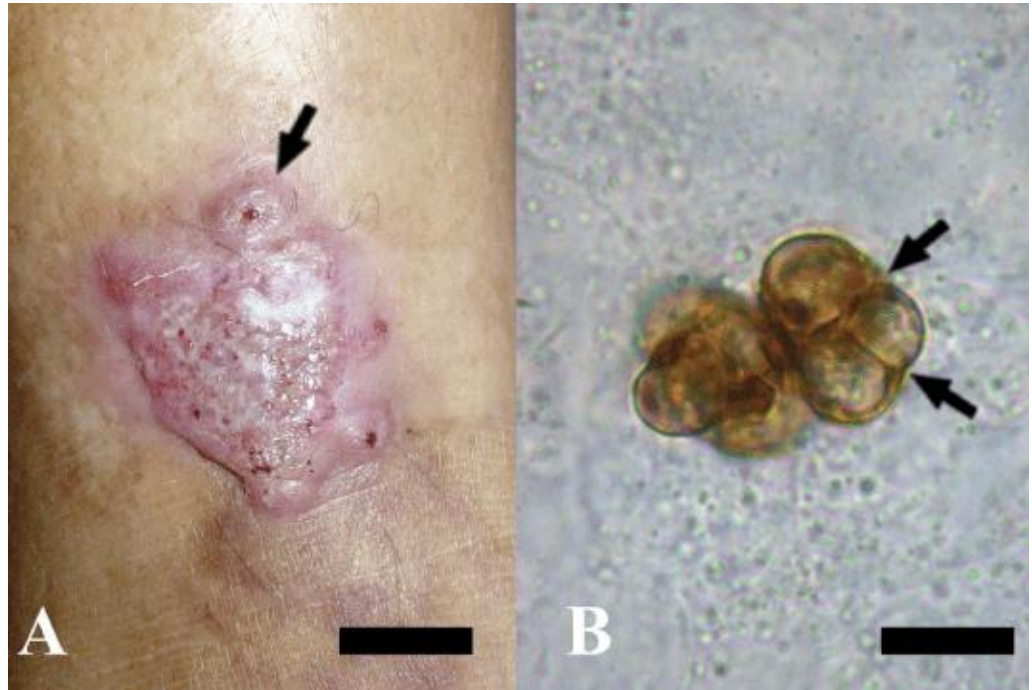
- Micoses subcutâneas
 - afeta músculos e tecidos subjacentes ao epitélio

Esporotricose



Sporothrix spp.

Cromoblastomicose



Fonsecaea pedrosoi

- Exemplos de micoses que acometem a cavidade oral -
Candidíase orofaríngea



Pseudomembranosa -
hálito fétido e placas
brancas destacáveis,
sensação de ardência e
queimação ,



Eritematosa – língua
avermelhada e queimação



**Multifocal crônica
Hiperplásica** -
características das duas
citadas



Quelite angular

Exemplos de micoses que acometem a cavidade oral

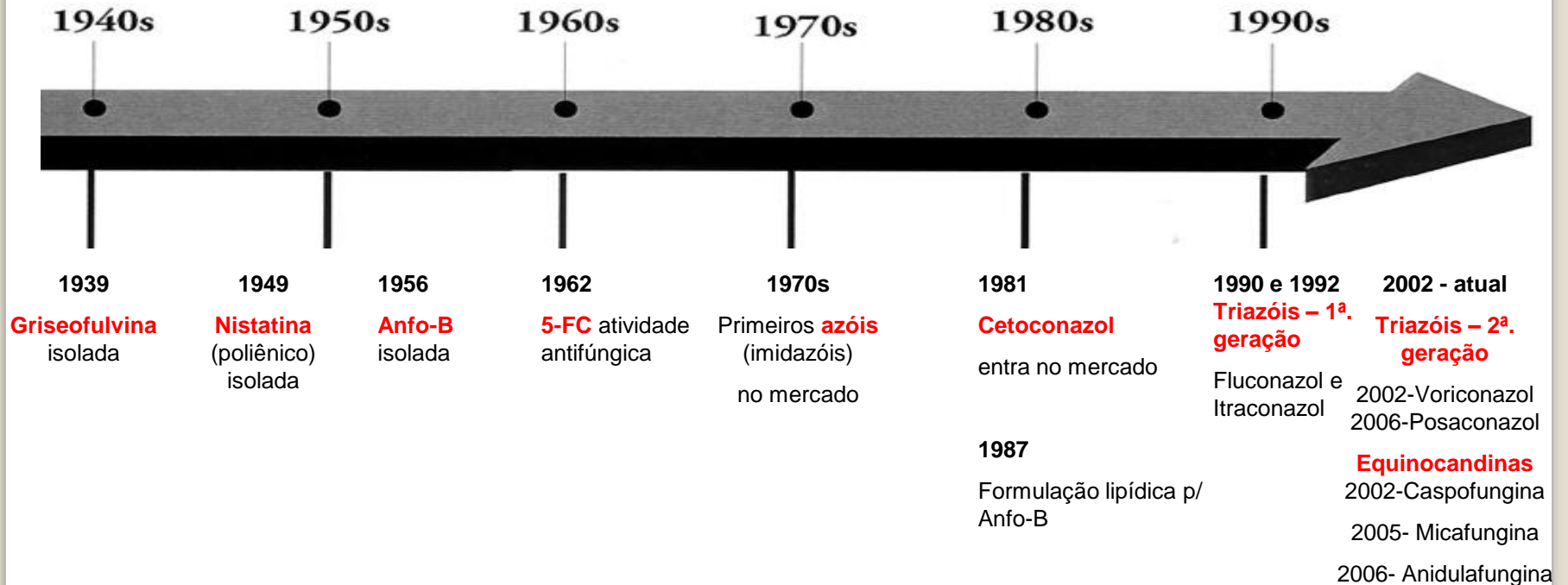
-Paracoccidioidomicose – *Paracoccidioides* spp.



Antifúngicos:

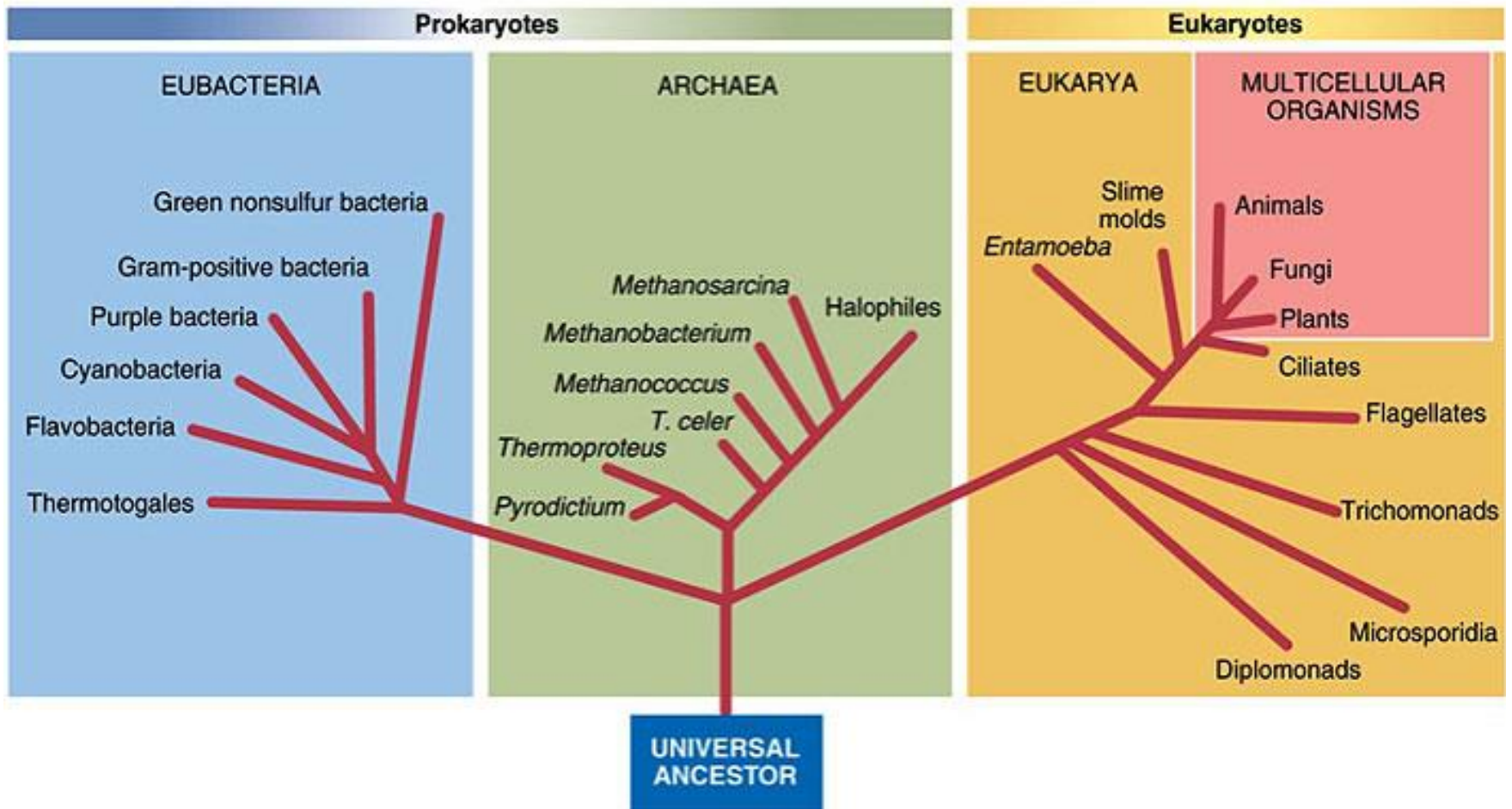
Tratamento das infeções fúngicas

Histórico

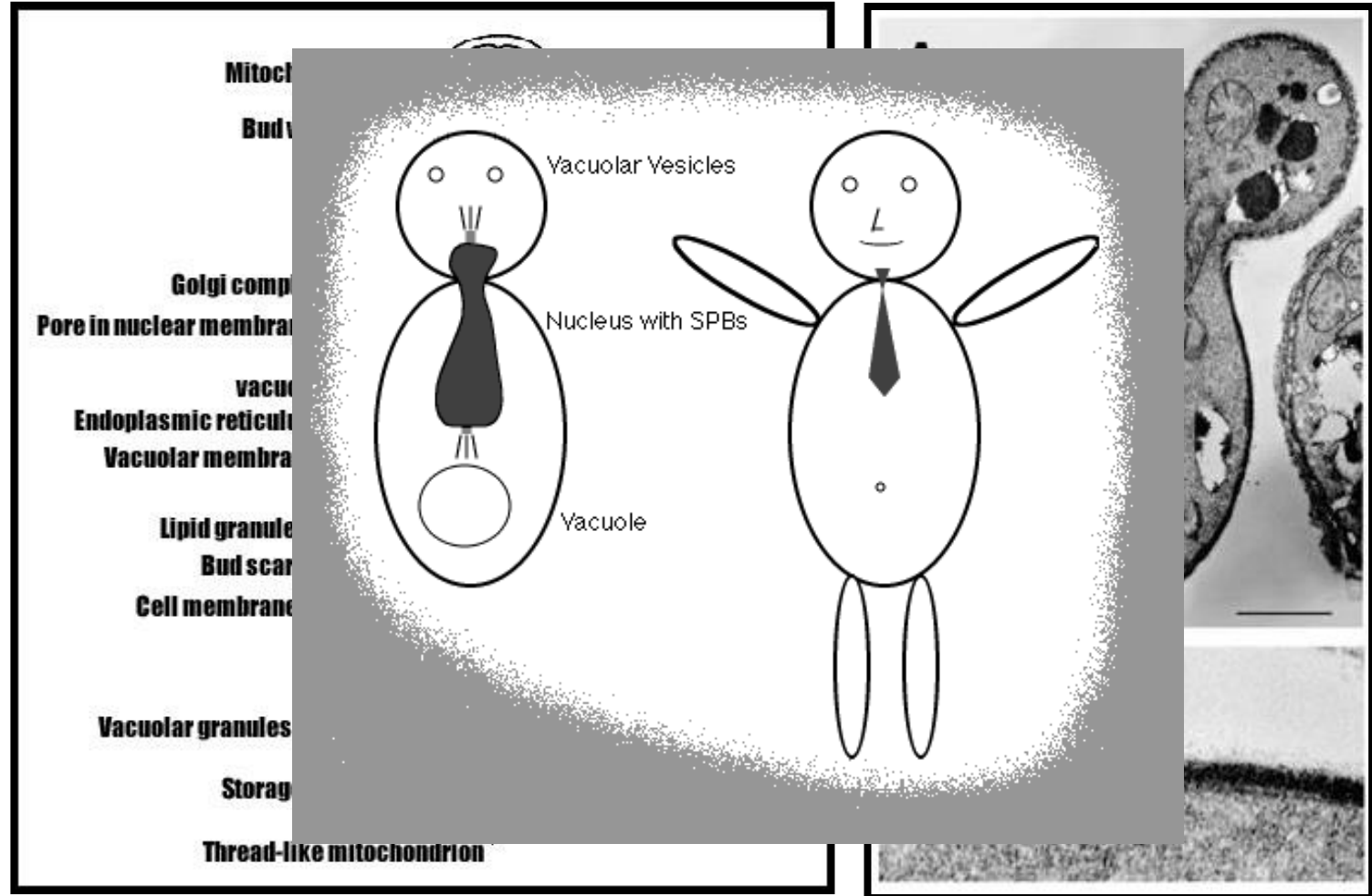


1903 – KI (iodeto de potássio)

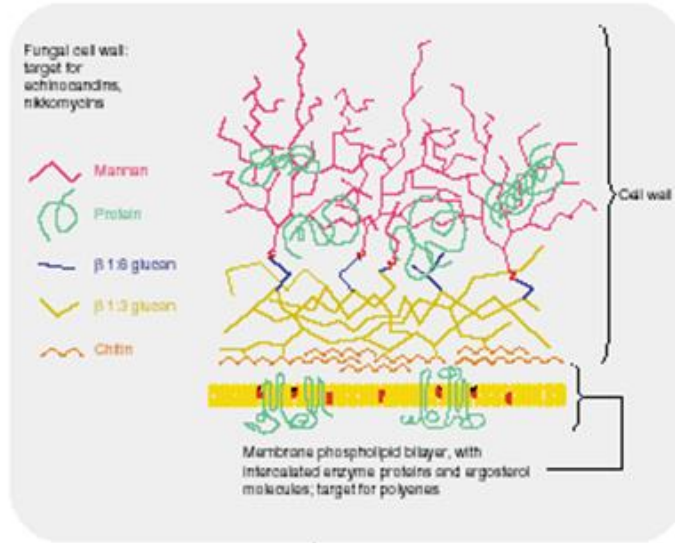
Domínio dos seres vivos



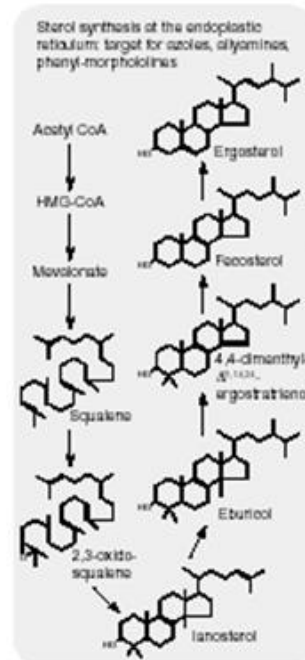
A célula fúngica



Alvos para a quimioterapia antifúngica



Equinocandinas



Poliênicos
Azóis



DNA and RNA synthesis: targets for flucytosina

5-Fluorocitosina

Microtubulo assembly: target for griseofulvina

Griseofulvina

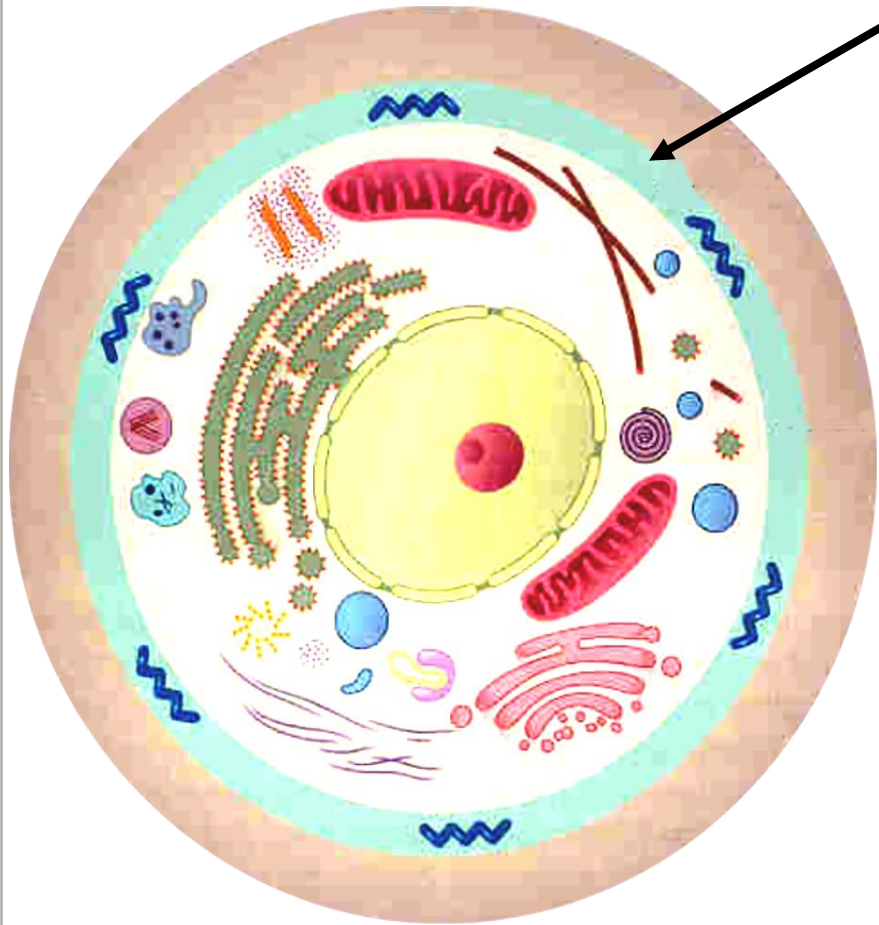
O antifúngico ideal...

- Toxicidade seletiva \Rightarrow \downarrow efeitos colaterais
- Amplo espectro de ação
- Não permita a seleção de amostras resistentes
- Não ser alérgeno (Efeito antigênico)
- Boa estabilidade
- Boa farmacocinética (Absorção, distribuição, metabolismo e excreção)
- Baixo custo

Antifúngicos e Mecanismos de ação

Antifúngicos que agem na membrana celular

Membrana celular



- **Poliênicos**

- Anfotericina B e formulações lipídicas

- Nistatina

- **Azóis**

- Cetoconazol, Miconazol,

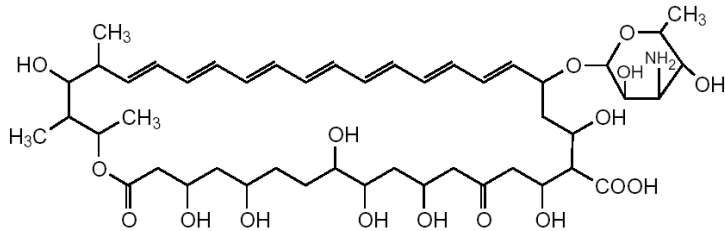
- Fluconazol, Itraconazol

- Voriconazol, Posaconazol

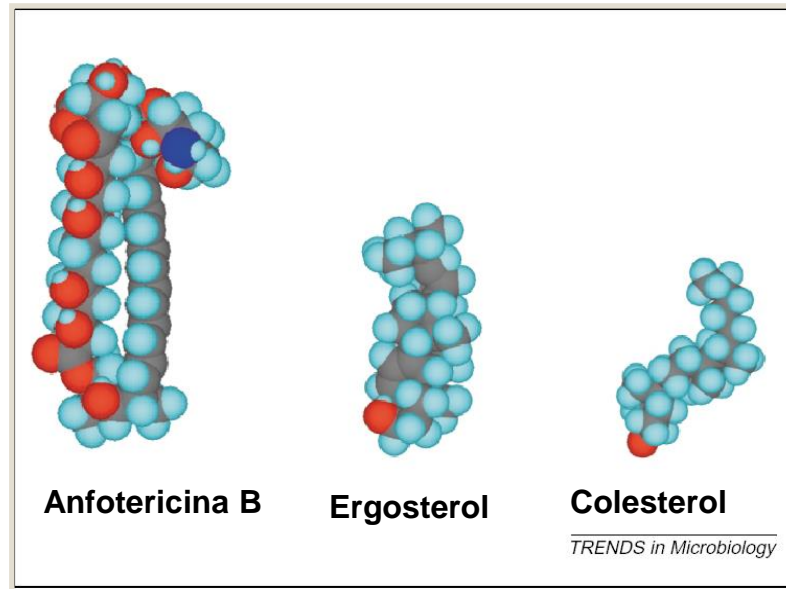
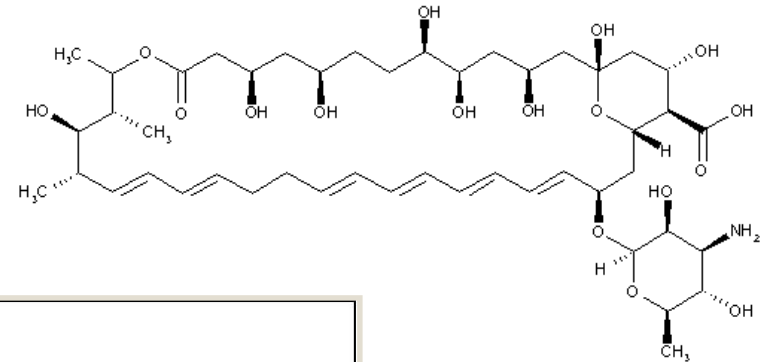
- Albacozazol, Ravuconazol,
Isavuconazol

Ação sobre o ergosterol- agentes poliênicos

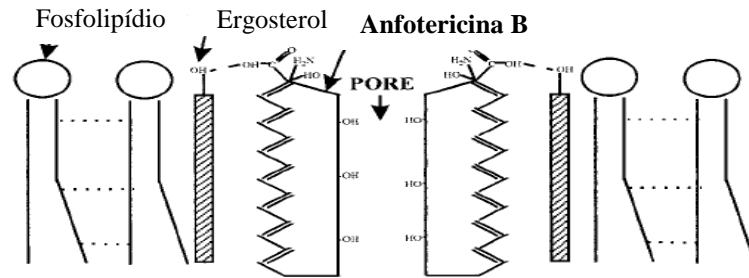
Anfotericina B



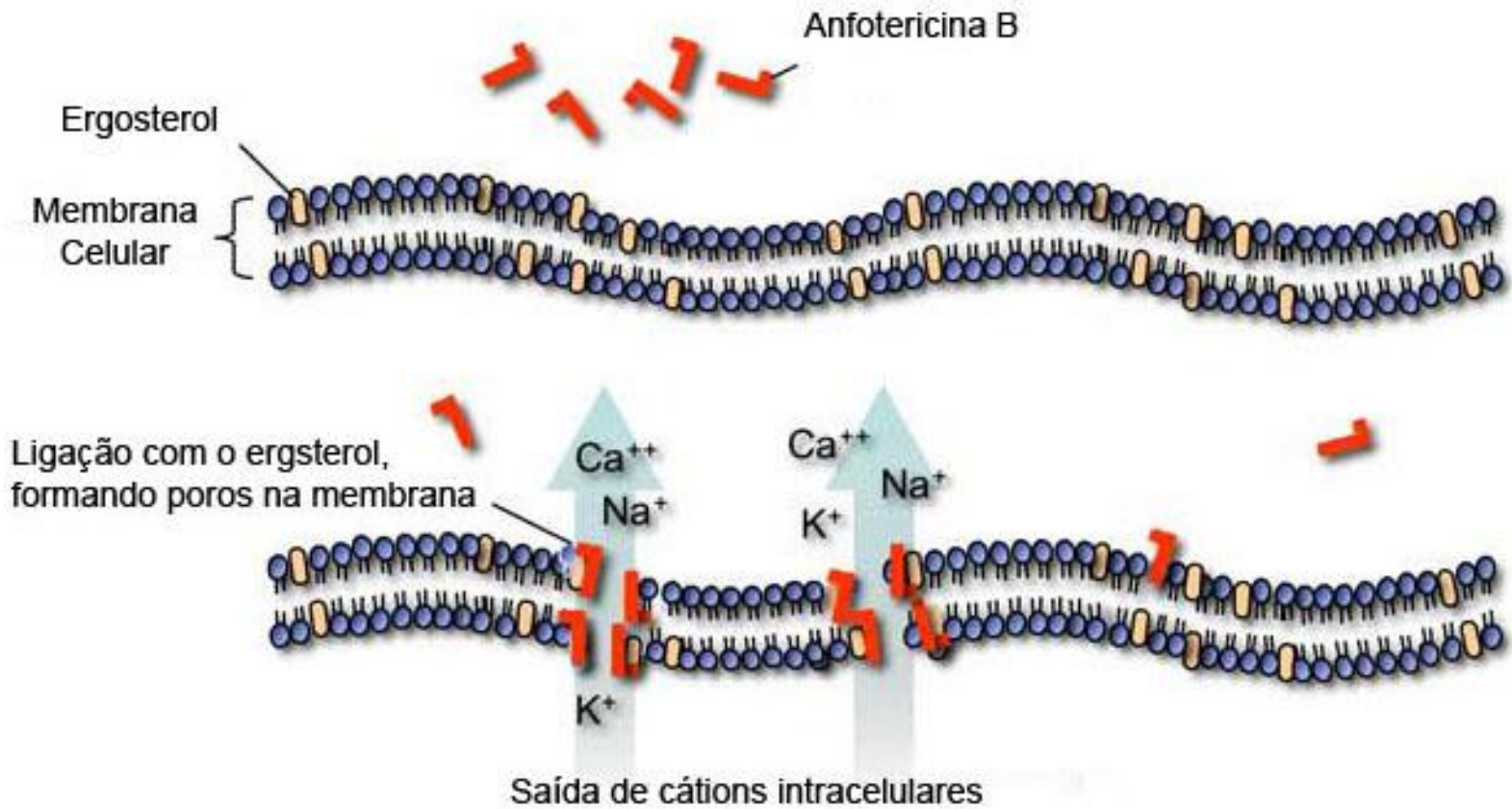
Nistatina



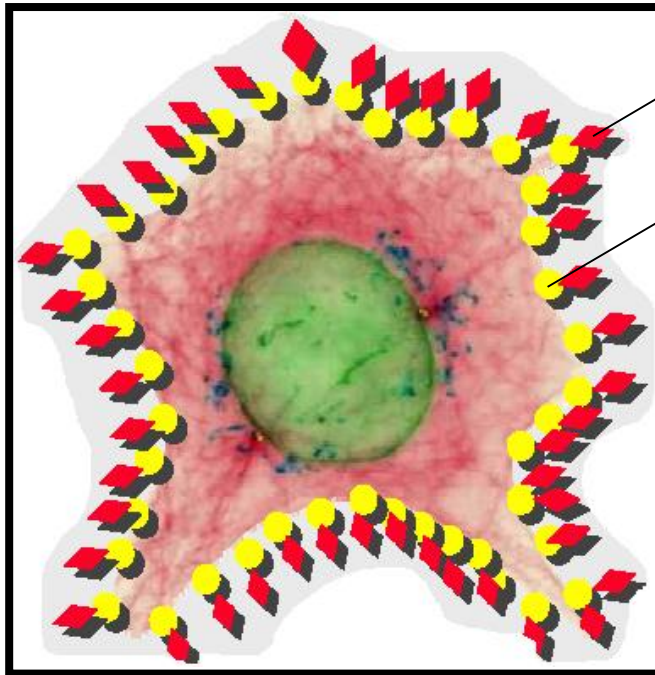
Odds *et al.* *TRENDS in Microbiology*, 11: 272-279, 2003.



Meio aquoso
Bicamada lipídica

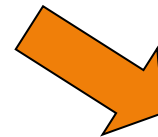


Interações com células de mamíferos



Anfotericina B/Nistatina

Colesterol



Nefrotoxicidade

Hepatotoxicidade

Cardiotoxicidade

Anemia hemolítica

Nistatina

- 1º poliênico (1949)
- Isolado de *Streptomyces noursei*
- Altamente tóxico
- Uso somente tópico – suspensão, pastilhas, pomadas, cremes
- Tratamento de dermatófitos e infecções mucocutâneas por *Candida*
- Má absorção mucocutânea
- Usado no tratamento de infecções mucocutâneas (Ex. lavagem bucal, SGI)
- Efeitos colaterais: Náuseas, vômito, diarreia com dose elevada

Anfotericina B desoxicolato

- Isolado de *Streptomyces nodosus* (1956)

- Desvantagem:

Muito tóxica, < nistatina

- Vantagens

Amplo espectro de ação

Fungicida

Baixo custo

espectro de ação:

- *Candida* spp. (exceto *C. lusitaniae*)
- *Cryptococcus* spp.
- Fungos dimórficos
- *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp.
- Fungos negros, Zigomicetos

Não tem espectro para:

- *Trichosporon* spp.
- *Fusarium* spp.

- Formulação Tópica e Endovenosa

- Efeitos adversos:

Agudos - febre, calafrio, vômito, náusea, cefaléia

Crônicos - Nefrotoxicidade (50% dos pacientes), anemia, efeito neurotóxico.

- Nistatina - Uso tópico e altamente tóxico
- Anfotericina B desoxicolato - tópico e IV

Anfotericina B lipossomal (L-AMB, Ambissome)
Anfotericina B dispersão coloidal (ABCD –
Amphocil ou Amphotec)
Anfotericina B Complexo lipídico (ABLCL, Abelcet)

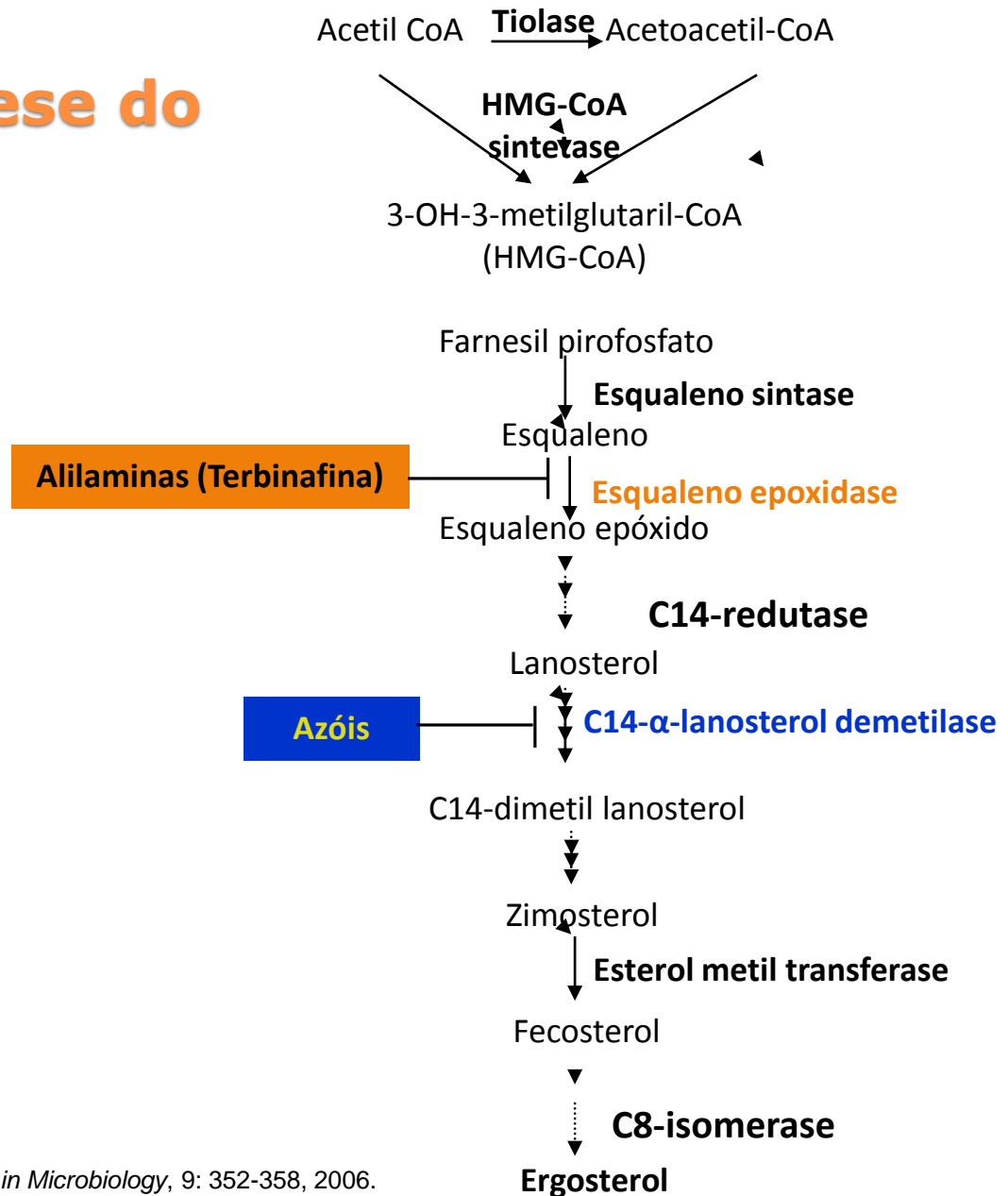


**Eficácia semelhante a
AMB desoxicolato**

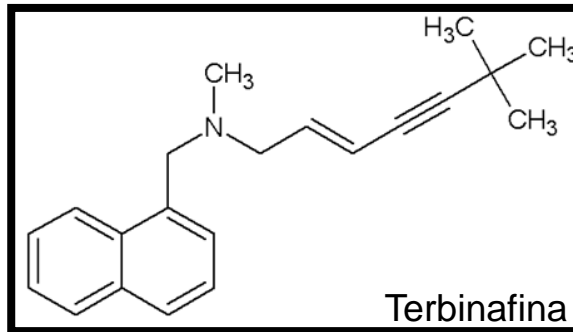


Efeitos colaterais

Inibição da síntese do ergosterol



Alilaminas: terbinafina e butenafina

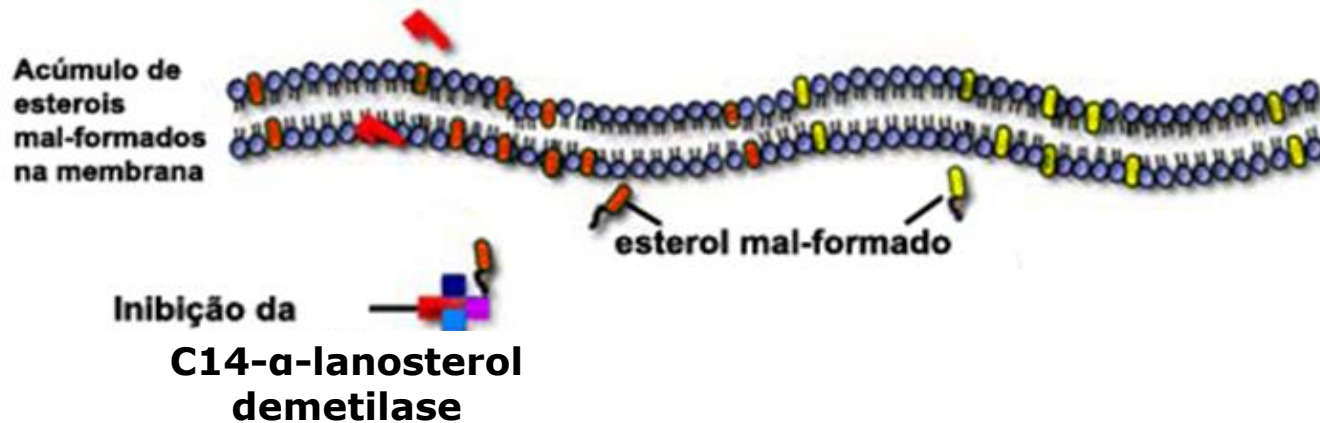
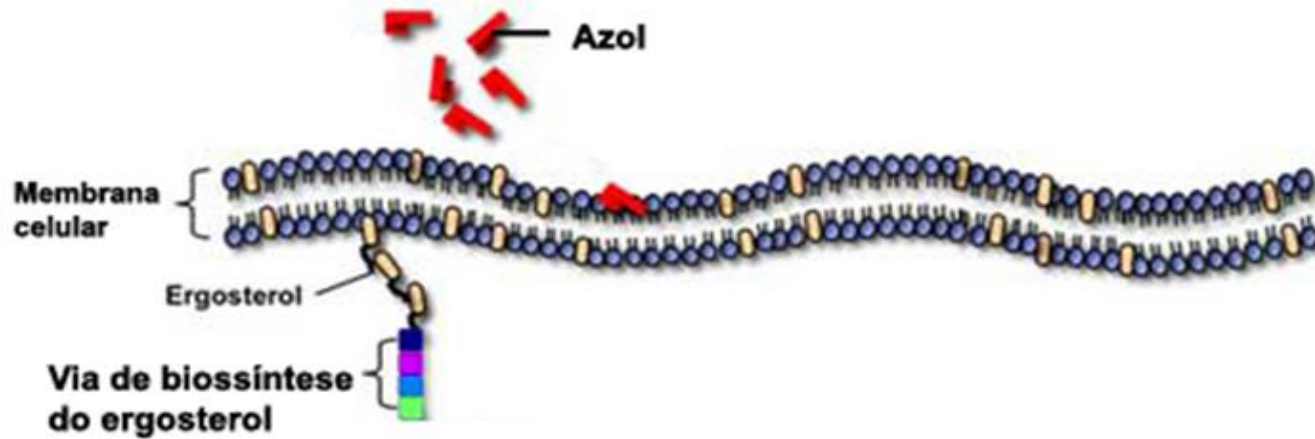


- Inibe a enzima esqualeno epoxidase
- Efeito antifúngico devido o acúmulo de esqualeno no citoplasma e falta de ergosterol nas membranas
- Onicomioses causadas por dermatófitos
- Efetivo em 90 % dos casos
- Uso tópico (1% em creme) e oral
- Acumula na pele, unha e tecido adiposo
- Reações adversas: diarreia, náuseas, erupções cutâneas, urticária e fotossensibilidade.

Azóis: imidazóis e triazóis

- Imidazóis
 - 1ª. Geração (Ex. miconazol)
 - 2ª. Geração (Ex. cetoconazol)
- Triazóis
 - 1ª. Geração (Ex. fluconazol)
 - 2ª. Geração (Ex. voriconazol)
 - 3ª. Geração (Ex. ravuconazol)

Azóis: imidazóis e trizóis

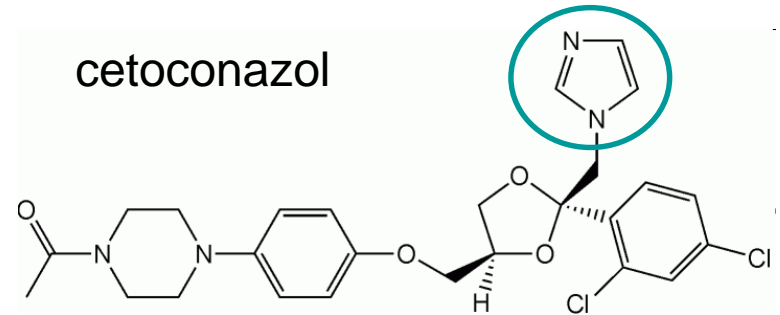


Agentes azólicos: imidazóis

- Econazol
 - Miconazol
 - Clotrimazol
- } Tópico
- Cetoconazol (tópico e sistêmico)



cetoconazol



São Fungistáticos

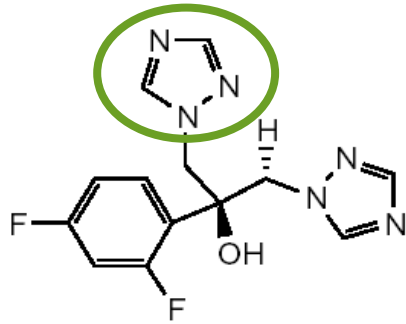
Dermatofitoses, candidíasis cutânea/mucocutânea

Uso tópico (creme, loção, shampoo) e sistêmico (comprimido)

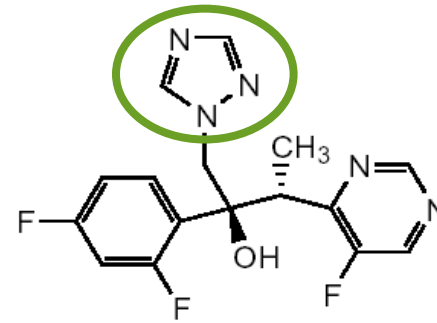
Absorção do cetoconazol – pH ácido

São hepatotóxicos, altera níveis de testosterona e cortisol

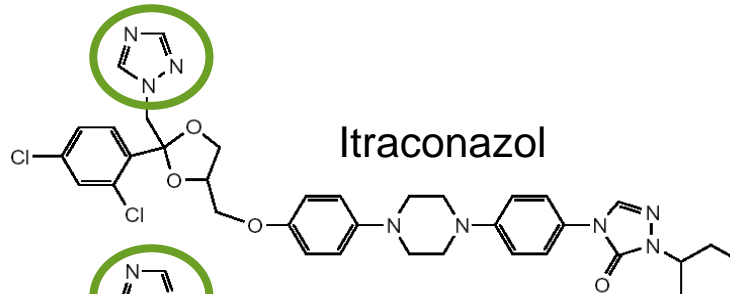
Agentes azólicos: triazóis



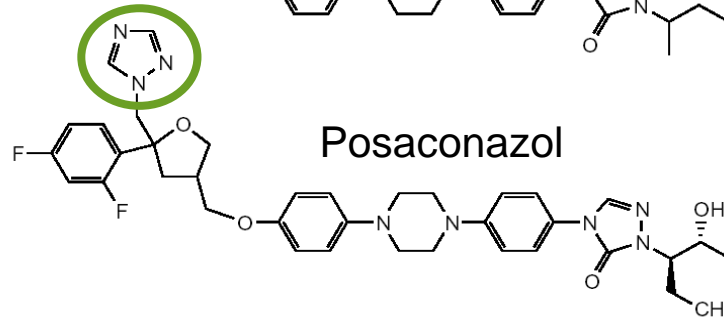
Fluconazol



Voriconazol



Itraconazol



Posaconazol

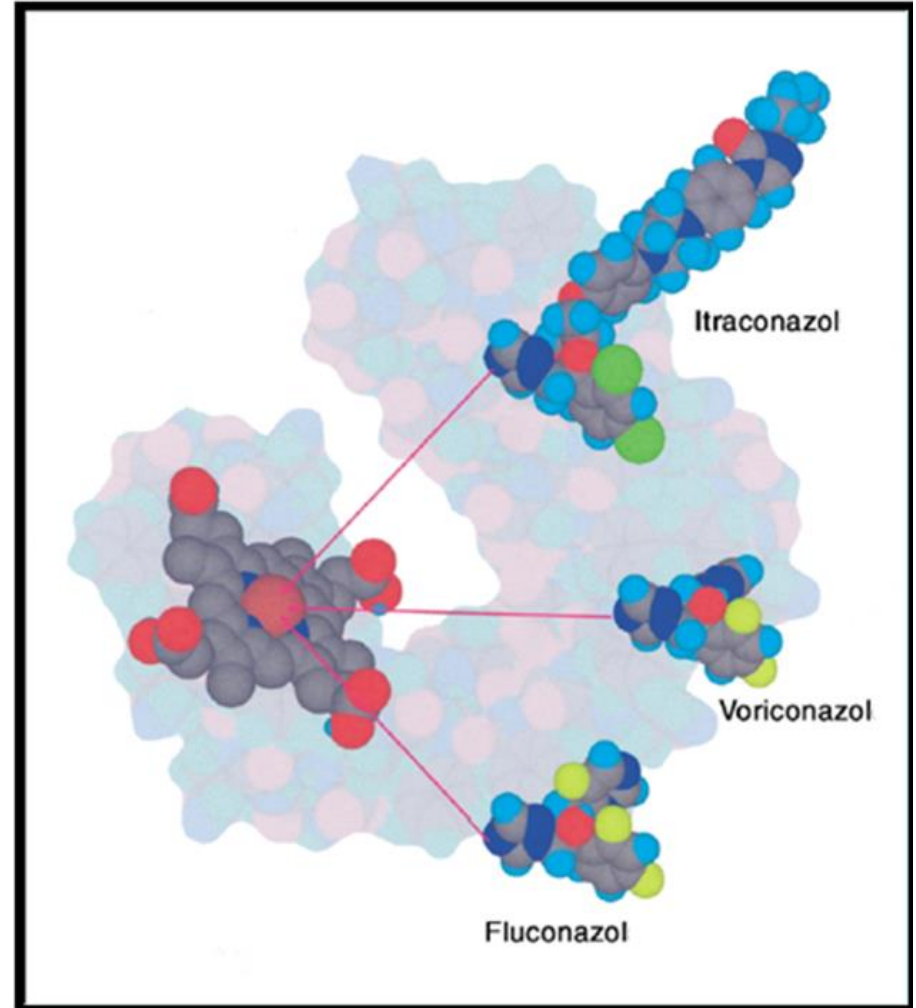
No tratamento de Infecções sistêmicas.
Principal efeito colateral – hepatotoxicidade.

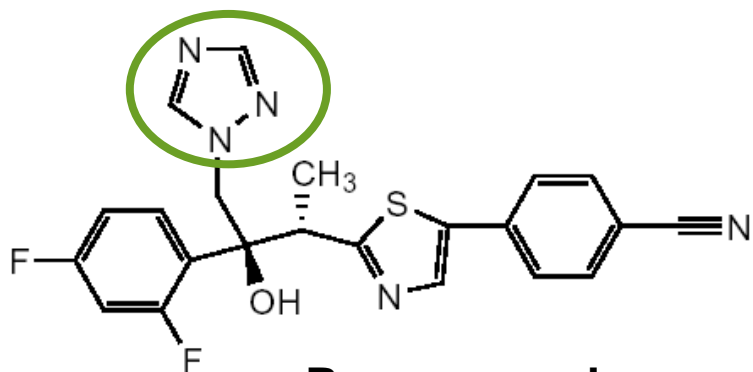
Alta afinidade pela C14- α demetilase - ↓efeitos colaterais

São mais específicos para a
enzima do citocromo P450

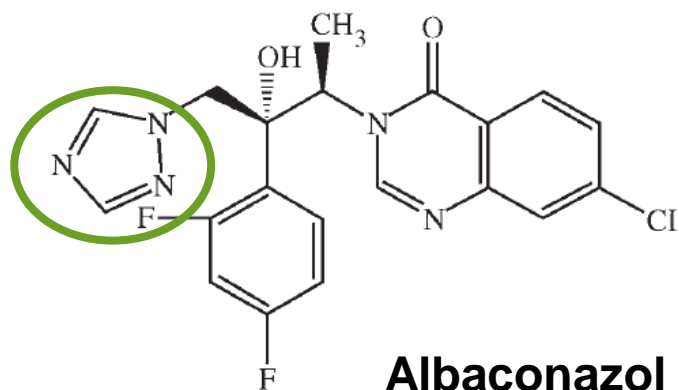
↓
↓Efeitos colaterais

Espectro de ação ampliado:
dermatófitos, fungos
filamentosos, leveduras e
fungos dimórficos

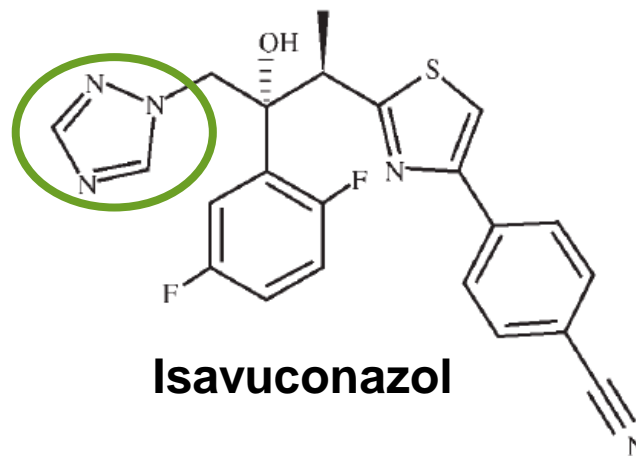




Ravuconazol



Albaconazol



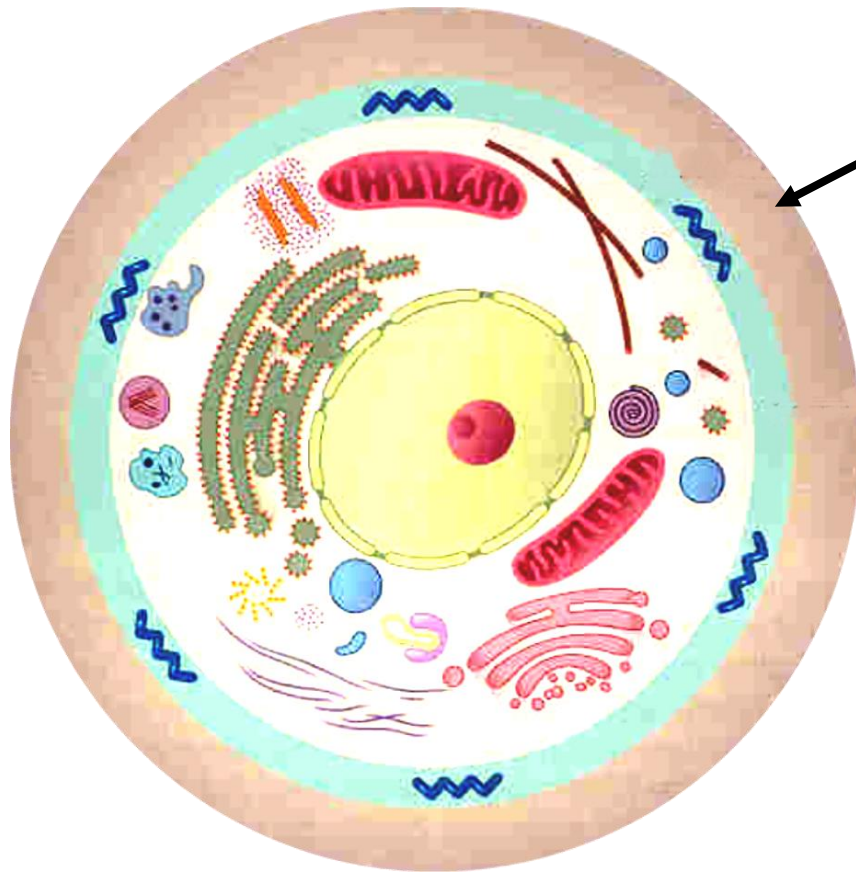
Isavuconazol

Novos triazóis

Espectro de ação dos triazóis

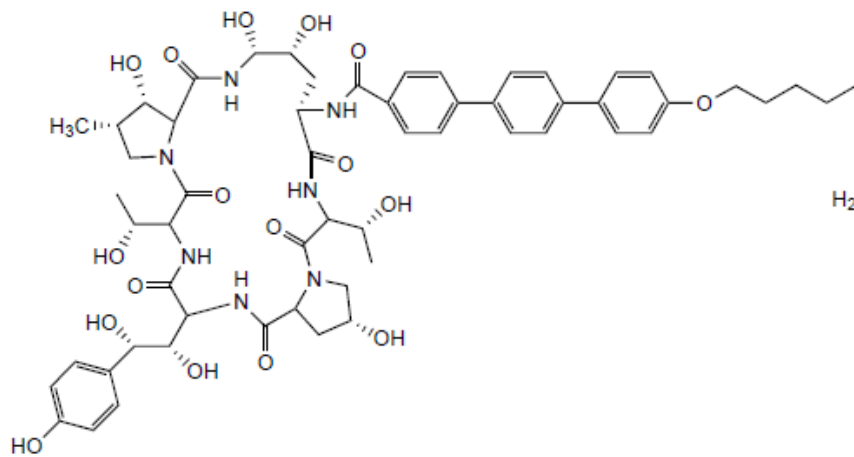
	<i>Candida</i>	<i>Cryptococcus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Zigomicetos</i>
Flu	++	+++	-	-	-
Itra	++	++	+++	-	-
Vori	+++	+++	+++	++	-
Posa	+++	+++	+++	++	++
Isav	+++	+++	+++	+	+

Antifúngicos que agem na síntese da parede celular

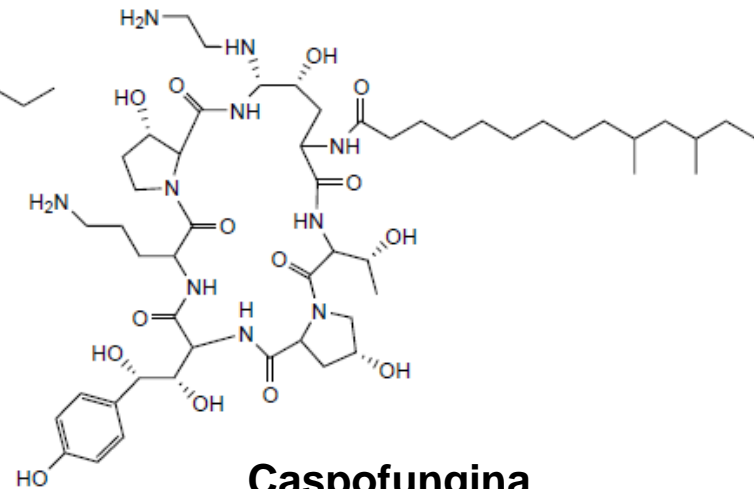


Parede celular

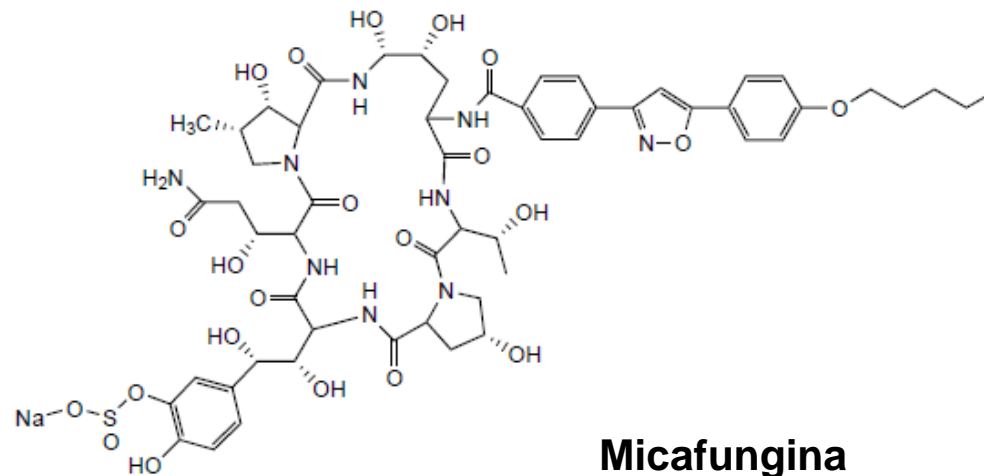
- Equinocandinas
 - Caspofungina
 - Micafungina
 - Anidulafungina
 - Aminocandina



Anidulafungina



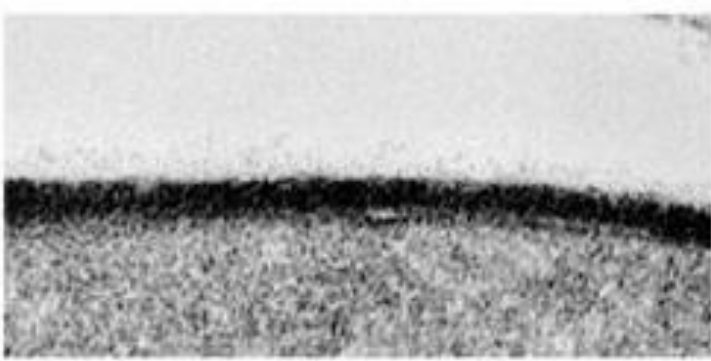
Caspofungina



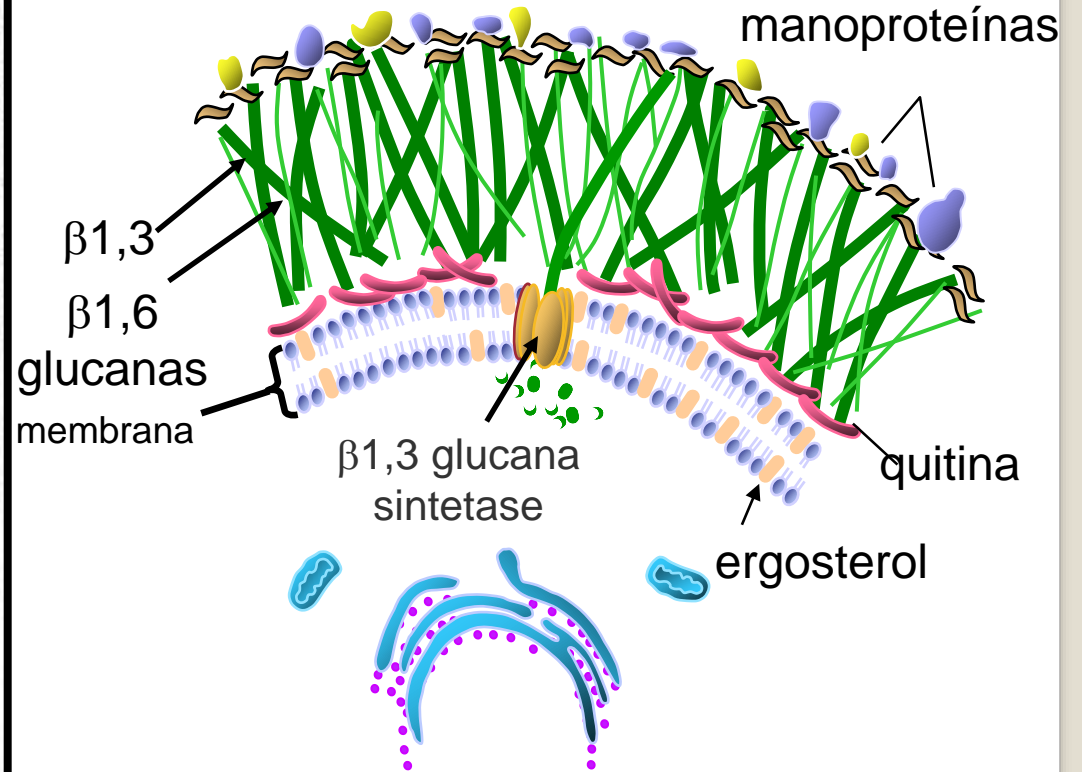
Micafungina

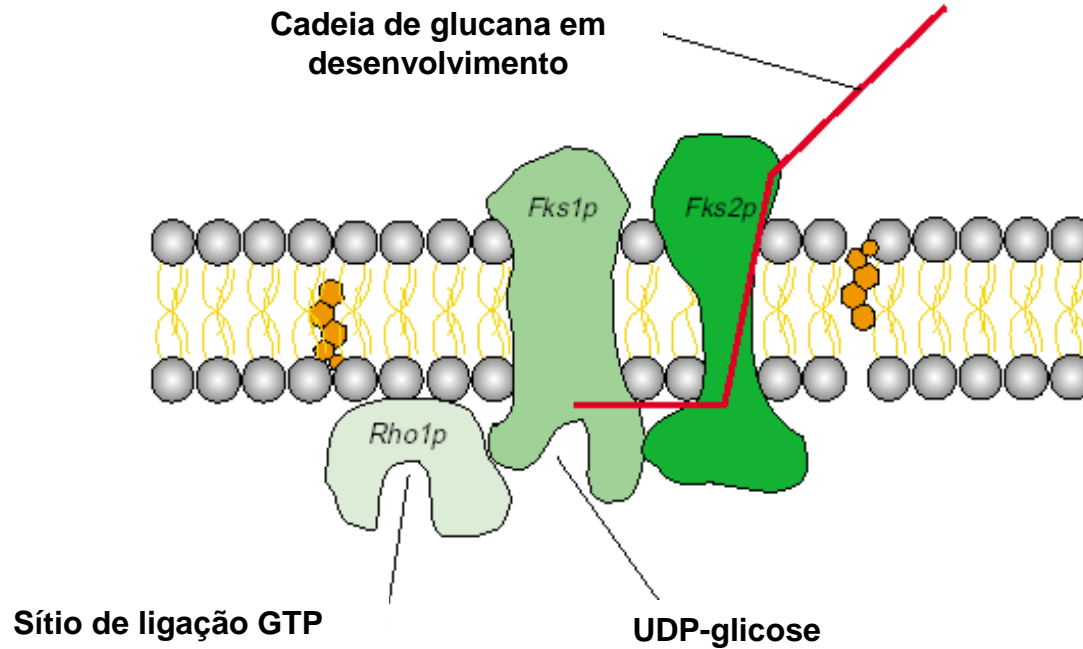
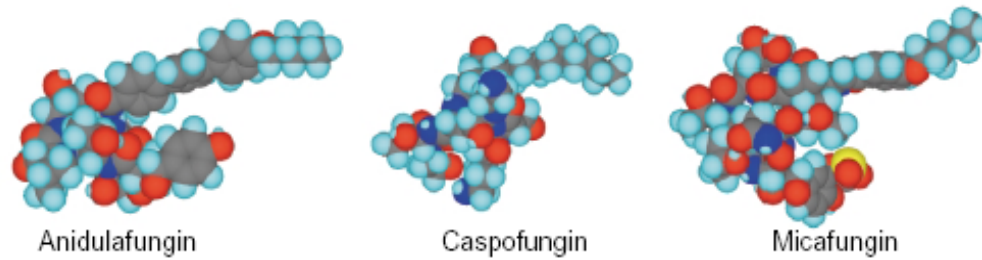
Agentes lipopeptídico: peptídio cíclico + cadeia de ácido graxo

A

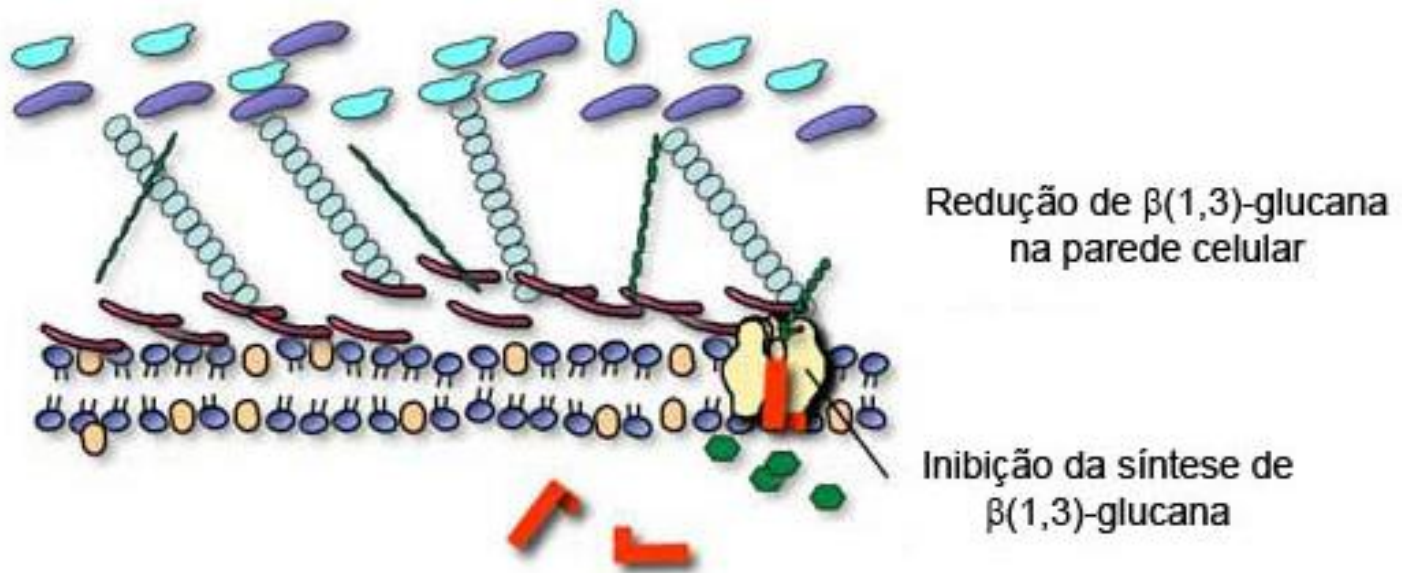


Pared celular fúngica





TRENDS in Microbiology



Perda da integridade da parede celular

Fragilidade Osmótica

Efeito fungicida

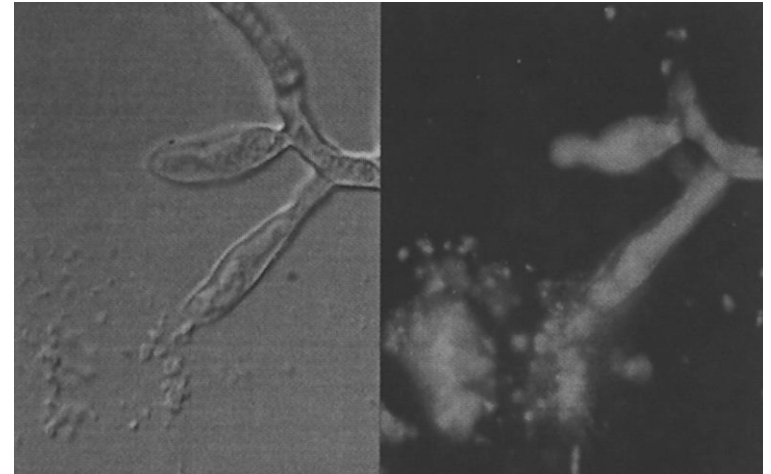
Ativos contra:

***Candida* spp. - fungicida**

e *Aspergillus* spp. - fungistático

Indicação: candidíase esofágica,
candidemia, candidíase invasiva,
Aspergilose invasiva refratária a outros
antifúngicos

Aspergillus



Bowman et al. *Antimicrob Agent Chemother* 2002;46:3001-12.

Via de administração IV uma vez por dia.

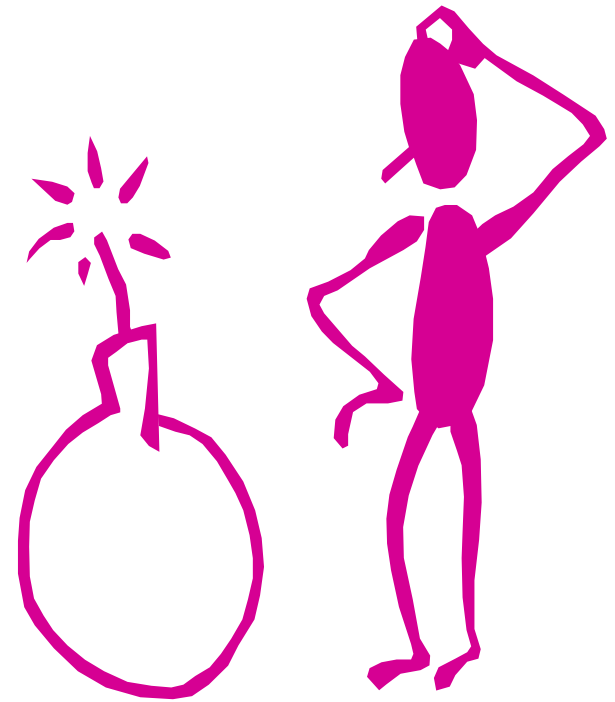
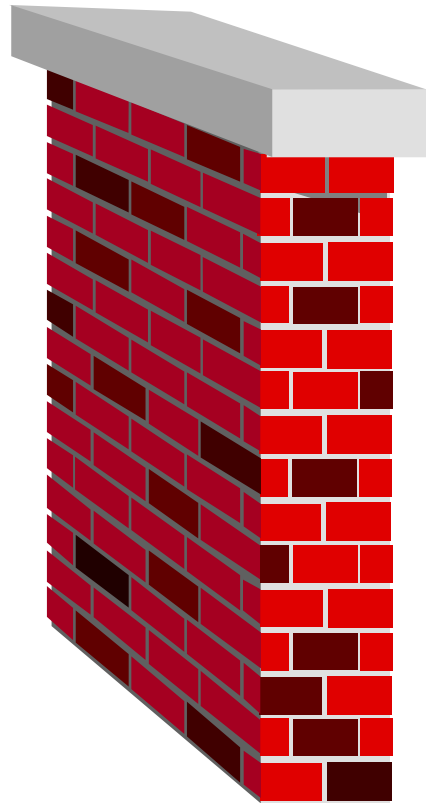
Pouca interação com outras drogas

Efeitos adversos: gastrointestinais

Não apresenta resistência cruzada os agentes
azólicos

**Caspofungina, Anidulafungina e Micafungina - São
similares - eficácia e segurança**

Resistência aos agentes antifúngicos



O que pode levar à resistência ?

“ O antimicrobiano não induz à resistência”
O que ocorre é a seleção natural de
microorganismos resistentes ao
antimicrobiano”

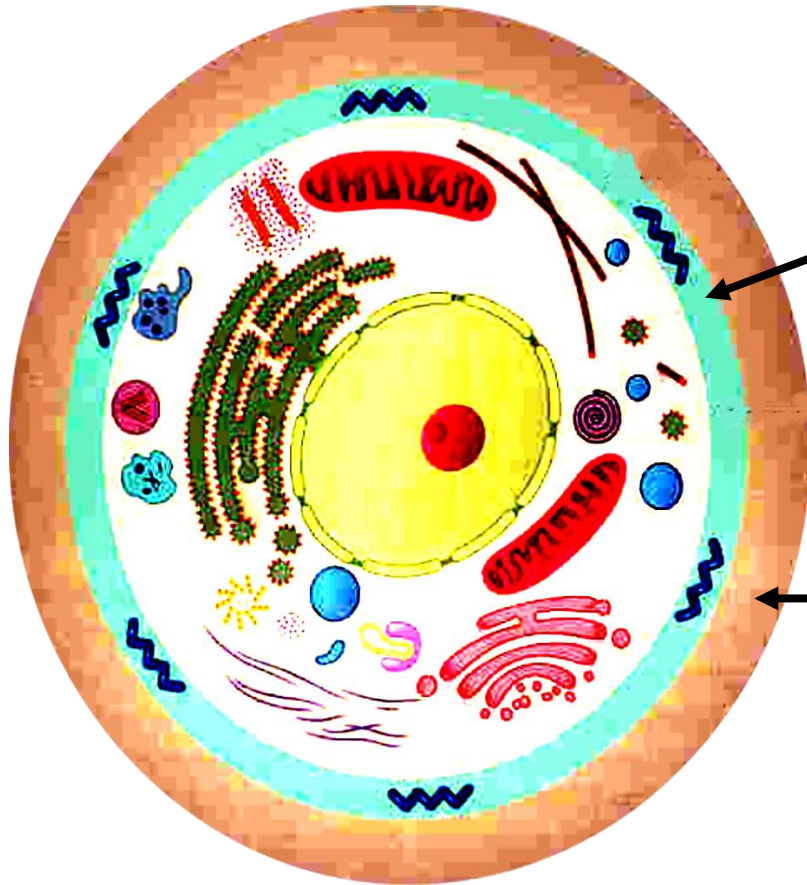
“A resistência microbiana reflete o princípio
evolutivo de que os organismos se
adaptam geneticamente a mudanças no
seu meio ambiente”

Como minimizar a seleção de cepas resistentes?

- Evitar o uso indiscriminado de antifúngicos
- Diagnóstico correto
- Tratamento adequado
- Utilizar dosagens adequadas e suficientes
- Mudar tão logo de antifúngico quando se observa que o fungo possui sinais de resistência
- Fazer teste de susceptibilidade à droga quando necessário

Mecanismos de resistência aos antifúngicos

Antifúngicos



Membrana plasmática
Poliênicos
Azóis

Parede celular
Equinocandinas

Mecanismos de resistência aos agentes poliênicos

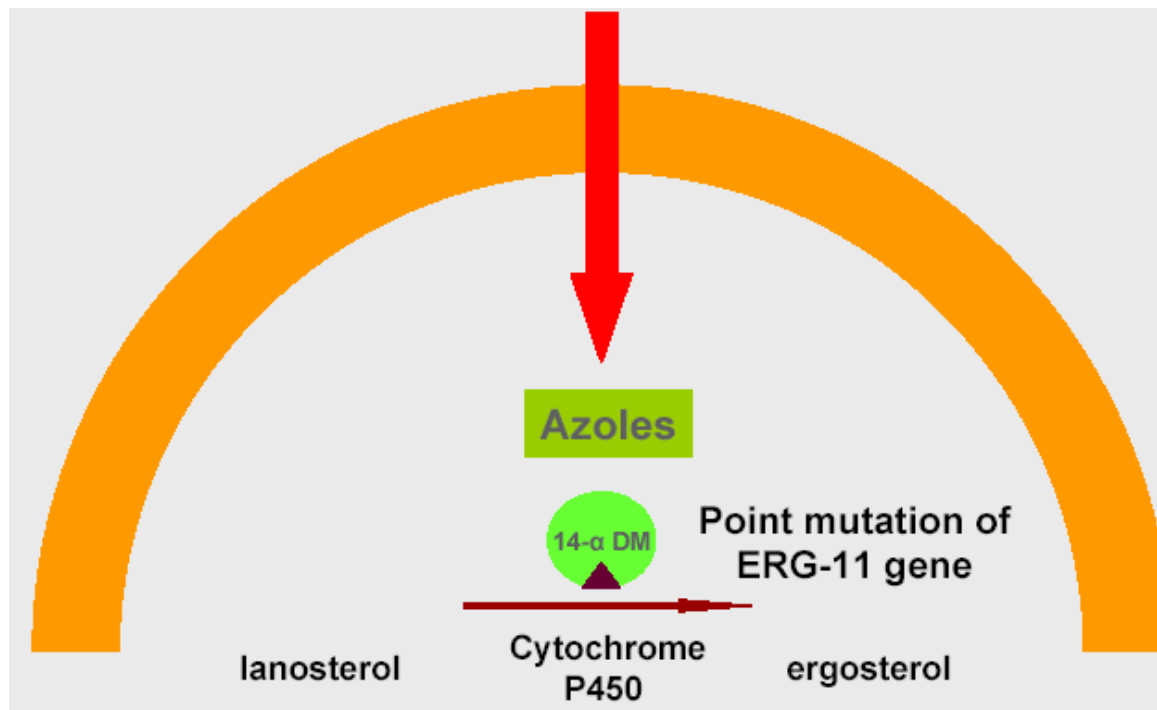
- Diminuição da quantidade de ergosterol
- Acúmulo de outro esterol, diferente de ergosterol, com baixa afinidade pelos poliênicos.

Resistência intrínseca: *C. lusitaniae* e *C. guilhiermondii*
Resistência secundária: *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*

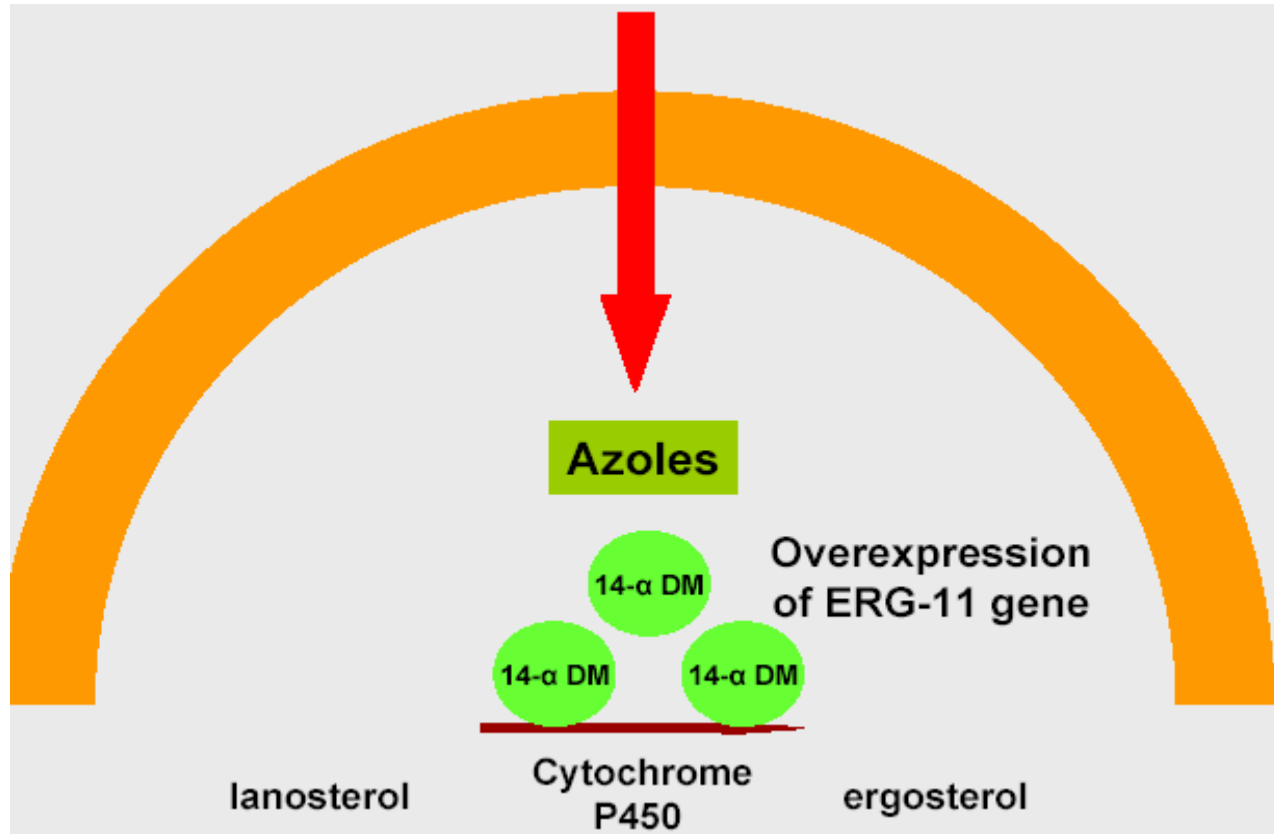
Resistência é rara.

Mecanismos de resistência aos azóis

Mutação do gene *ERG 11* (C14- α - lanosterol demetilase)

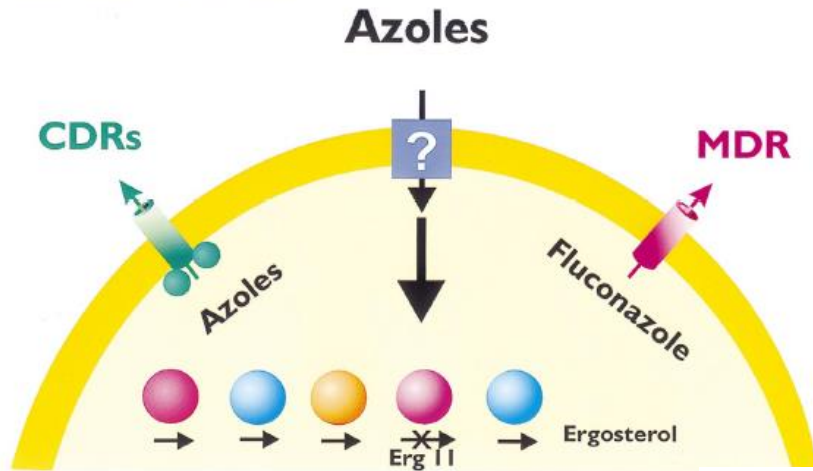


Aumento da expressão da C14- α - lanosterol demetilase

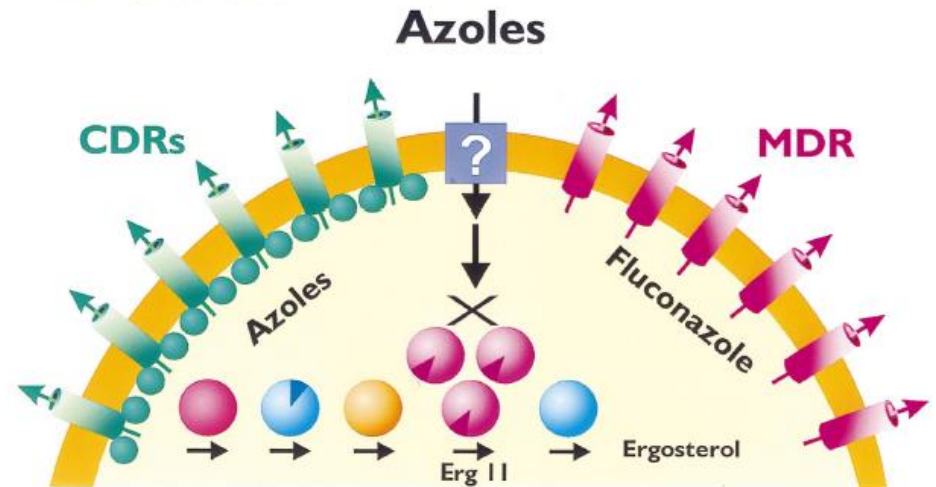


Aumento de bombas de eflujo

SUSCEPTIBLE

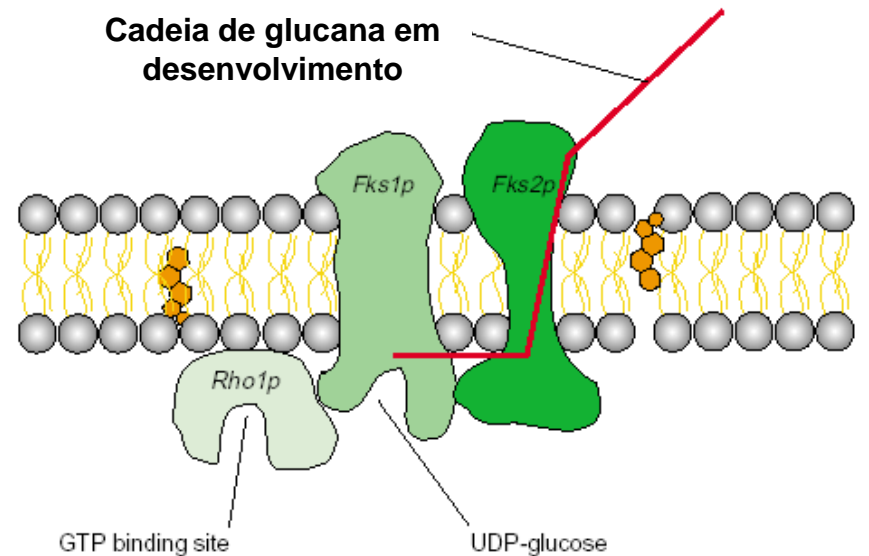


RESISTANT



Resistência às equinocandinas

- Raros casos de resistência
- Mecanismos:
 - Mutação no gene FKS1 (β 1,3 glucana sintetase)
 - Bomba de efluxo CDR1 e CDR2 (Ex. *C. glabrata*)



Resistência e sensibilidade aos antifúngicos

- **Resistência:** capacidade do micro-organismo em crescer em concentrações plasmáticas da droga.
- **Sensibilidade:** quando não crescem nessas concentrações.
- **CIM:** menor concentração do antifúngico necessária para inibir o crescimento fúngico ($\mu\text{g/mL}$)
- **CFM:** menor concentração do antifúngico necessária para matar o fungo ($\mu\text{g/mL}$)
 - Fungicida x Fungistático

Como saber se um microrganismo é resistente ou sensível a uma droga?

M27-A3
Vol. 28 No. 14
Replaces M27-A2
Vol. 22 No. 15

Reference Method for Broth Dilution
Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts;
Approved Standard—Third Edition

This document addresses the selection and preparation of antifungal agents; implementation and interpretation of test procedures; and quality control requirements for susceptibility testing of yeasts that cause invasive fungal infections.

A standard for global application developed through the Clinical and Laboratory Standards Institute consensus process.



Comitês

- Organizações internacionais, interdisciplinares e educacionais que promovem o desenvolvimento e a ampla utilização de normas e procedimentos laboratoriais padronizados.

1. Padronização das técnicas
2. Critérios para interpretação dos resultados
3. Parâmetros para o controle qualidade

- **CLSI** (Clinical Laboratory Standard Institute) - Americano
 - Método Microdiluição em caldo= M27-A3 (2008) e M27-S4 (2012) (**LEVEDURA**), M38-A2 (2008) (**FILAMENTOSO**)
 - Método de Difusão em ágar = M44-A2 (2004) e M44-S3 (2009) (**LEVEDURA**), e M51-A (2010) e M51-S1 (2010)
- **EUCAST** (European Commitee on Antibiotic Susceptibility Testing) - Europeu
 - Método Microdiluição em caldo
 - Lass-Ford et al. Mycoses, 53:1-11, 2010.
 - EUCAST. Clin Microbiol Infect, 14: 398-405, 2008.
 - EUCAST. Clin Microbiol Infect, 14: 982-984, 2008

OUTRAS NORMAS

Canadian

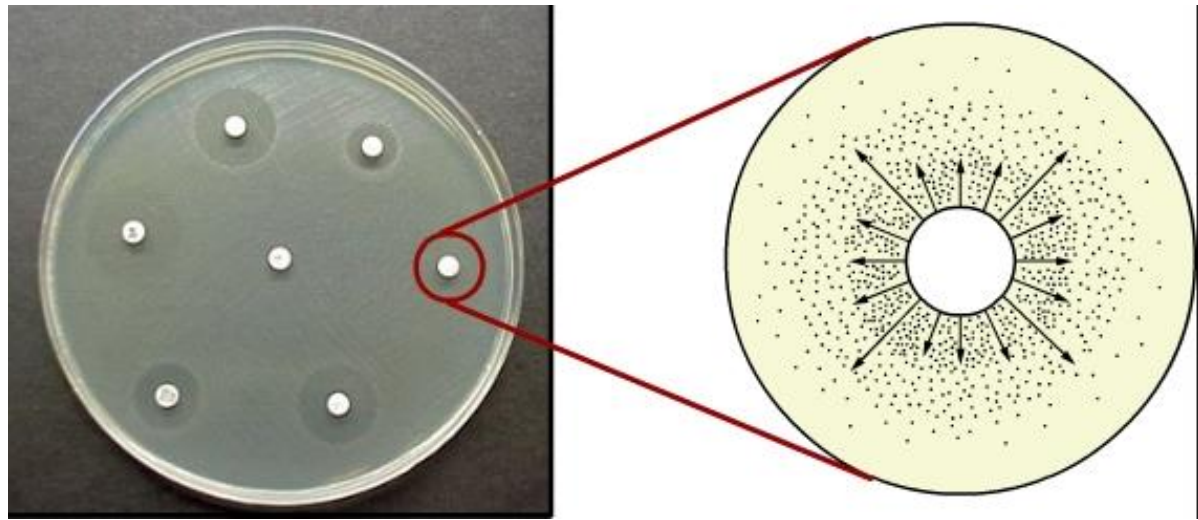
Chinese

Entre outras

- Testes de susceptibilidade “in vitro”
 - Método da difusão em ágar
 - Método de diluição em caldo
 - Macrodiluição
 - Microdiluição
 - Metodologia do E teste
 - Métodos automatizados

Difusão em ágar

1. Suspensão fúngica: $1-5 \times 10^6$ UFC/mL
2. Ágar Muller-Hinton
3. Ex. Discos de papel impregnados com antifúngicos:
Fluconazol – 40 μ g



E teste[®] - bioMérieux

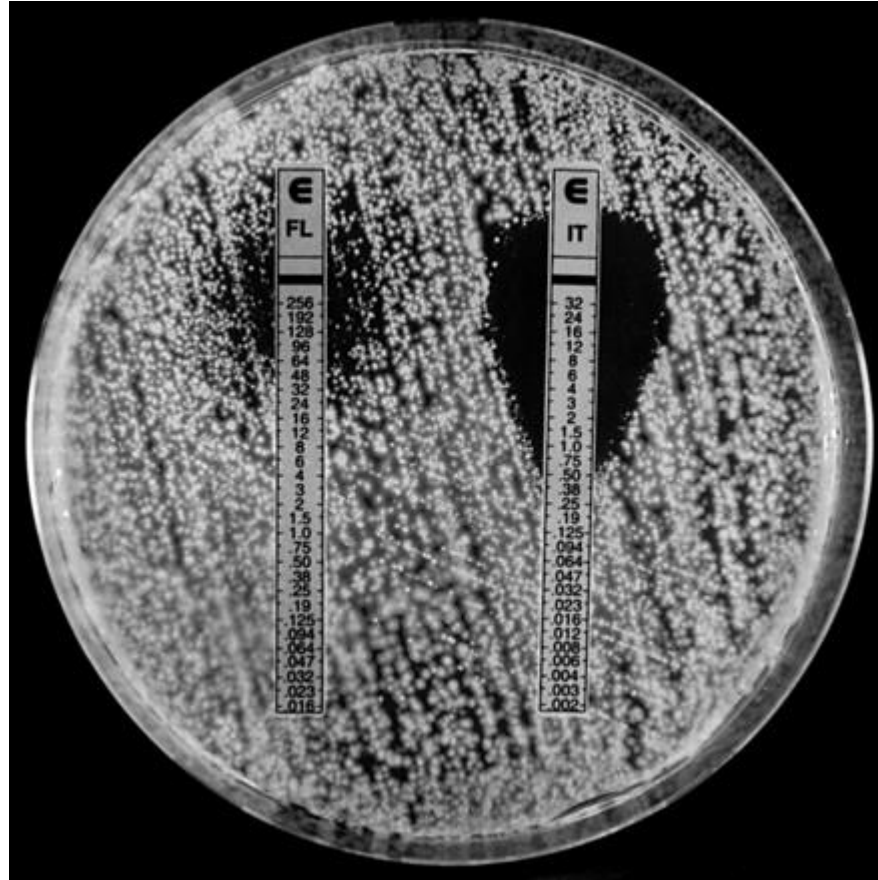
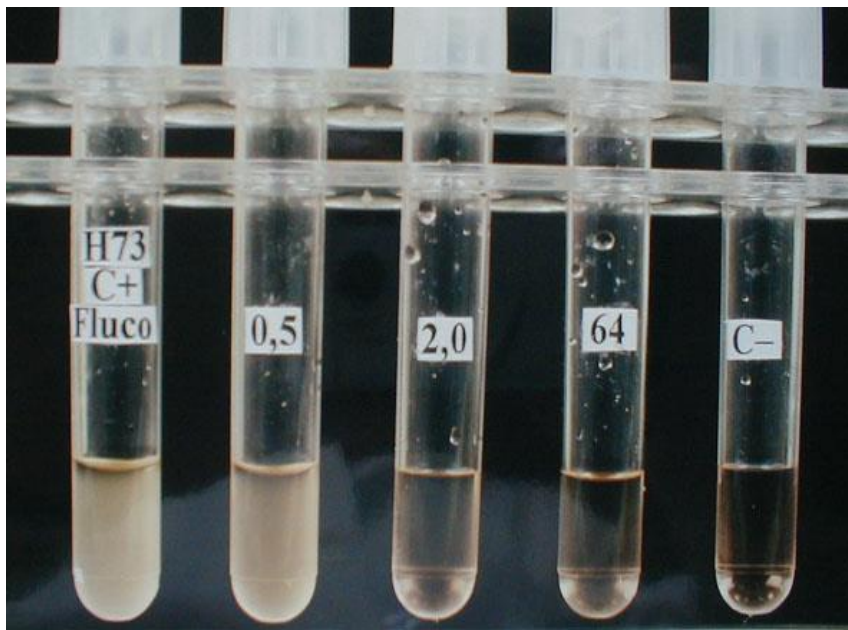


Figure 1

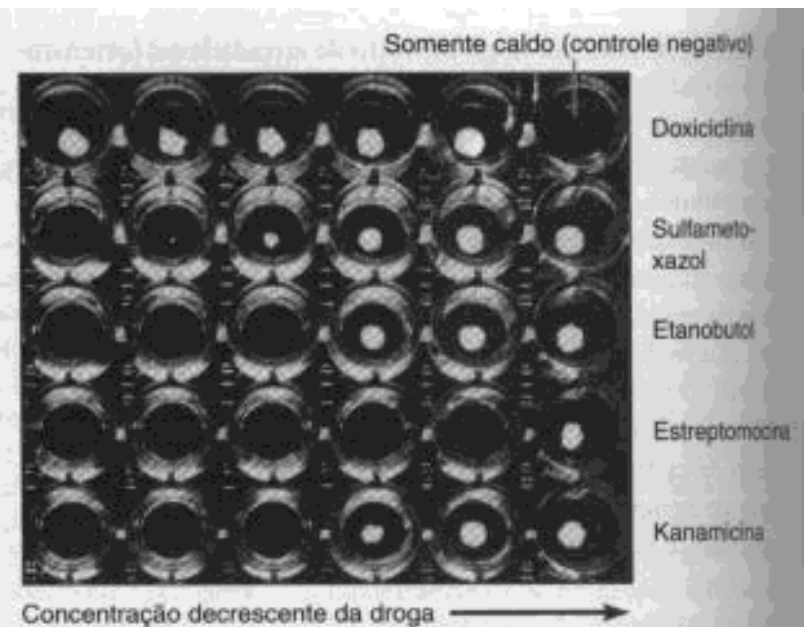
Fluconazole (FL): change of morphology at endpoint. MIC, 48 mg/litre;
itraconazole (IT): sharp end point. MIC, 0.5 mg/litre.

Diluição em caldo

- Técnica de diluição em caldo
 - Leveduras - documento M27-S4 (CLSI, 2012)
 - Filamentoso – documento M38-A2 (CLSI, 2008)
 - CIM – inibição do crescimento fúngico



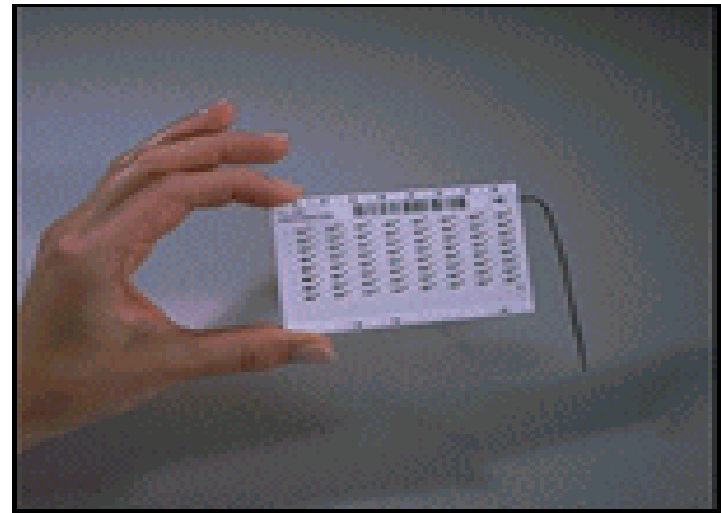
Macrodiluição



Microdiluição

Automação

Identificação e testes de susceptibilidade e resistência



Vitek 2 bioMérieux

- Sensititre YeastOne (TREK Diagnostic Systems)



Referências

Livros

Trabulsi. Microbiologia

Sidrim. Micologia médica

Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. Clinical Mycology. 2th ed. Elsevier, 2009.