

# Resistência Bacteriana a Drogas



Cristiane R. Guzzo  
Microbiologia - ICB-USP

São Paulo, 3 de Setembro de 2017

# Resistência a Fármacos

- ▶ É Problema Grave?
  - Principalmente em Hospitais
  - Surgimento de cepas Multiresistentes
- ▶ Como os organismos se tornaram resistentes ?
- ▶ Como eles transferem a sua resistência a outros organismos?

# Agentes Antimicrobianos por Agentes Químicos

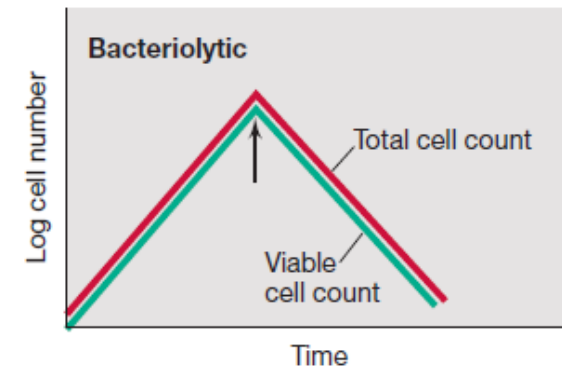
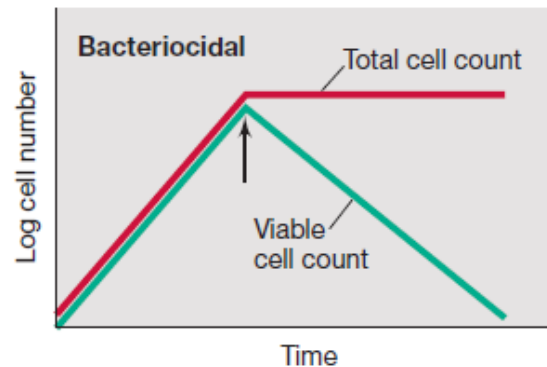
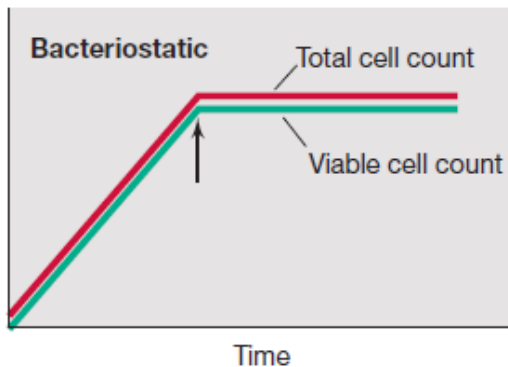
Compostos Químicos

Naturais

Semi-sintéticos

Sintéticos

Seletivos ou não seletivos – **Toxicidade Seletiva**



# Agentes Antimicrobianos

Antimicrobianos Patogênicos



Uso Externo

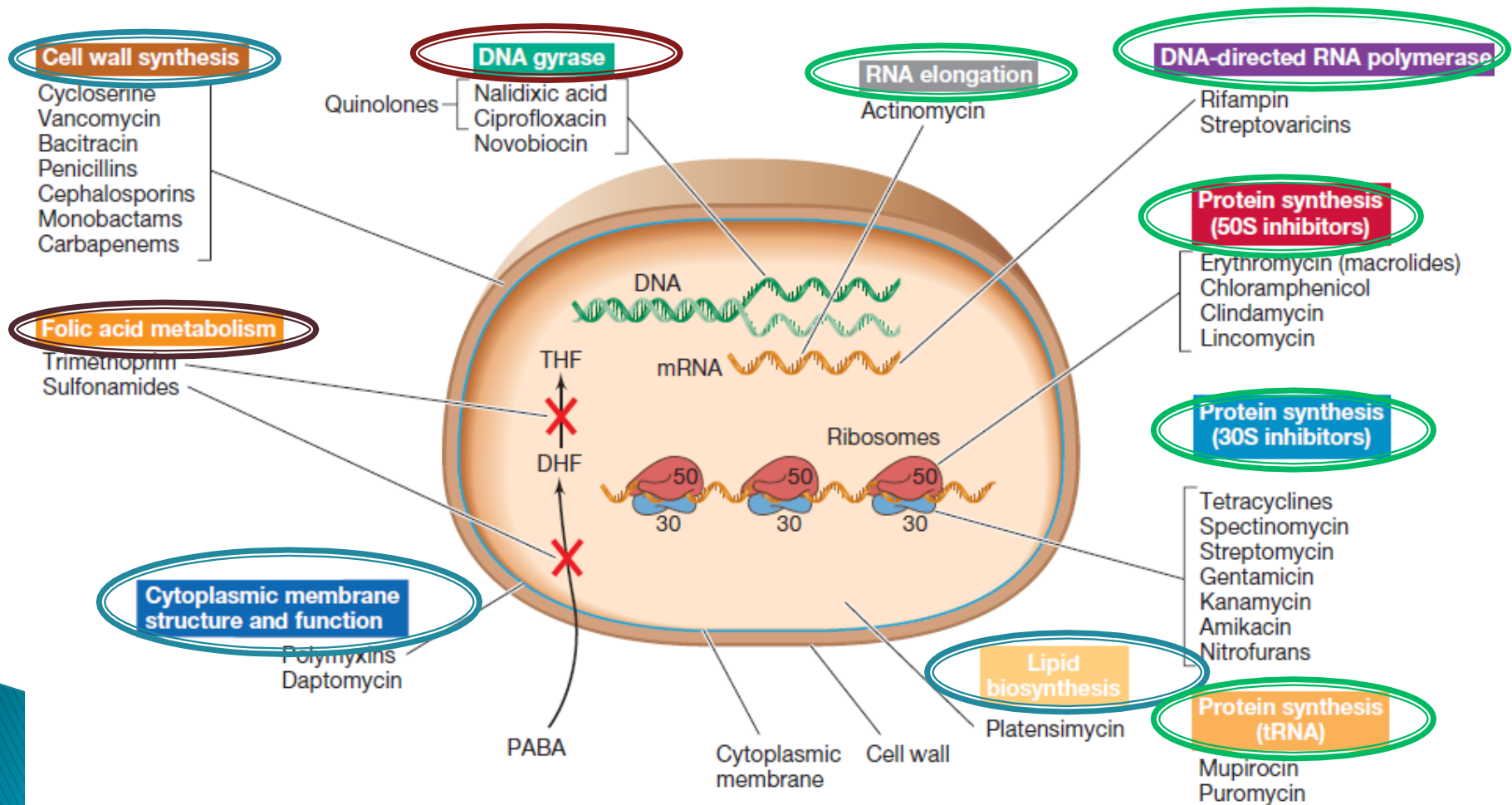
- Esterilizantes
- Desinfetantes
- Sanitizantes
- Antissépticos

**Usado *in vivo***

***-controle de doenças infecciosas***

- Antibióticos

# Relembrar, como os Antibióticos Funcionam em Organismos Procarióticos?



# Resistência era Esperada?

## Inactivation of Antibiotics and the Dissemination of Resistance Genes

Julian Davies 1994

When antibiotics were first introduced in the 1950s for the treatment of common microbial infections, the bacterial geneticists of the day suggested that the development of antibiotic resistance during therapy was unlikely because the frequency of mutation to resistance in bacteria was too low.

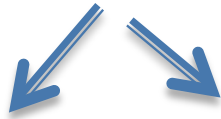
In 1940, several years before the introduction of penicillin into clinical practice, Abraham and Chain (1) identified a bacterial enzyme that catalyzed the hydrolysis of the  $\beta$ -lactam ring of the antibiotic and eliminated its antibacterial activity, and

Enterobacteriaceae such as *Escherichia coli* or *Salmonella typhimurium*, and although spontaneous mutants resistant to streptomycin (the most studied antibiotic at the time) could be isolated, they were found to occur at frequencies of  $10^{-9}$  or less per bacterial generation. Under these circumstances the development of antibiotic-resistant strains during therapy was unlikely to be a serious clinical problem. These studies

be a serious clinical problem. These studies could not have anticipated the wide variety of resistance mechanisms nor the possibility that genes encoding resistance to antibiotics would be carried by autonomously replicating transferable elements called resistance plasmids (R plasmids).

# Resistência

- ▶ Capacidade adquirida de resistir aos efeitos de um agente quimioterápico, normalmente é sensível
- ▶ Como eles adquiriram:
  - Desenvolver mecanismos para se proteger do próprio antibiótico que ele sintetizou:



- Neutralizar      Destruir
- Esta pode ter sido a origem de genes codificadores de resistência a antibióticos
- Esses genes podem ser disseminados (transferência horizontal)
- Adquirir por transferência horizontal de outro organismo

# Mecanismos de Resistência

## Existem 6 Mecanismos Principais de Resistências

### *1. Naturalmente resistentes*

- Organismos desprovidos da estrutura inibida pelo antibiótico
  - Micoplasmas (desprovidos de parede celular) – resistente a penicilina

### *2. Antibiótico é Impermeável*

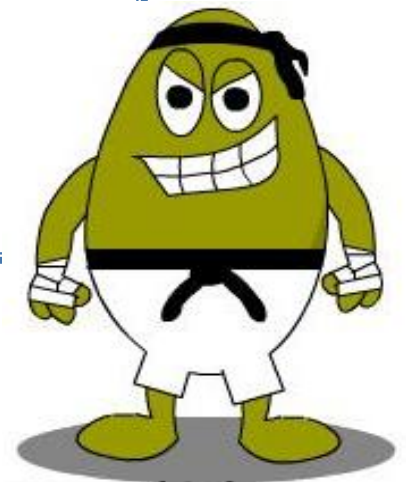
- A maioria das bactérias G- são impermeáveis à penicilina G e à platensimicina



## 2 . Alteração na permeabilidade de membrana



**$\beta$ -lactâmicos**  
**Aminoglicosídeos**  
**Quinolonas**

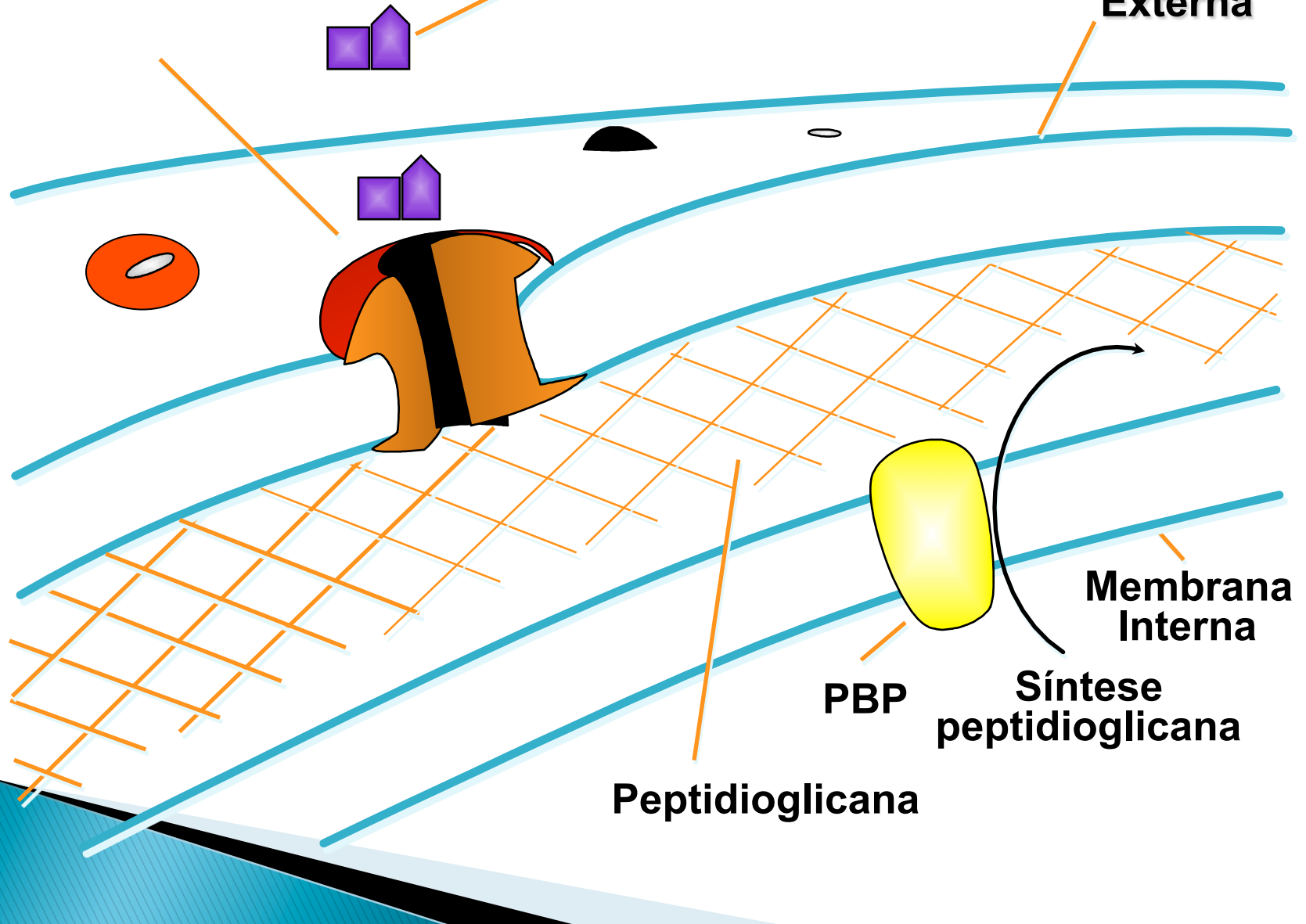


# Resistência Mediada por Alteração de Permeabilidade

Porina alterada

$\beta$ -lactâmico

Membrana Externa



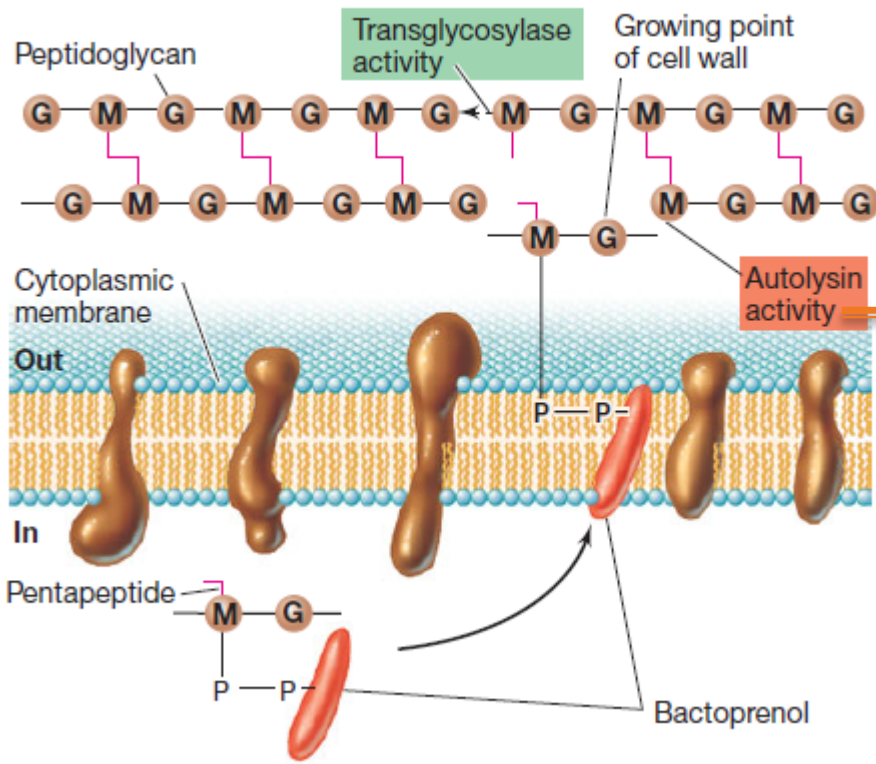
PBP

Peptidioglicana

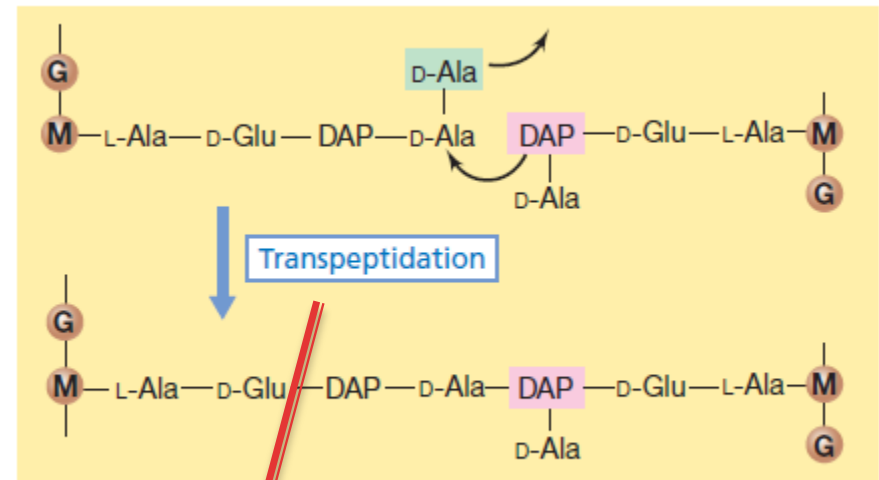
Membrana Interna

Síntese peptidioglicana

# Penicilina inibe a Síntese da Parede Celular



PBP-Antibiótico estimula a Autolisina- cliva as ligações glicosídicas

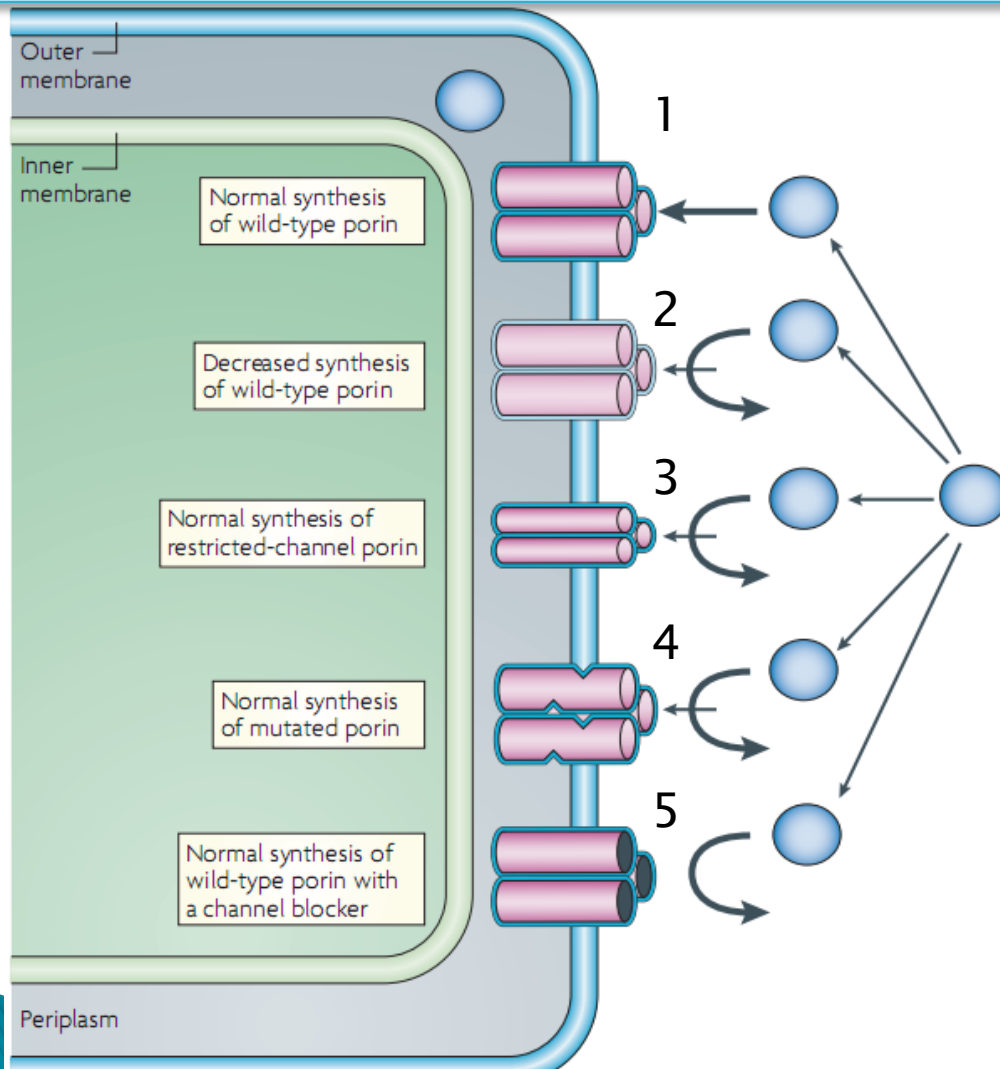


(b)

Ligação cruzada final entre duas cadeias de peptidoglicano  
Confere rigidez a parede celular  
Enfraquece a parede e ocasiona o rompimento

G- N-acetilglicosamina  
M- ácido N-acilmurâmico

# 2 . Alteração na permeabilidade de membrana



**Diminuição da expressão de OmpF leva a resistência a:**

quinolonas

tetraciclinas

clorafenicol

$\beta$ -

lactâmicos

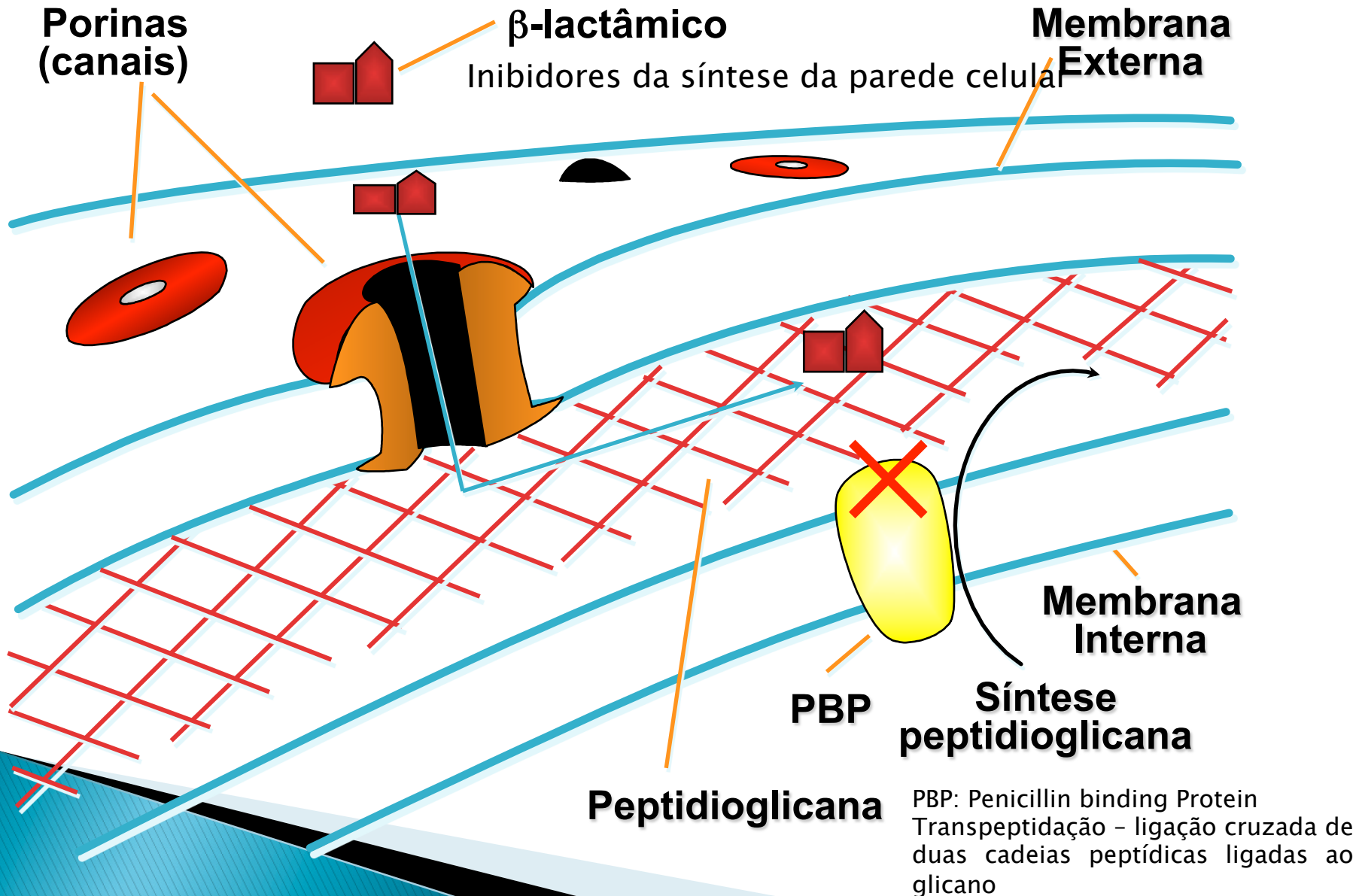
OmpF – proteína de transporte passivo localizado na membrana externa  
Transporte de pequenas moléculas (600–700 Da)

# Mecanismos de Resistência

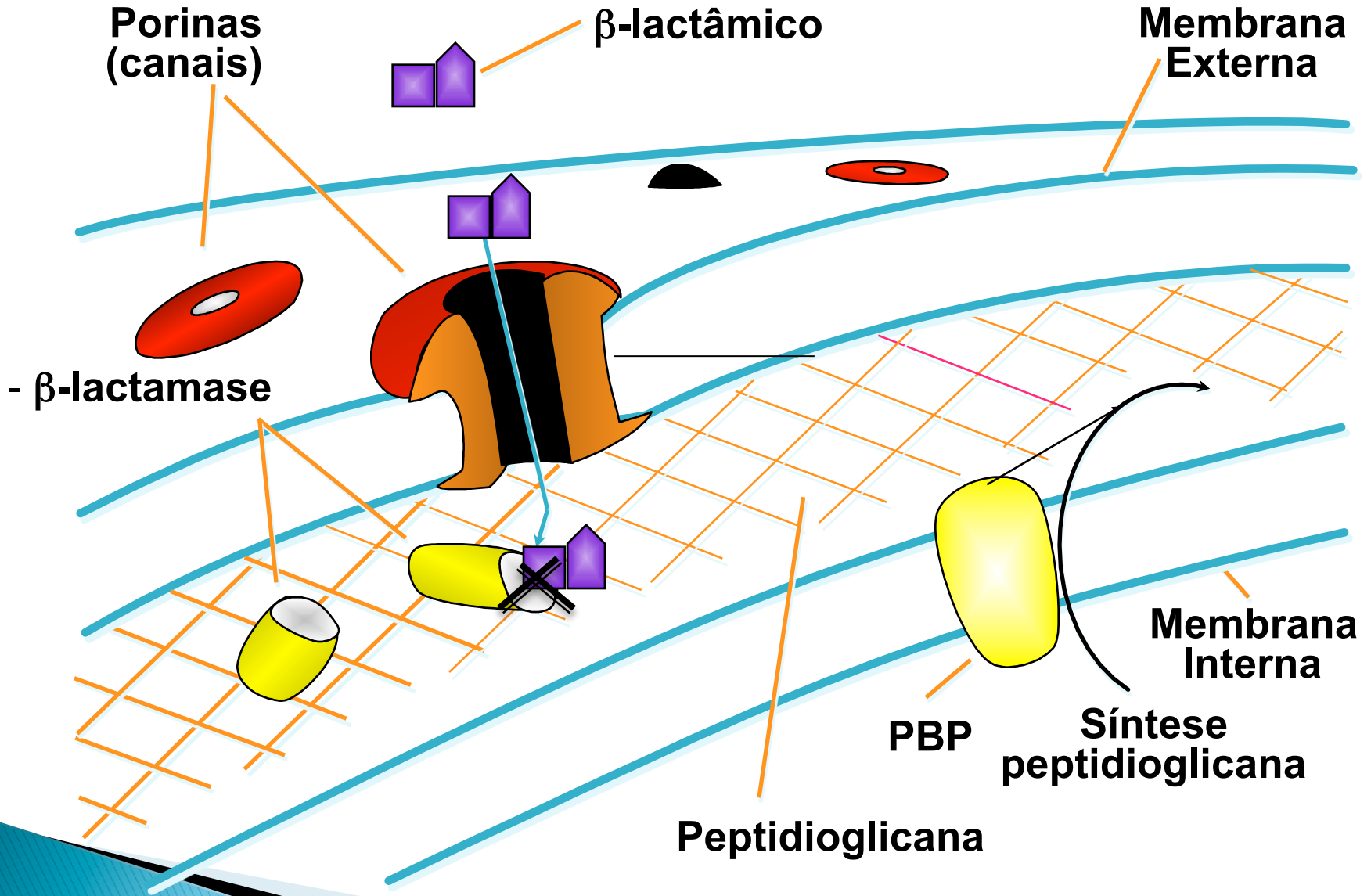
## *3. Modifica o Antibiótico para uma forma Inativa*

- Vários estafilococos contêm  $\beta$ -lactamases, enzima que cliva o anel  $\beta$ -lactâmico da maioria das penicilinas

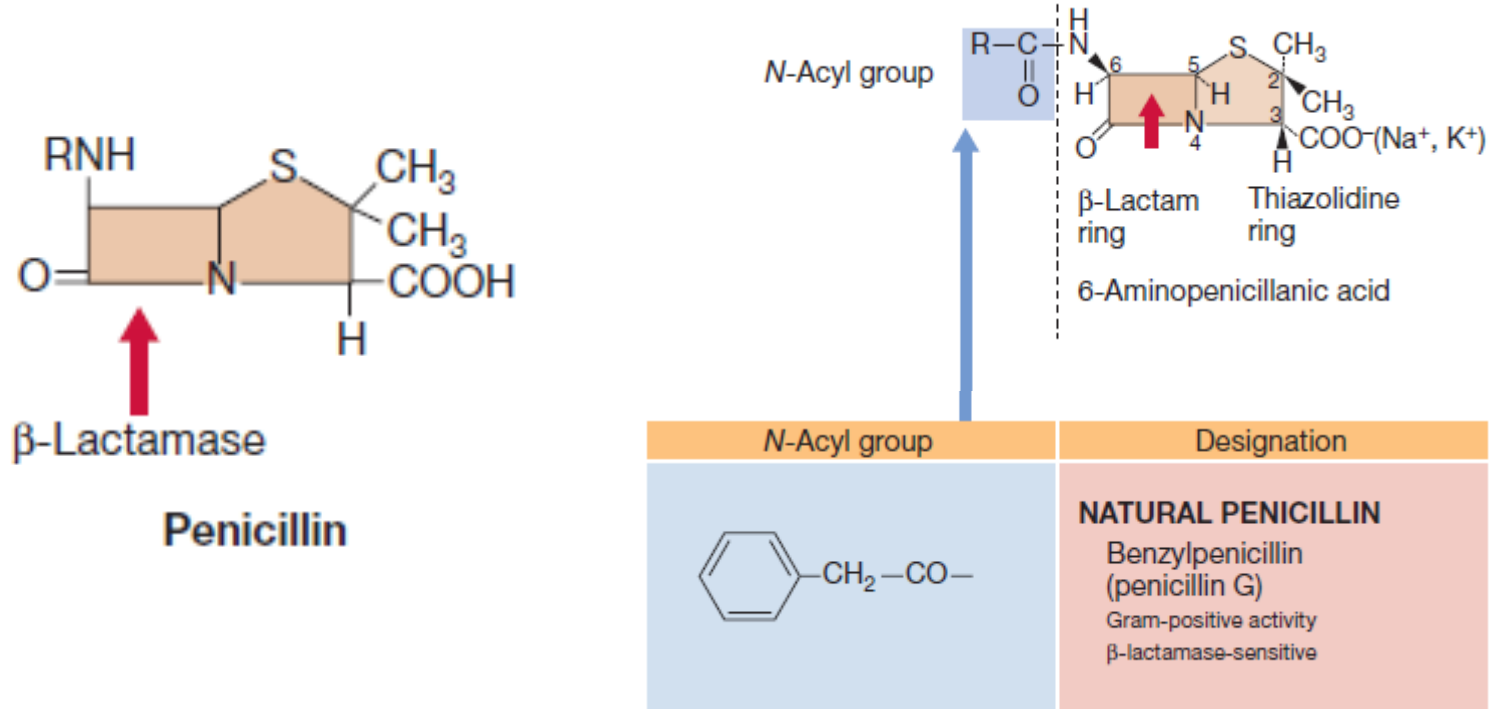
### 3. Resistência Mediada por Alteração no Fármaco



# a. Resistência mediada por $\beta$ -lactamases



# Penicilina Inibe a Síntese da Parede Celular





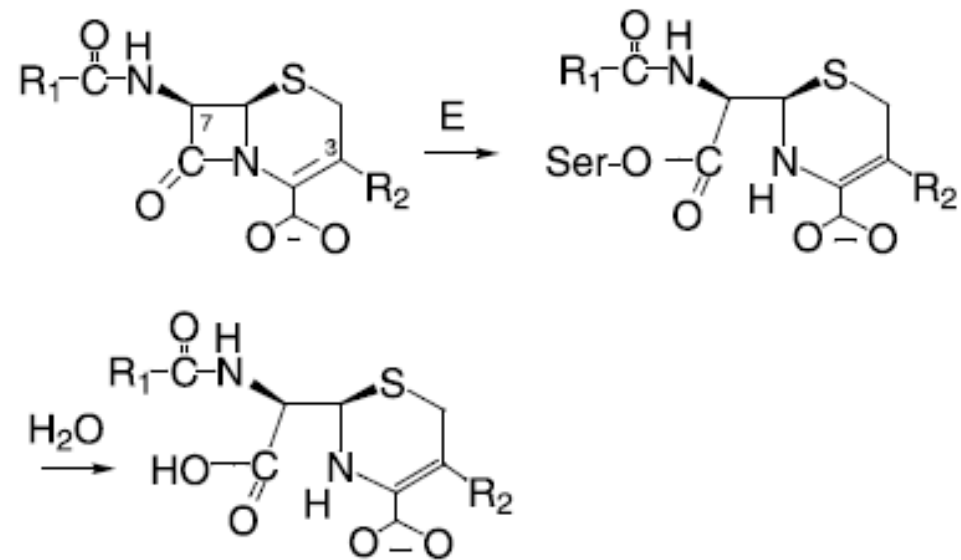
# Ultrahigh Resolution Structure of a Class A $\beta$ -Lactamase: On the Mechanism and Specificity of the Extended-spectrum SHV-2 Enzyme

*J. Mol. Biol.* (2003) 328, 289–301

Michiyoshi Nukaga<sup>1</sup>, Kayoko Mayama<sup>1</sup>, Andrea M. Hujer<sup>2</sup>  
Robert A. Bonomo<sup>2</sup> and James R. Knox<sup>1\*</sup>

cephalosporins.<sup>1–4</sup> The enzymes are grouped into four classes (A to D) on the basis of amino acid sequences.<sup>5</sup> All  $\beta$ -lactamases except the zinc-containing class B enzymes are serine-reactive hydrolases that act *via* an acyl intermediate:

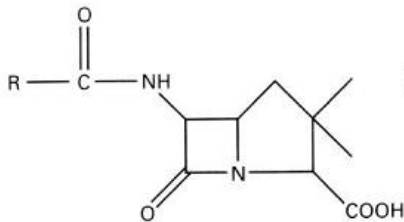
The clinically prevalent SHV-1 and TEM-1 enzymes are class A  $\beta$ -lactamases from which 43 and 115 variants, respectively, have appeared<sup>†</sup>.<sup>8,9</sup>



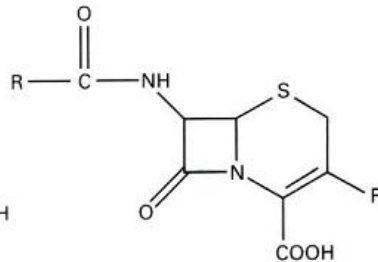
# Resistência Mediada por Enzimas Inativadoras

## $\beta$ -lactâmicos

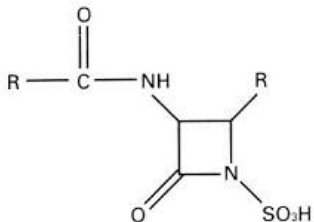
Penicilinas



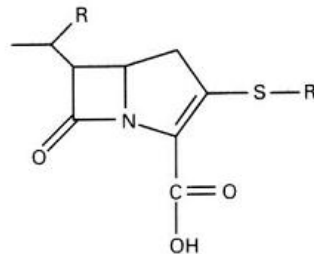
Cefalosporinas



Monobactams



Carbapenems



R = cadeia lateral

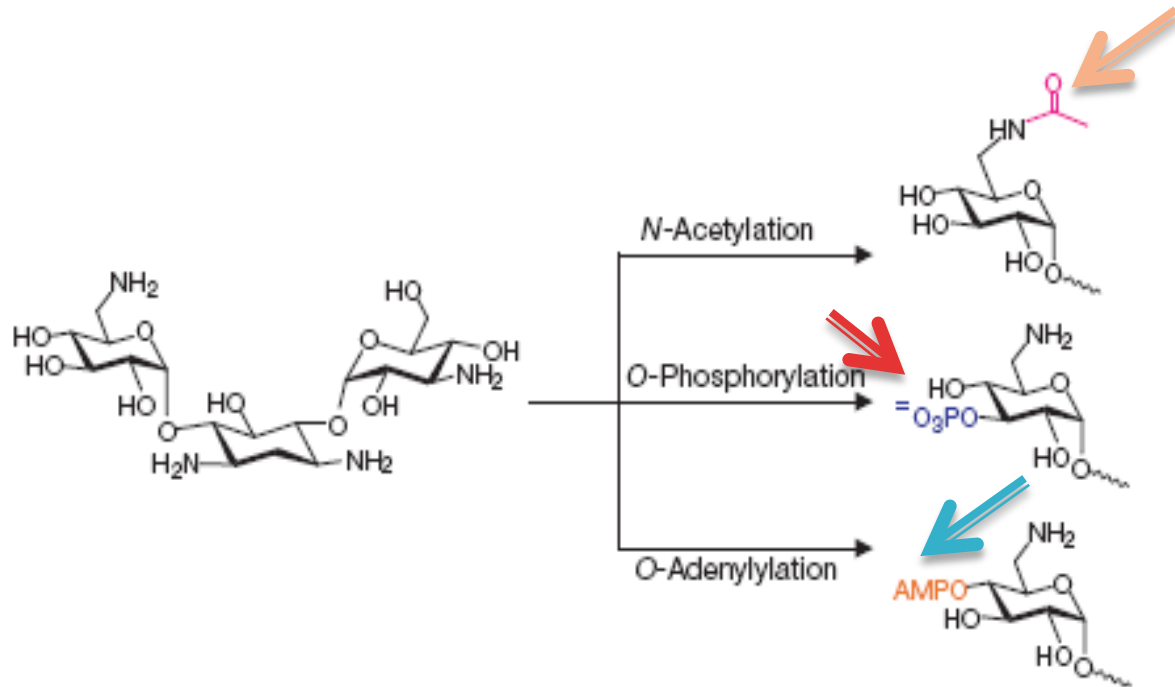
## $\beta$ -lactamases

- Classe A ou grupo II: hidrolisam penicilinas e cefalosporinas
- Classe B ou grupo III: hidrolisam carbapenêmicos
- Classe C ou grupo I: hidrolisam cefalosporinas
- Classe D: hidrolisam penicilinas e cloxacilina
- Grupo IV: hidrolisam penicilina

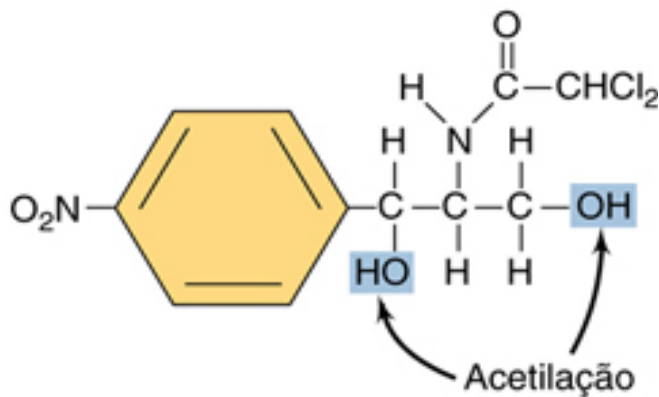
**IMPORTANTE:**  $\beta$ -lactamases de amplo espectro ou espectro estendido (ESBL - Extended Spectrum  $\beta$ -lactamases) – hidrolizar penicilinas, cefalosporina de amplo espectro e monobactams

# b. Resistência Mediada por Enzimas Inativadoras

Aminoglicosídeos



Clorafenicol

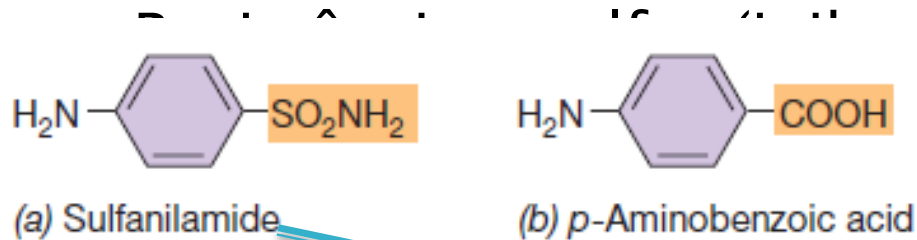


# Mecanismos de Resistência

## 4. *Modificar o alvo do antibiótico*

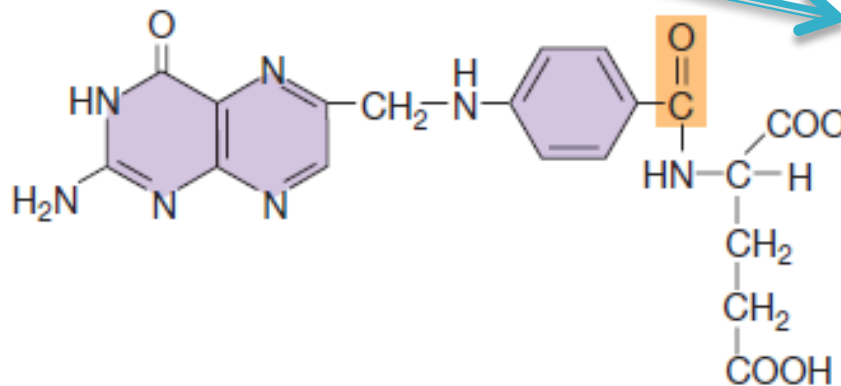
- Mutações no sítio de interação ao fármaco
  - ex. subunidade beta da RNA polimerase que é inibida pela rifampicina

## 5. *Desenvolve uma via bioquímica resistente*



intese de ácido fólico

conseguem captar o



(c) Folic acid Fator de crescimento

Os primeiros análogos de fatores de crescimento, amplamente utilizado para inibir o crescimento bacteriano

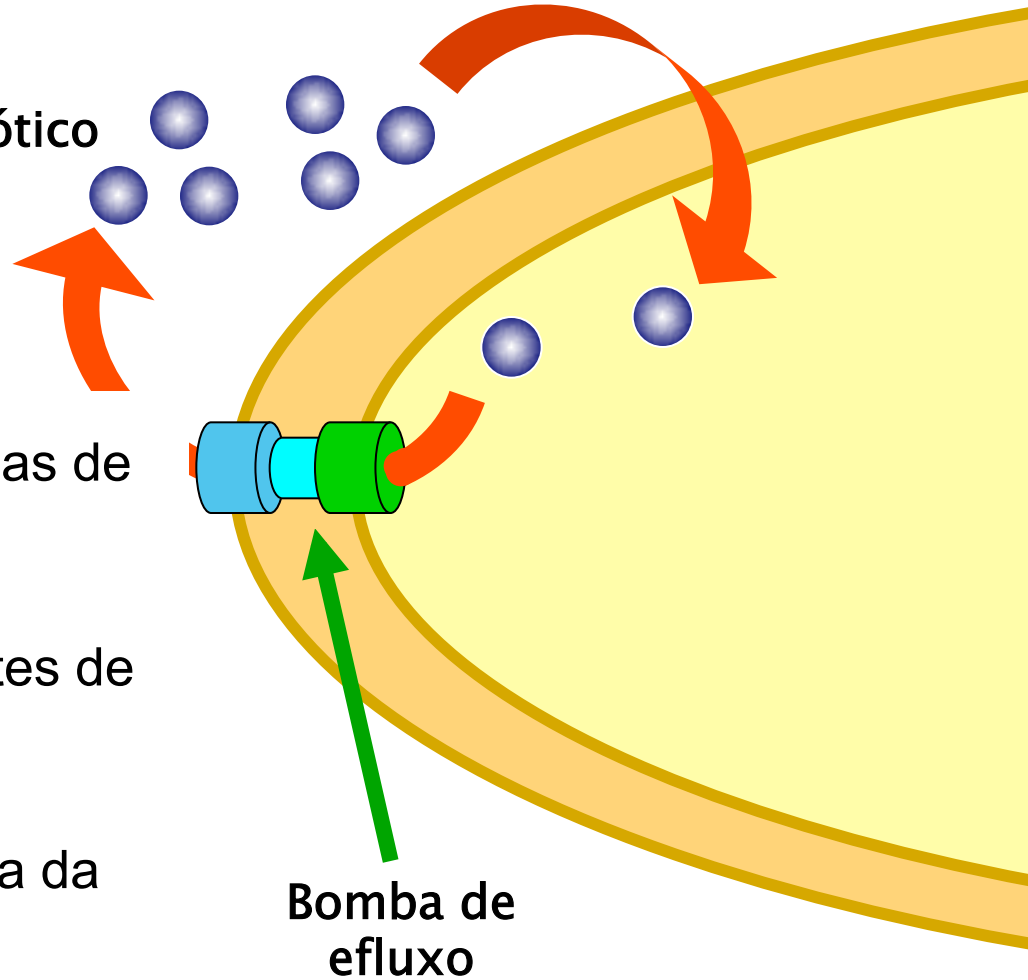
A sulfa mais simples  
É análogo do ác. *p*-aminobenzoico,  
é um pre-cursor do ác. fólico,  
inibindo a síntese de ácidos  
nucléicos

# Mecanismos de Resistência

6. Bombear para fora o antibiótico (efluxo)

# Mecanismo de Resistência por Sistema de Efluxo

Antibiótico



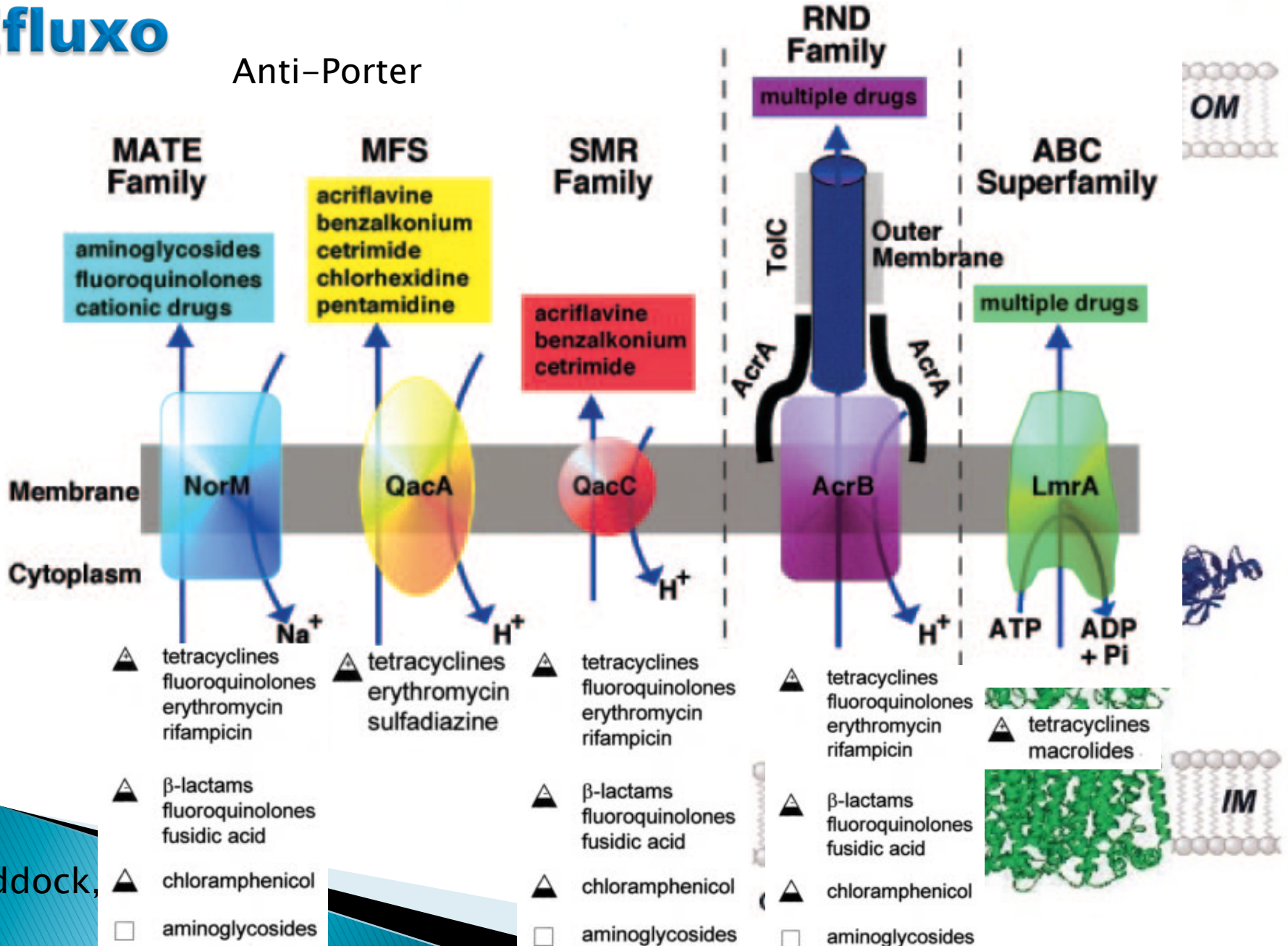
Bomba de efluxo

- Aumento da síntese destas bombas de efluxo
- Sistemas de múltiplos componentes de membrana;
- Transporte de substratos para fora da célula;
- Transporte ativo;

Ex: Transportadores do tipo ABC.

# Ilustração de 5 Famílias de Bomba de Efluxo

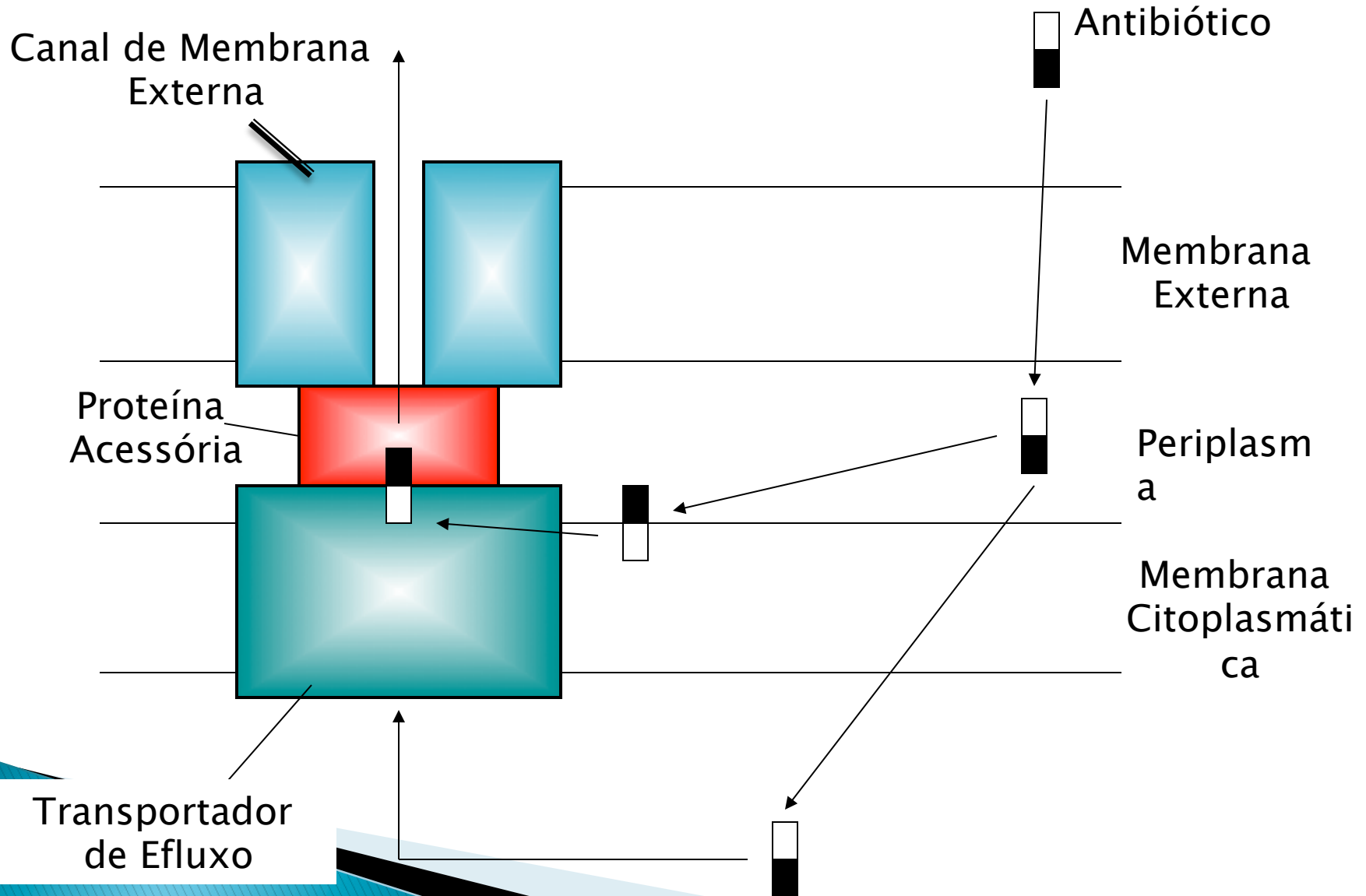
Anti-Porter



l  
po  
op  
wit  
mo  
α-t  
pa  
orc  
Ac  
pri  
Ko

(Piddock,

# Mecanismo de Resistência Baseado no Efluxo da Família RND

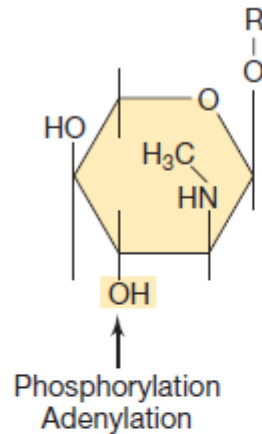




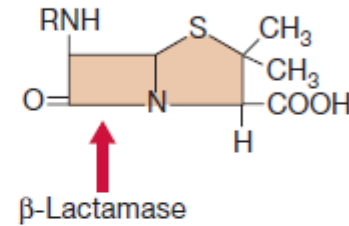
# Exemplos de resistência bacterianas aos antibióticos

**Table 26.8** Bacterial resistance to antibiotics

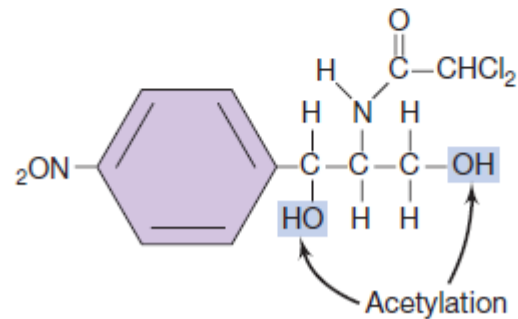
| Resistance mechanism | Antibiotic class |
|----------------------|------------------|
| Reduced permeability | Penicillins      |



Streptomycin



Penicillin



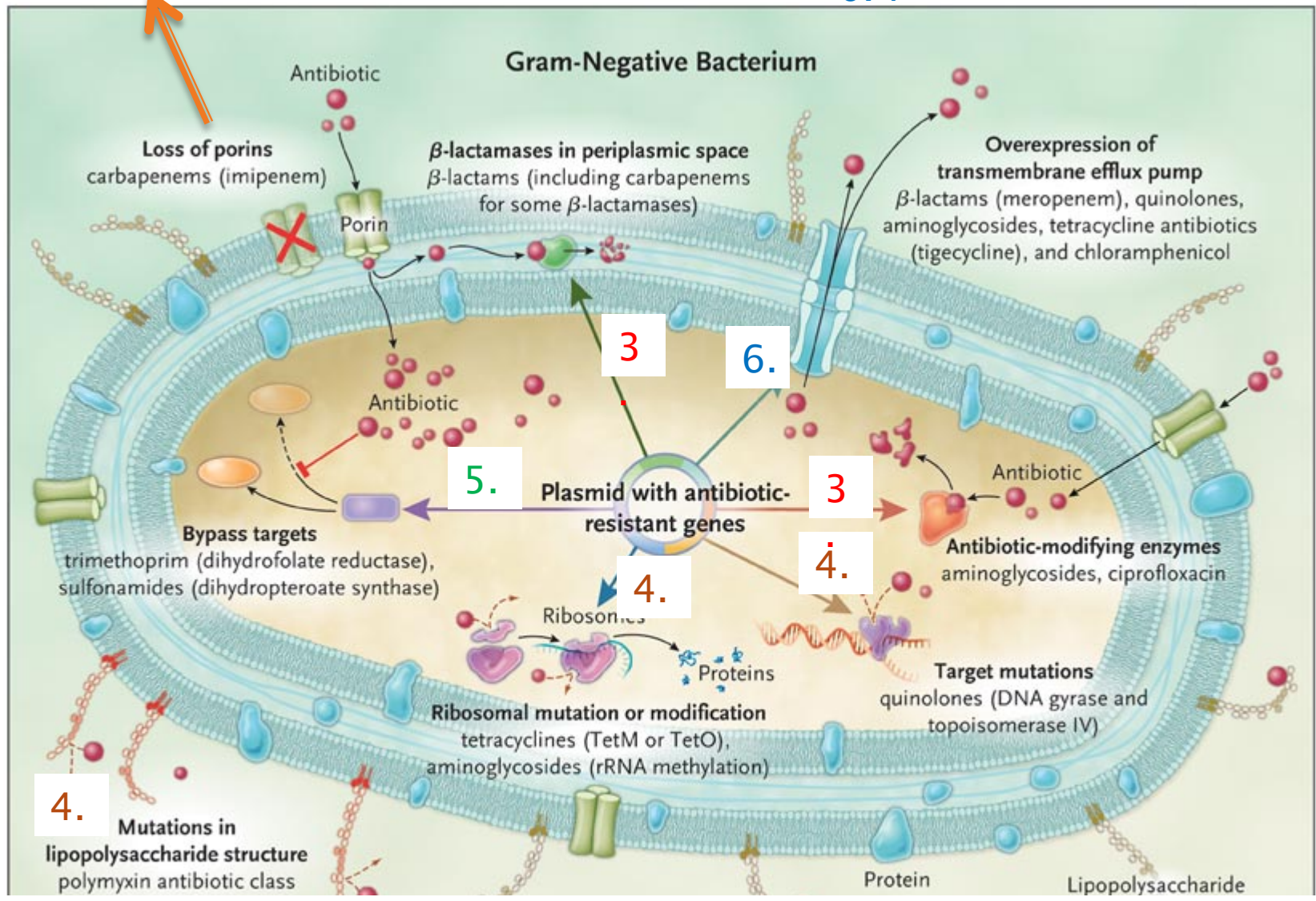
Chloramphenicol

Present in:  
*Pseudomonas aeruginosa*

# Resumo

- 3. ?
- 4. ?
- 5. ?
- 6. ?

2. ?



Bind to the cell membrane and alter its structure, more permeable – cell death

# Origem da Resistência a Antibióticos

# Aspectos Relacionados à Resistência aos Antibióticos em Bactérias

## ★ Origem da Resistência

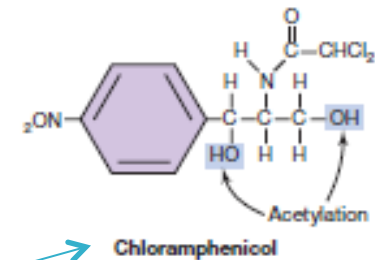
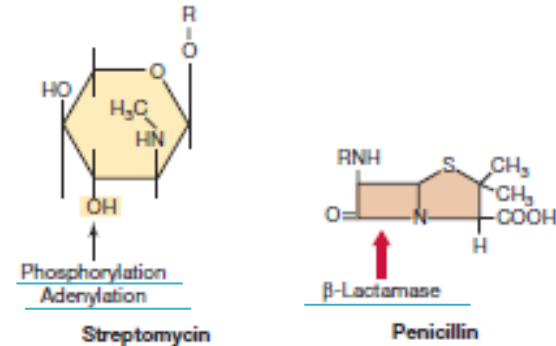
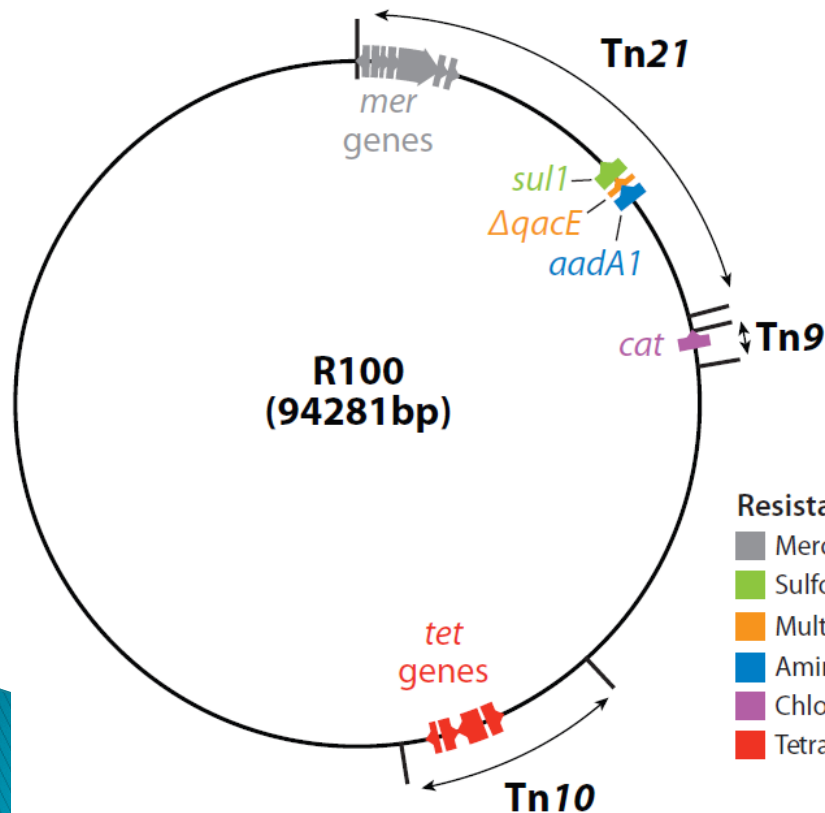
- ◆ resistência cromossomal
- ◆ resistência plasmideal

## ★ Mecanismos de transmissão

- ◆ transmissão vertical
- ◆ transmissão horizontal

# Cepas Bacterianas Isoladas a partir de Espécimes Clínicos

- Os genes de resistência estão frequentemente em plasmídeos R e não no cromossomo



Estreptoicina, neomicina, kanamicina, espectinomina  
 -Estruturas similares  
 -Enzima que as fosforilam e as inativam

# Origem dos Plasmídeos de Resistência

- ▶ Já existia o plasmídeo R antes da era dos antibióticos
- ▶ Uma linhagem de *E. coli* congelada e desidratada em 1946 continha um plasmídeo R com resistência a tetraciclina e estreptomicina
- ▶ Estes antibióticos foram usados anos mais tarde
- ▶ Foram identificados genes de resistência a penicilinas em plasmídeos R antes da penicilina ser sintetizada

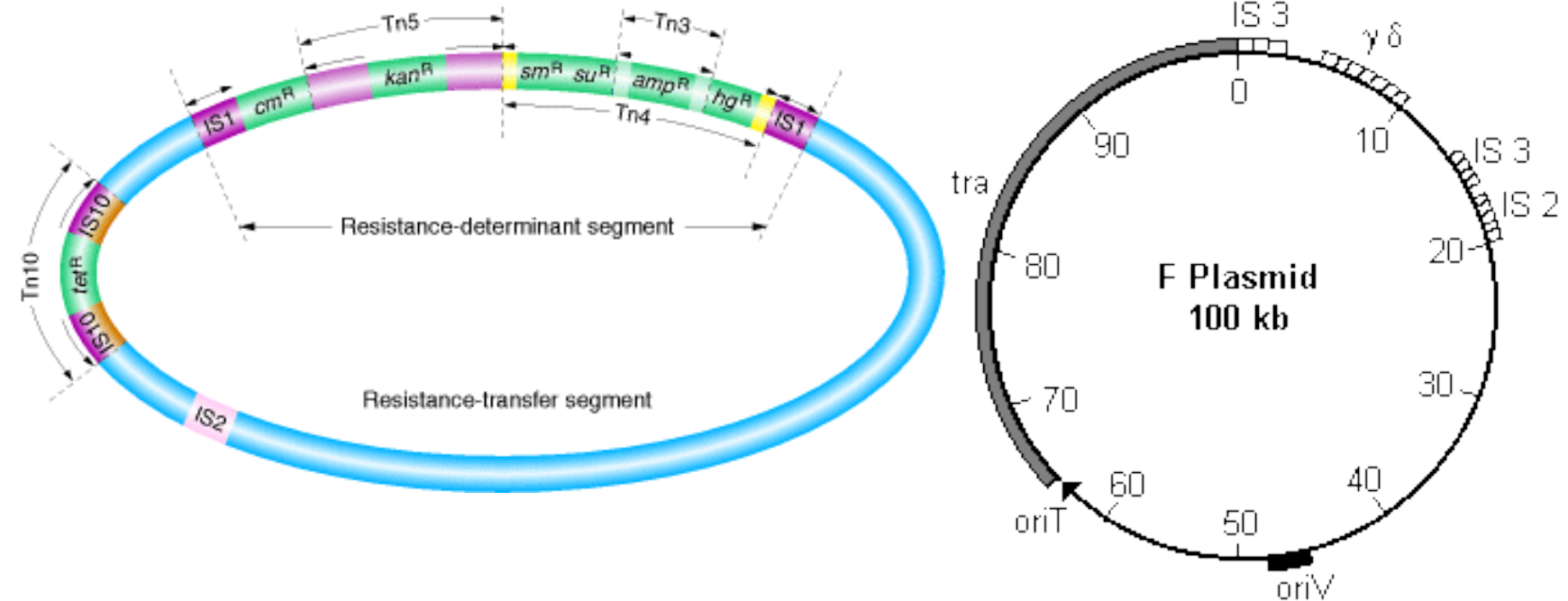
# Origem dos Plasmídeos de Resistência

**Table 3.** Resistance to some clinically useful antibiotics in their producing organisms. In a number of cases, strains have multiple resistance mechanisms for the antibiotic formed (70). *Str. Streptomyces*.

| Producing strain               | Antibiotic      | Resistance gene      | Mechanism   |
|--------------------------------|-----------------|----------------------|---|
| <i>Str. capreolus</i>          | Capreomycin     | <i>cph, cac</i>      | Phosphotransferase, acetyltransferase             |
| <i>Nocardia lactamdurans</i>   | Cephameycin     | —                    | $\beta$ -lactamase (?) <sup>†</sup>               |
| <i>Str. venezuelae</i>         | Chloramphenicol | —                    | Hydrolase <sup>‡</sup>                            |
| <i>Str. erythreus</i>          | Erythromycin    | <i>erm</i>           | Target modification (ribosome)                    |
| <i>Str. fradiae</i>            | Fosfomycin      | <i>fos</i>           | Glutathione adduct (?) <sup>†</sup>               |
| <i>Micromonospora purpurea</i> | Gentamicin      | <i>grm</i>           | Target modification (ribosome)                    |
| <i>Str. kanamyceticus</i>      | Kanamycin       | <i>aac</i>           | N-Acetyltransferase                               |
| <i>Str. antibioticus</i>       | Oleandomycin    | <i>mgt</i>           | Glycosyltransferase                               |
| <i>Str. griseus</i>            | Streptomycin    | <i>aph</i>           | O-Phosphotransferase                              |
| <i>Str. rimosus</i>            | Tetracycline    | <i>otrA, otrB</i>    | Efflux, resistant translation system              |
| <i>Str. tenebrarius</i>        | Tobramycin      | <i>aac, kgm, kam</i> | Acetyltransferase, target modification (ribosome) |
| <i>Str. vinaceus</i>           | Viomycin        | <i>vph</i>           | Phosphotransferase                                |

\*It is noteworthy that the large majority of streptomycetes produce  $\beta$ -lactamases, although they do not (apparently) make  $\beta$ -lactams. <sup>†</sup>Evidence that these are true self-protection mechanisms in the producing organisms is not yet available. <sup>‡</sup>Although the organism producing chloramphenicol does not make chloramphenicol acetyltransferase, a number of non-chloramphenicol-producing streptomycetes are known to make the enzyme.

# Plasmídeos de Resistência

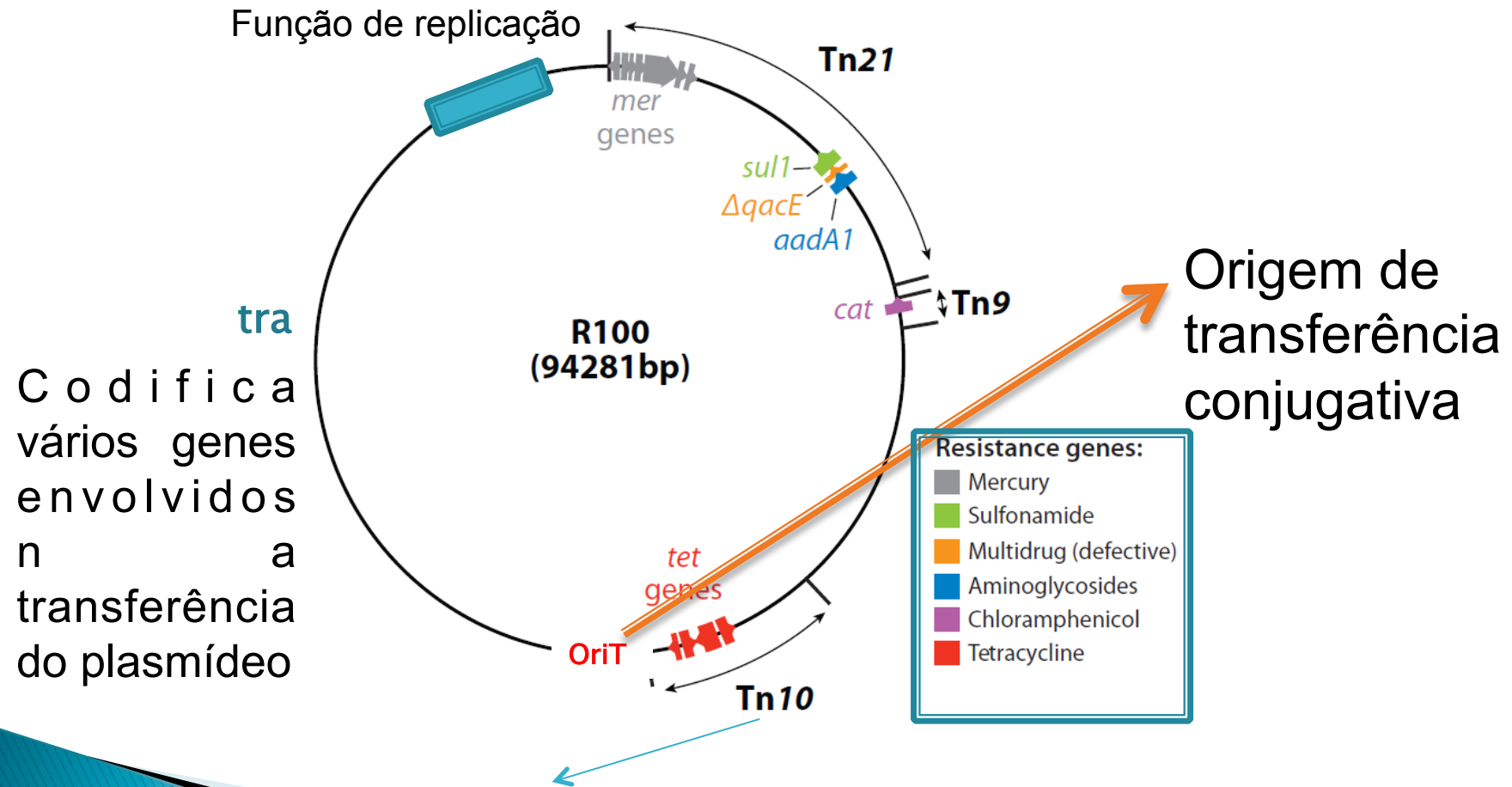


Pergunta:

- Pode um plasmídeo não-conjugativo que carrega genes de resistência a antibióticos ser conjugado à outras bactérias?



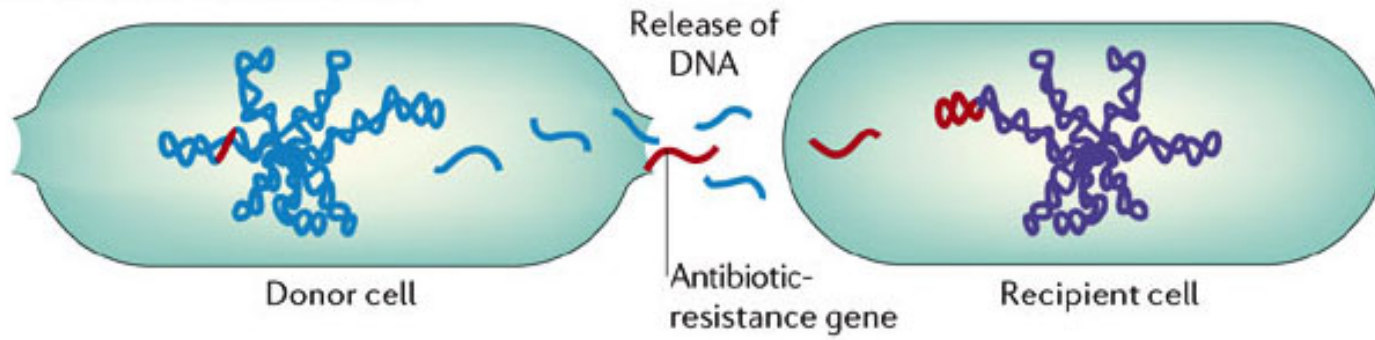
# Plasmídeo de resistência ex. R100



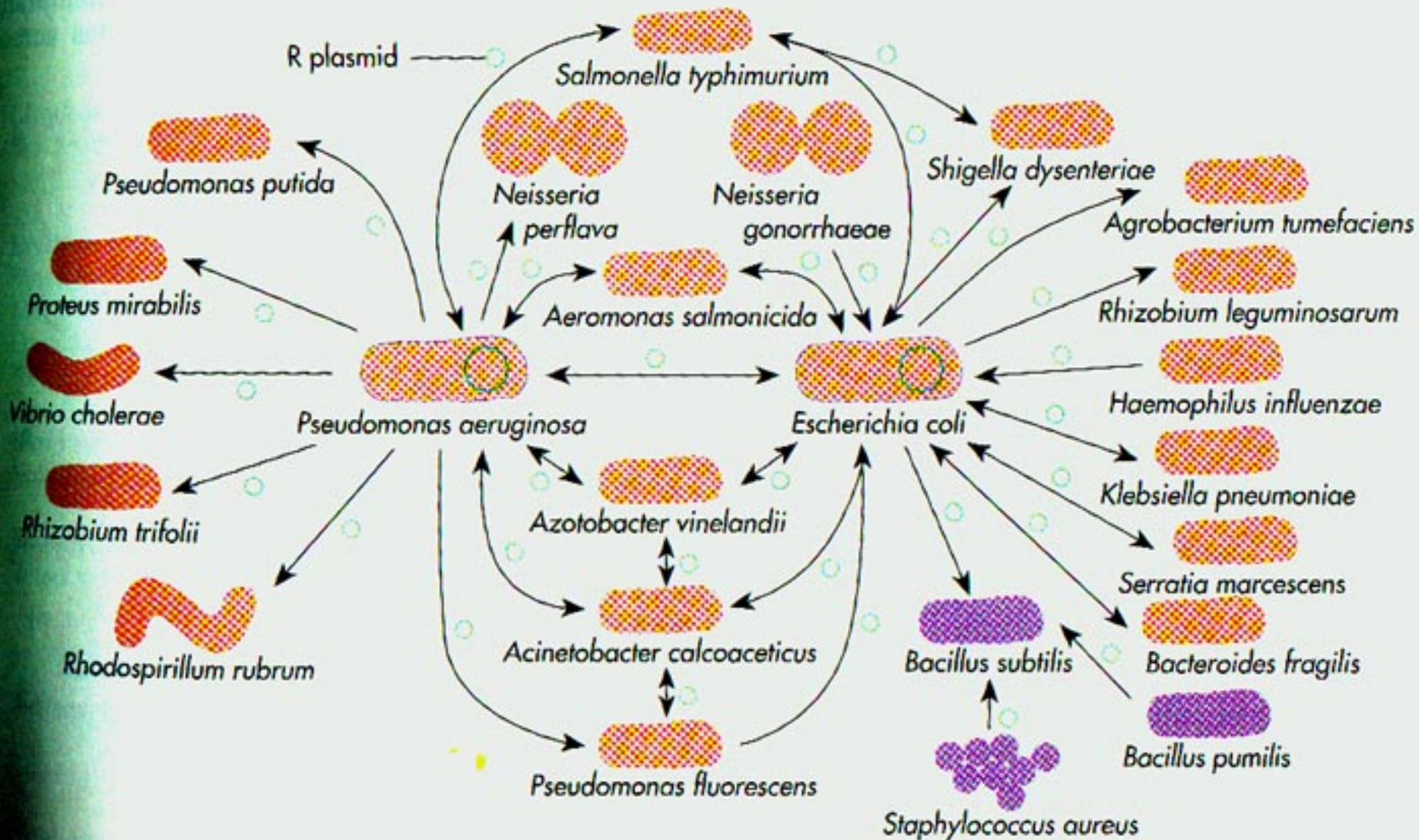
Tet está dentro do transposon *tn10*

# Transmissão Horizontal

## a Bacterial transformation



# Transmissão horizontal da resistência bacteriana



# Testes Clínicos de Cepas Bacterianas isoladas a partir de Espécimes Clínicos

- ▶ Ampla resistência aos antibióticos atuais
- ▶ Contínuo surgimento de novas cepas resistentes
- ▶ Faz dois testes

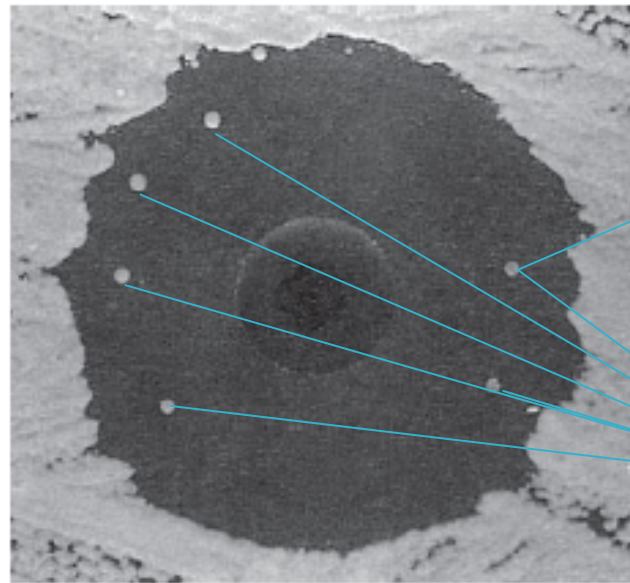


**MIC-**  
Concentração mínima de antibiótico



# Em laboratório – Cepas resistentes podem ser isoladas a partir de linhagens sensíveis

- ▶ Selecciona colônias resistentes
- ▶ Essa resistência é devido a mutações (cromossomo) no alvo do fármaco (ex. Subunidade beta da RNA polimerase)



T. D. Brook

→ Colônias resistentes

→ Tenta identificar a mutação

(a)

# Alguns Fatores que Favorecem a Disseminação dos Plasmídeos R

- ▶ Uso extensivo de antibiótico:
  - Medicina
  - Veterinária
  - Agricultura

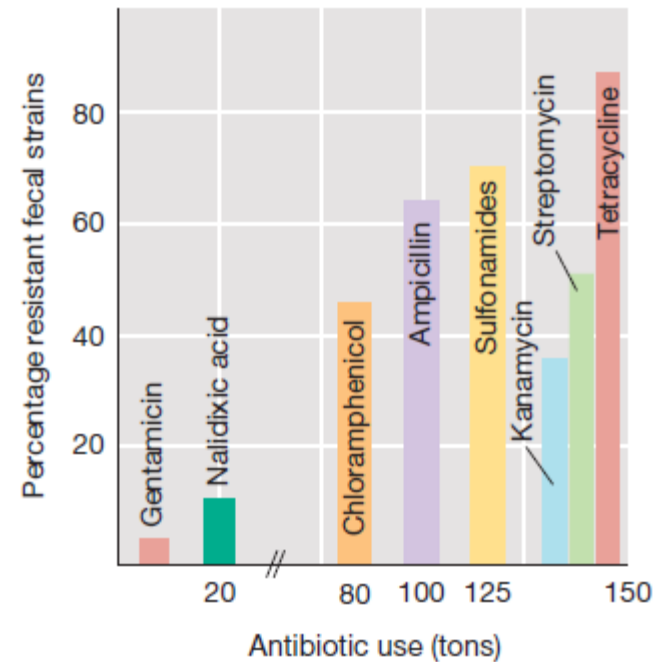
- ▶ Uso inadequado é o principal problema

- Uso excessivo
  - Prática Clínica

20% necessário 80% prescritos

60% não seriam necessários

Pacientes diarreicos



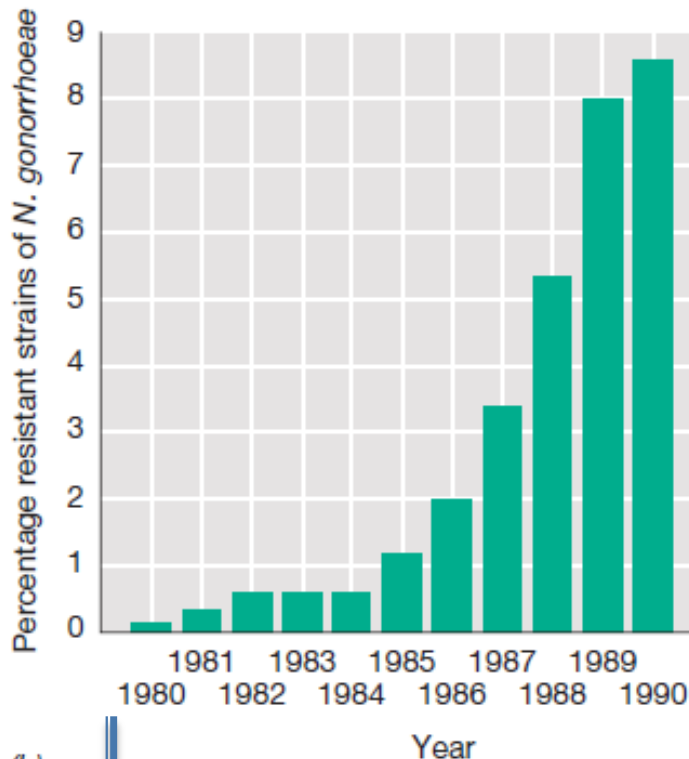
# Alguns fatores que favorecem a disseminação dos plasmídeos R

- ▶ Uso inadequado é o principal problema
  - Doses prescritas
  - Duração do tratamento
  - Utilização de doses subletais por um período de tempo inadequado
- Conjunto com desobediência do paciente
  - Vários param o tratamento logo que sentem melhoras
    - Ex. Surgimento da cepa de tuberculose resistentes a isoniazida ( tratamento de 6 – 9 meses)

→ Não são corretas para 50% dos casos

# Cada vez mais, O tipo de antibiótica para o tratamento de uma infecção tem que ser mudado

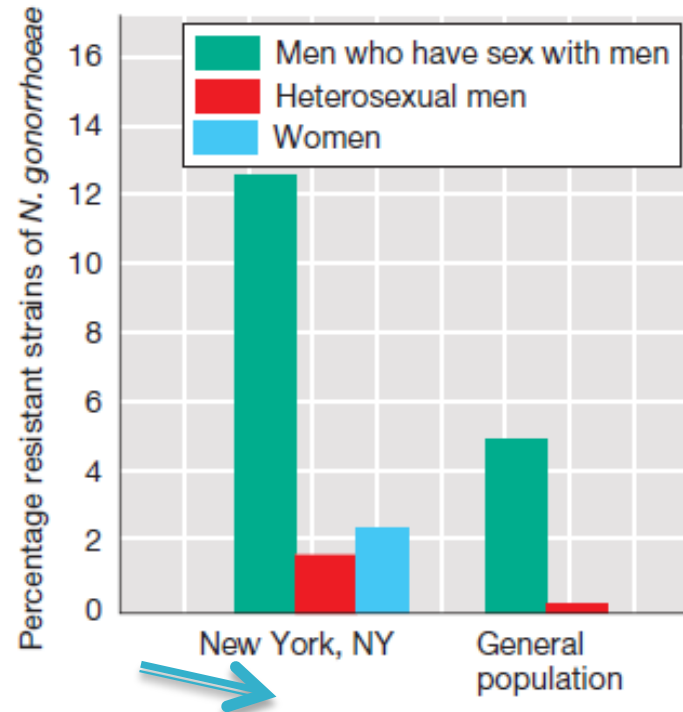
- ▶ Exemplo clássico é o tratamento da *N. gonorrhoeae* – causa gonorreia – doença sexualmente transmissível



(b)



Antes de 1940–1980, a penicilina era o tratamento utilizado



Começou a usar fluoroquinolona  
Posteriormente não respondia a homossexuais em NY  
Mudou para ceftriaxona.  
A cada ano o tratamento é atualizado para controlar o surgimento de cepas resistentes



# Uso Indiscriminado e não Medicinal é um Problema Grave

- ▶ Uso na agricultura
  - Como suplemento de rações animais
    - Substâncias promotoras de crescimento
    - Para impedir surgimento de doenças
  - Tratamento de infecções
- 50% dos antibióticos produzidos são para fins na agropecuária
  - ▶ Uso na aquicultura (criação de peixes)
  - ▶ Na produção de frutas

# Uso indiscriminado e não medicinal é um problema grave

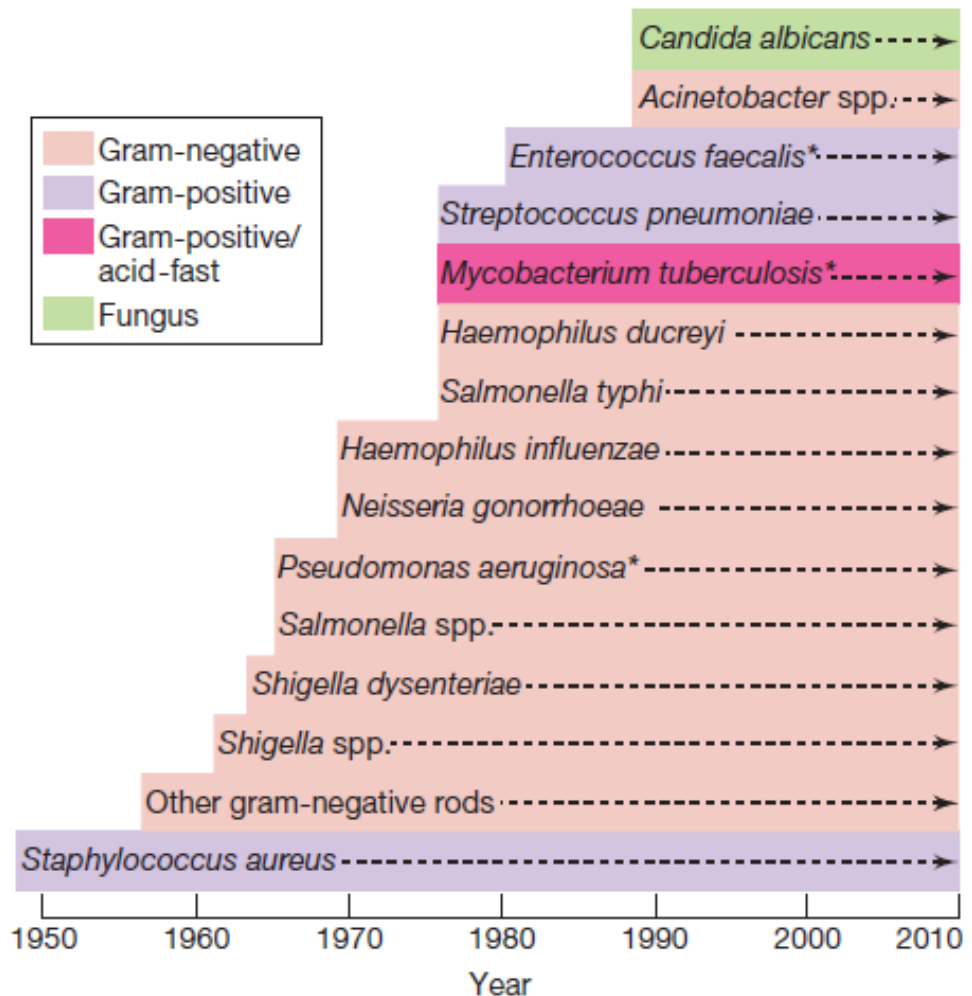
- ▶ Suprimentos alimentares (alta dose de antibióticos) – promotoras de crescimento/profiláticos
  - Muita frequência
  - Longos períodos de tempo
  - Fonte de surtos de infecções alimentares (seleção de patógenos resistentes)

Ex:

- Uso de fluoroquinolonas – antibiótico de amplo espectro – tem sido usado à 20 anos na agricultura – como promotor de crescimento e profiláticos (medida preventiva a enfermidade)
- Transmissão por alimentos de *Campylobacter jejuni* resistente a fluoroquinolonas usada como suplemento alimentar em aves para evitar doenças respiratórias

# Patógenos Resistentes

- ▶ Todos os microorganismos patogênicos desenvolverão resistência a algum Antibiótico



A maioria dos patógenos são resistentes a sulfas e a penicilina

Os primeiros fármacos utilizados (depois 1950)

# Problemática da Resistência Bacteriana a Antibióticos

# Problema da Resistência a Antibióticos

Até o presente, a maioria das infecções seguem respondendo aos tratamentos padrão com antibióticos.

**Entretanto,**

Aumento crescente no número de cepas resistentes



Uso de antibióticos mais caros e mais tóxicos



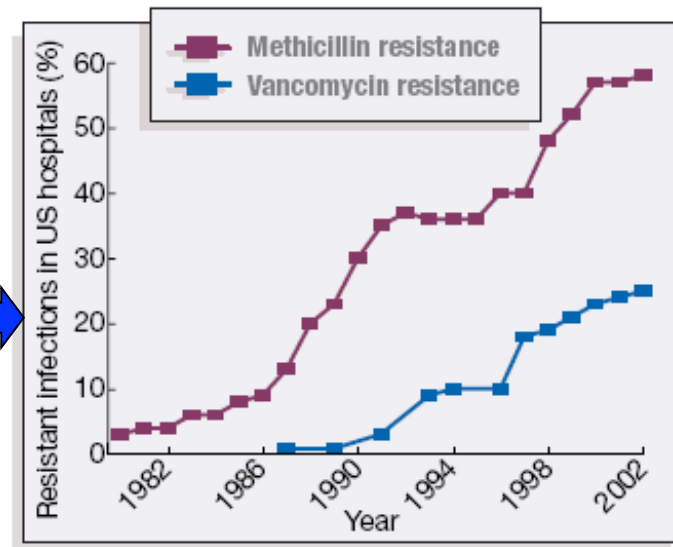
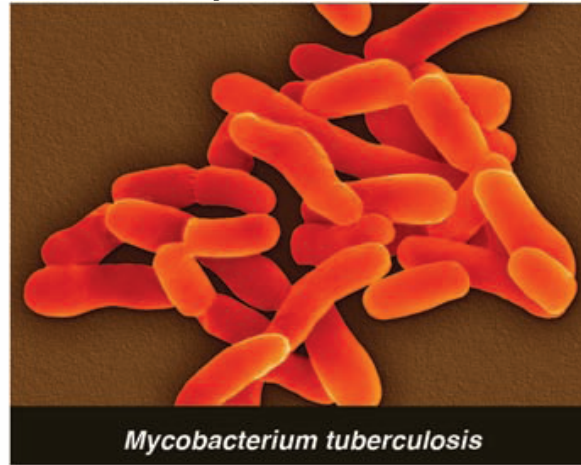
Aumento do tempo de infecção



Aumento no custo do tratamento

# Problemas Graves

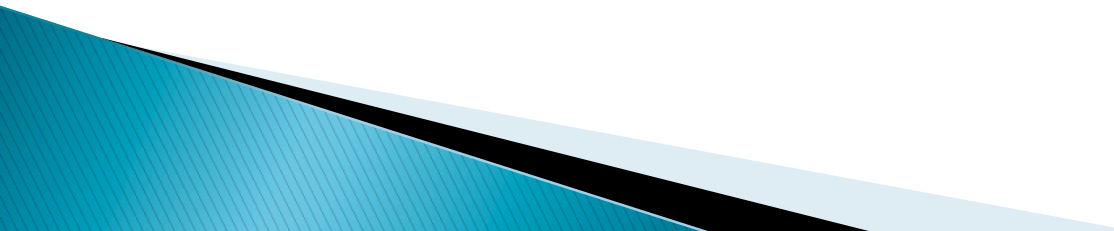
## Em Infecções Nosocomiais: Adquiridas em Hospitais



# Metódos para reduzir o problema de resistênciã

- ▶ Uso de doses altas e em um período adequado para não favorecer o surgimento de cepas mutantes resistentes
- ▶ Uso combinado de dois antibióticos não relacionados
- ▶ Antibiótico combinado – antibiótico combinado com um inibidor da enzima que causa a resistênciã. Ex. Ampicilina + inibidor da betalactamase
- ▶ Alguns estudos sugerem que a resistênciã a um determinado antibiótico pode ser perdida (sensibilidade é revertida após alguns anos) – poderia interromper e depois de alguns anos usar novamente o mesmo antibiótico
- ▶ Desenvolver novos fármacos

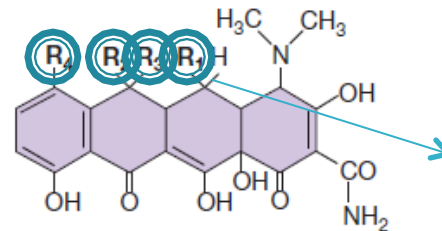
# Desenhos de Novos Fármacos

- ▶ Construção de análogos de agentes já existentes
  - ▶ Descoberta de novos fármacos
  - ▶ Desenho de novas drogas (SBDD) – desenvolvimento computacional
- 



# Construção de Análogos de Agentes já Existentes

- ▶ Imitações estruturais de antibióticos já existentes
  - Boa estratégia porque a ação é comprovada
  - Faz pequenas modificações estruturais
    - Deixa de ser “vis
    - Pode otimizar:
      - Solubilidade
      - Afinidade

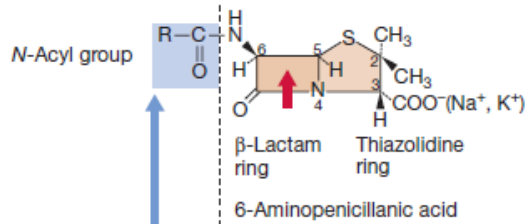


Locais de substituições  
Criar vários análogos

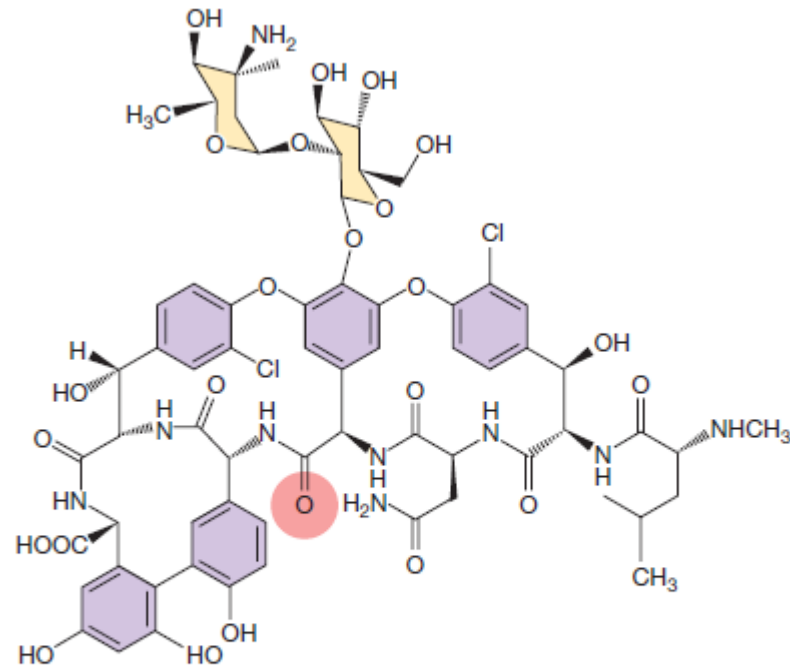
| Tetracycline analog                 | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub>  | R <sub>4</sub> |
|-------------------------------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|
| Tetracycline                        | H              | OH             | CH <sub>3</sub> | H              |
| 7-Chlortetracycline<br>(aureomycin) | H              | OH             | CH <sub>3</sub> | Cl             |
| 5-Oxytetracycline<br>(terramycin)   | OH             | OH             | CH <sub>3</sub> | H              |

**Figure 26.23 Tetracycline.** The structure of tetracycline and its semisynthetic analogs.

# Exemplos de Análogos Construídos



| N-Acyl group | Designation  |
|--------------|--|
|              | <b>NATURAL PENICILLIN</b><br>Benzylpenicillin (penicillin G)<br>Gram-positive activity<br>$\beta$ -lactamase-sensitive   |
|              | <b>SEMISYNTHETIC PENICILLINS</b><br>Methicillin<br>acid-stable,<br>$\beta$ -lactamase-resistant  |
|              | Oxacillin<br>acid-stable,<br>$\beta$ -lactamase-resistant  |
|              | Ampicillin<br>broadened spectrum of activity (especially against gram-negative <i>Bacteria</i> ), acid-stable,<br>$\beta$ -lactamase-sensitive                           |
|              | Carbenicillin<br>broadened spectrum of activity (especially against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ), acid-stable but ineffective orally,<br>$\beta$ -lactamase-sensitive |



**Figure 26.30 Vancomycin.** Intermediate drug resistance to the parent structure of vancomycin has developed in recent years. However, modification at the position shown in red by substitution of a methylene ( $=\text{CH}_2$ ) group for the carbonyl oxygen restores much of the lost activity.

# Problemas Graves

Desenvolvimento de novas drogas:

