

Antifúngicos: Mecanismos de ação e de Resistência

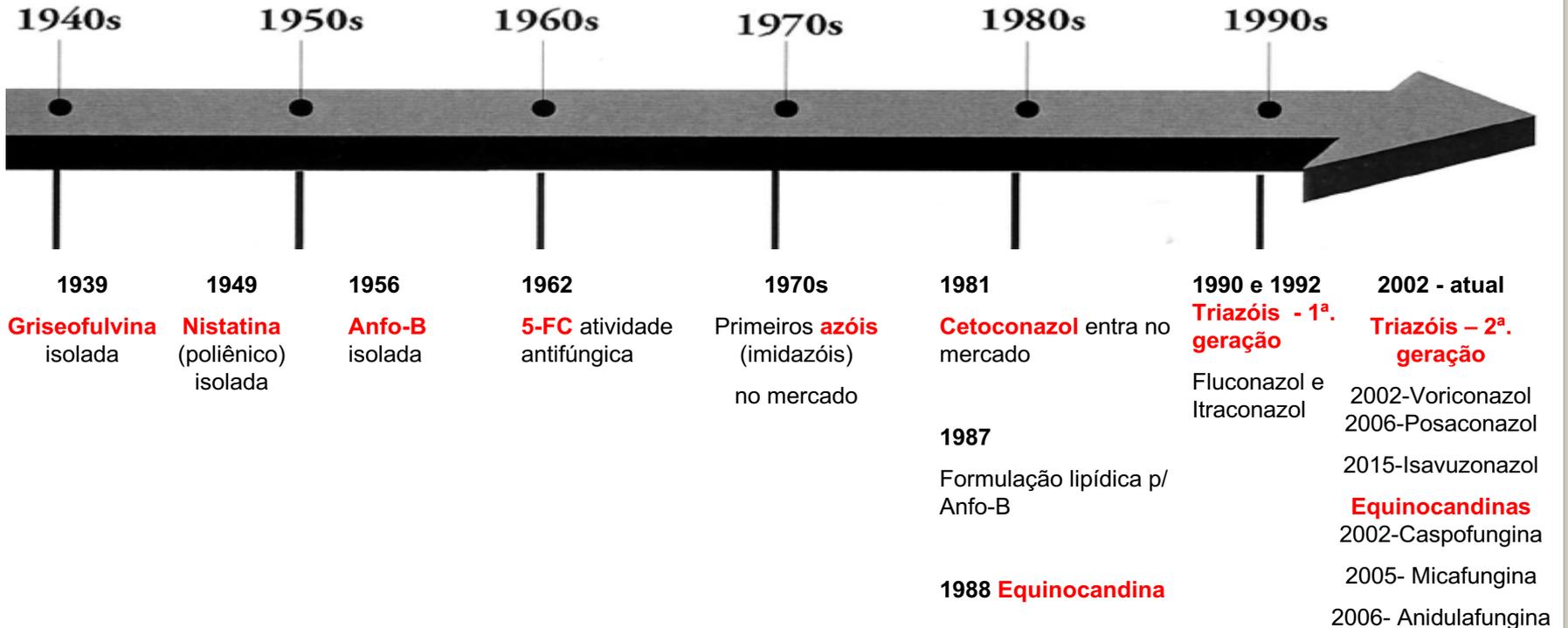
Profa. Dra. Kelly Ishida

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Microbiologia

Classificação das micoses

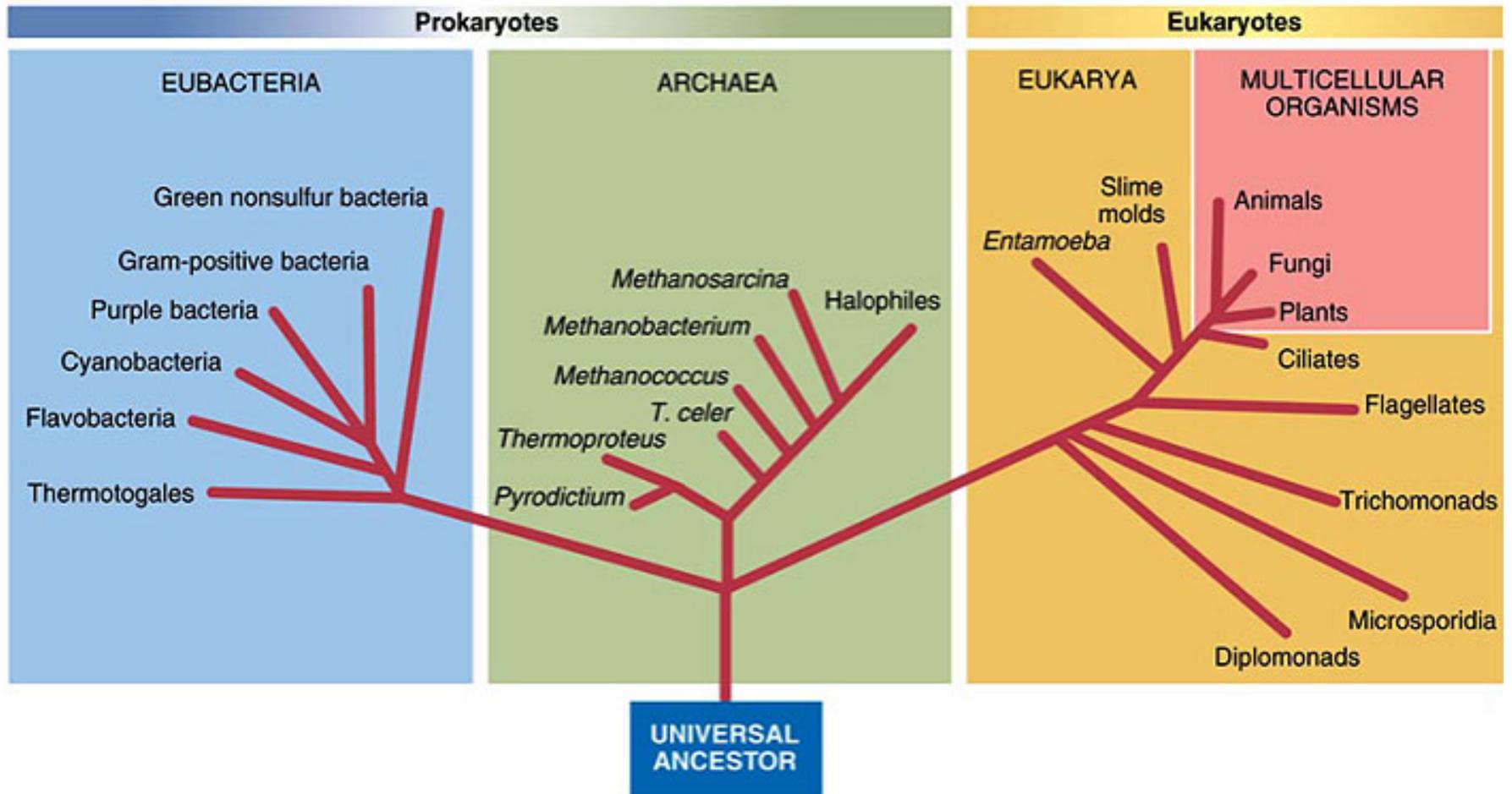
Micose	Tecido	Espécies
Superficial	Extrato córneo do tecido epitelial, pelo e cabelo	<i>Malassezia furfur</i> <i>Hortaea werneckii</i> <i>Piedraia hortae</i> <i>Trichosporon beigeli</i>
Cutâneo	Porções queratinizadas da pele, pelo e cabelo	<i>Trichophyton</i> spp. <i>Microsporum</i> spp. <i>Epidermophyton floccosum</i>
Subcutâneo	Derme, músculos e tecido conjuntivo	<i>Sporothrix</i> spp. <i>Fonsecaea pedrosoi</i>
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. <i>Zigomycetes-Rhizopus</i> spp.

Histórico – antifúngicos

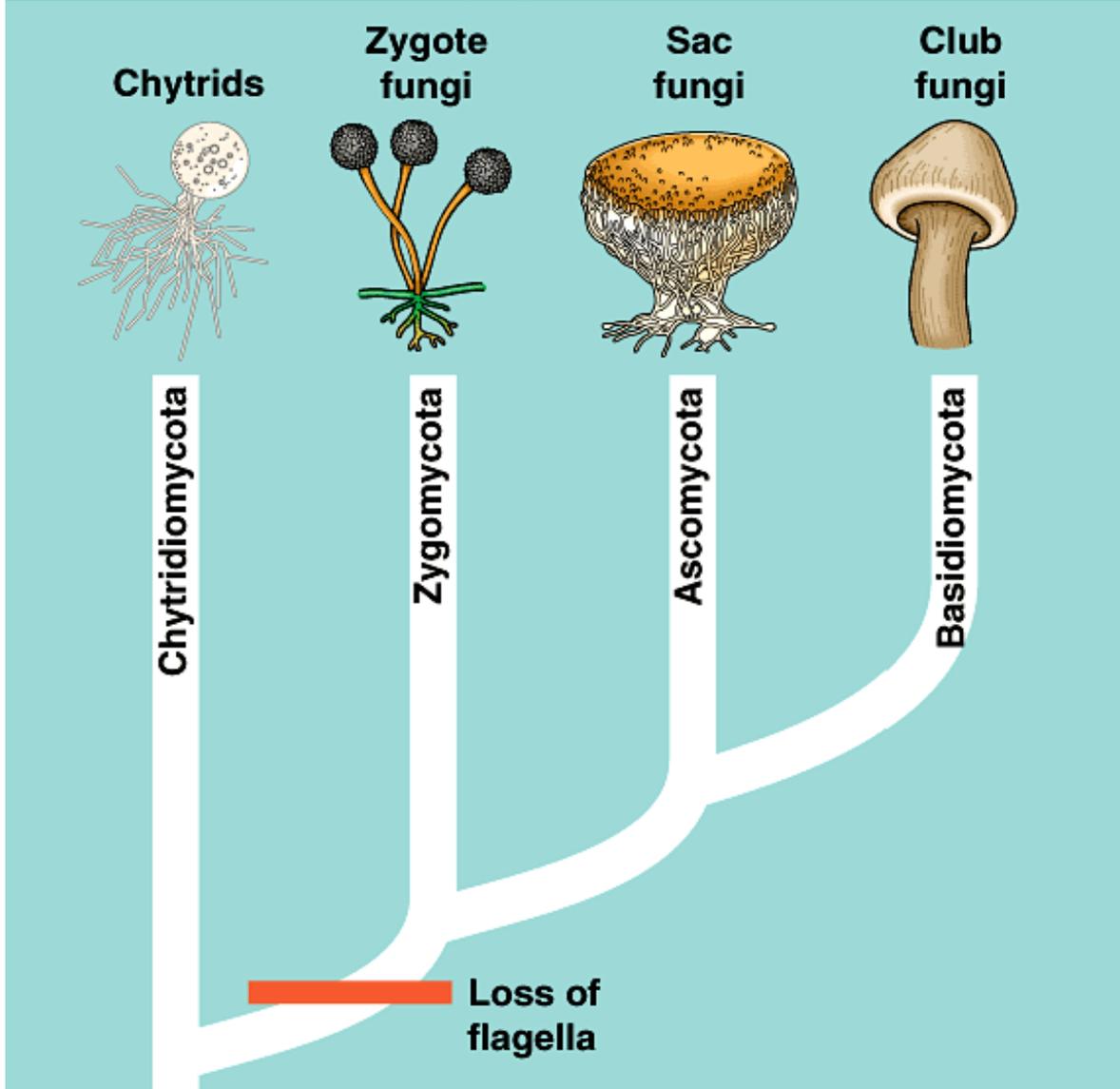


1903 – KI (iodeto de potássio)

Domínio dos seres vivos



Filos



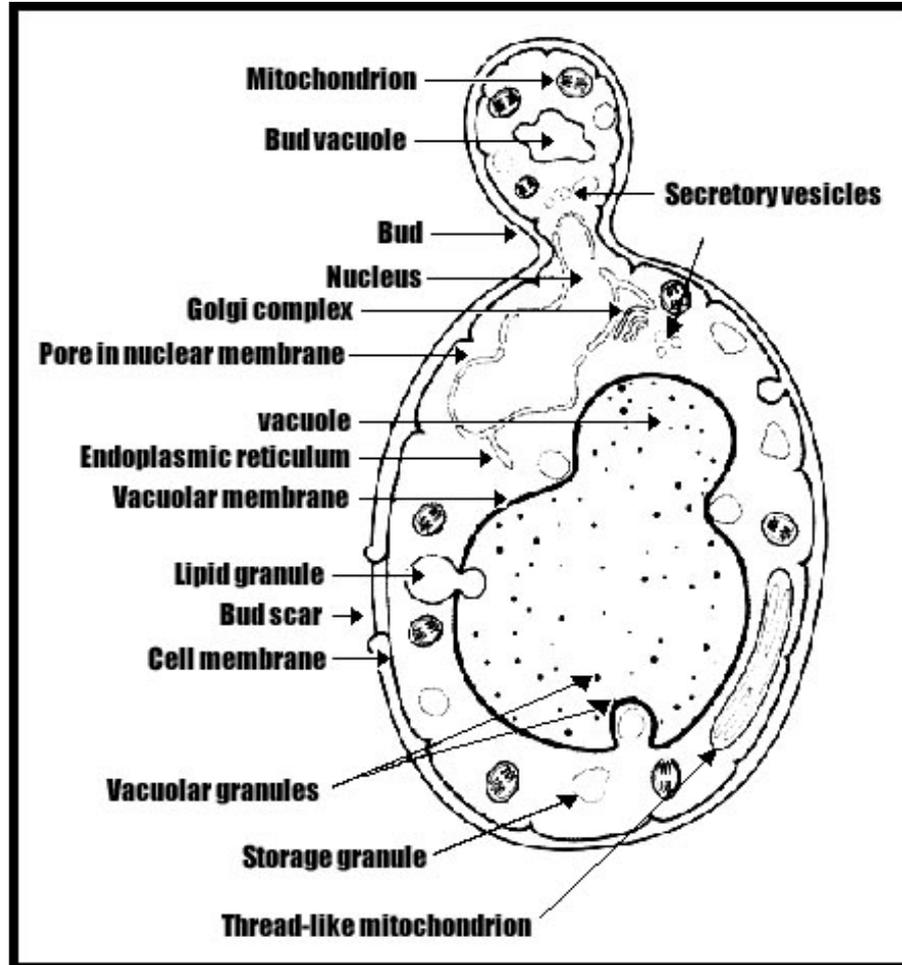
Originados de um único ancestral



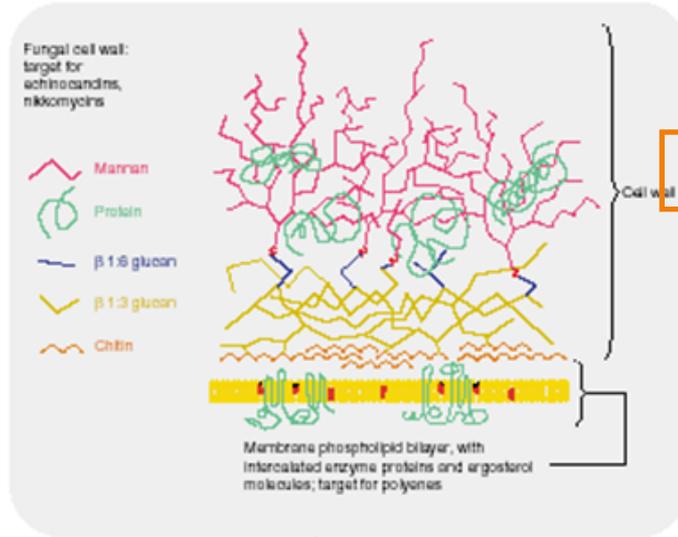
Grupo monofilogenético

“Fungos verdadeiros”

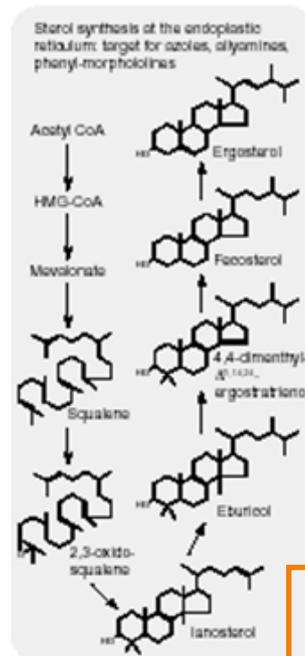
A célula fúngica



Alvos para a quimioterapia antifúngica



Equinocandinas



Poliênicos
Azóis



DNA and RNA synthesis: targets for flucytosine

5-Fluorocitosina

Microtubule assembly: target for griseofulvin

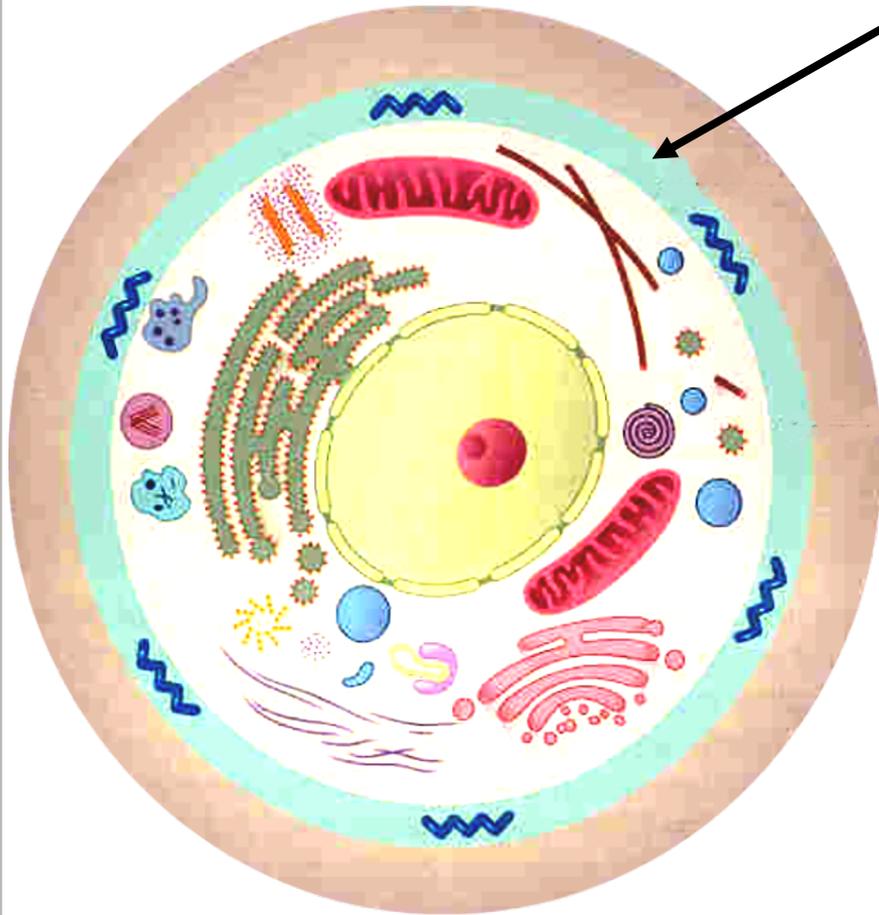
Griseofulvina

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)
- Solúvel em água
- Boa estabilidade
- Boa farmacocinética (Absorção, distribuição, metabolismo e excreção)
- Baixo custo

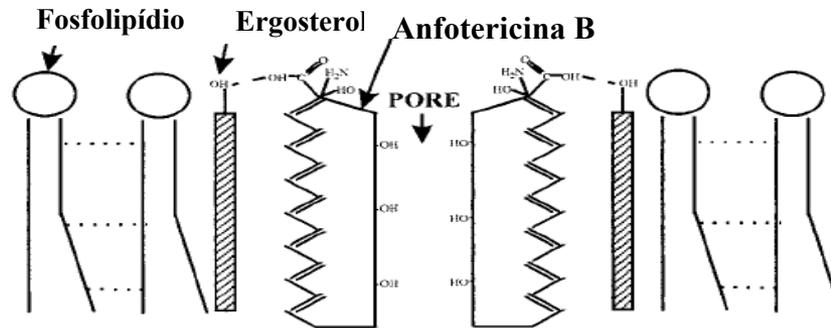
Antifúngicos e Mecanismos de ação

Antifúngicos que agem na membrana celular

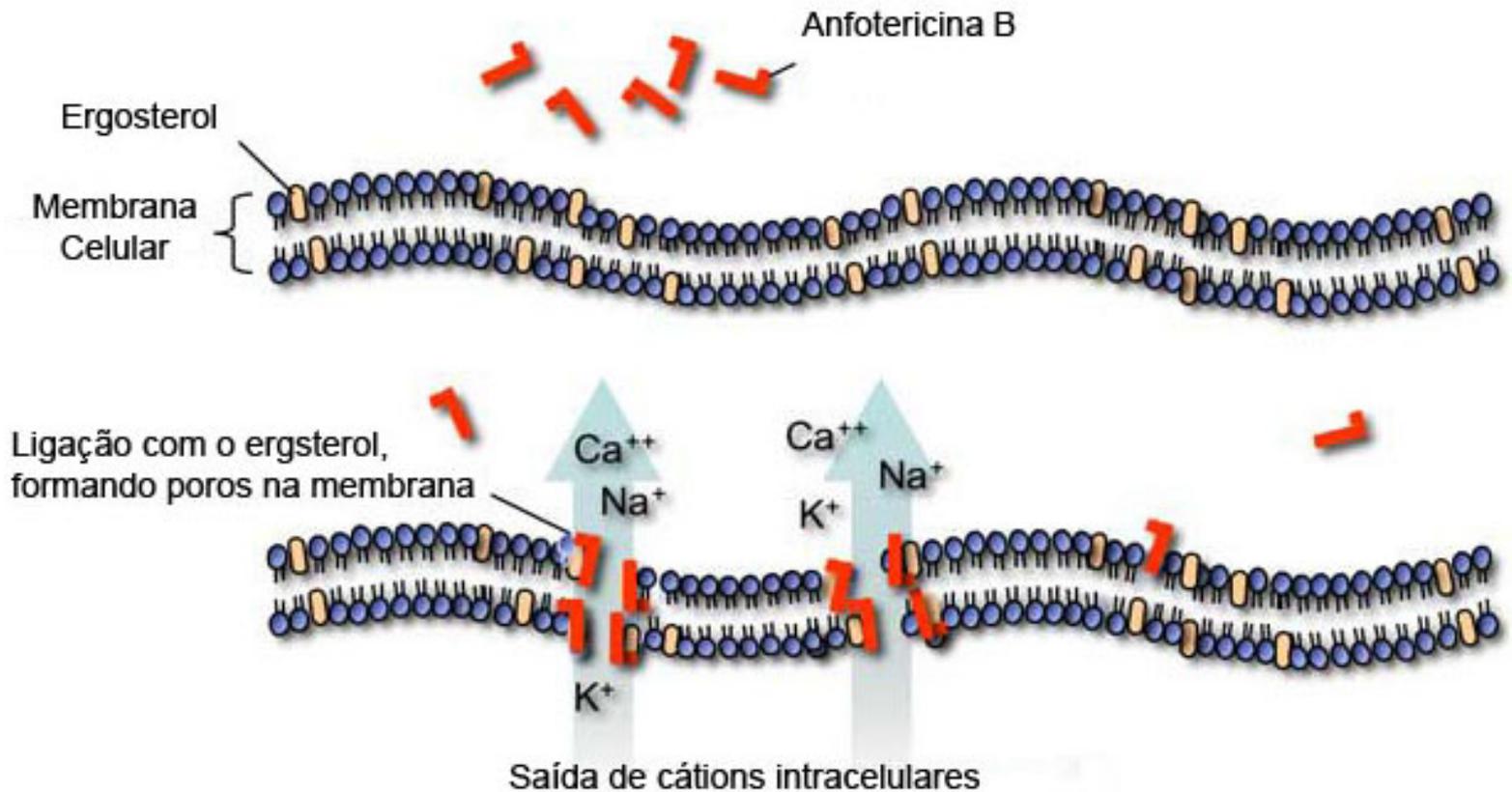


Membrana celular

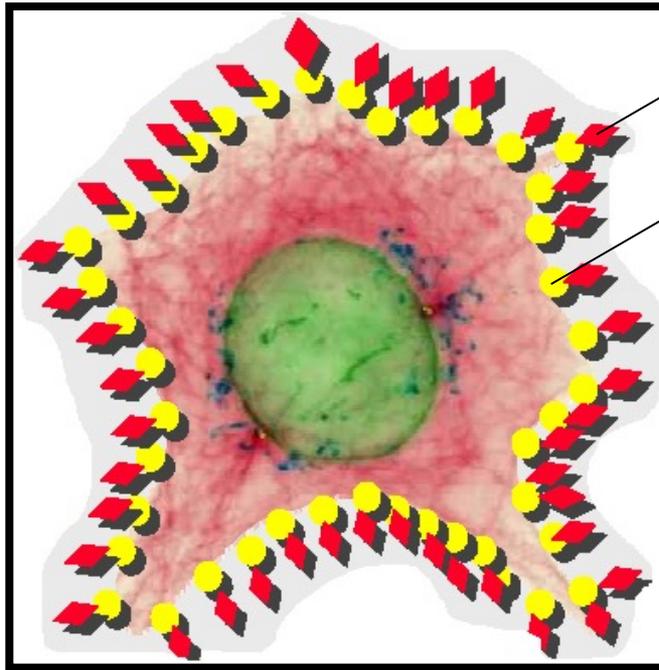
- **Poliênicos**
 - Anfotericina B e formulações lipídicas
 - Nistatina
- **Azóis**
 - Cetoconazol, Miconazol,
 - Fluconazol, Itraconazol
 - Voriconazol, Posaconazol
 - Albacozazol, Ravuconazol, Isavuconazol
- **Alilamina** (Terbinafina, butenafina)
- **Amorolfina**



Adaptado de White, 1998.

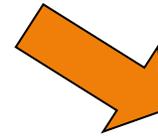


Interações com células de mamíferos



Anfotericina B/Nistatina

Colesterol



Nefrotoxicidade

Hepatotoxicidade

Cardiotoxicidade

Anemia hemolítica

Nistatina

- 1º poliênico (1949)
- Isolado de *Streptomyces noursei*
- Uso somente tópico – suspensão, pastilhas, pomadas, cremes
- Tratamento de dermatófitos e infecções mucocutâneas por *Candida*
- Altamente tóxico
- 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

Nistatina lipossomal (Nyotran)

Anfotericina B lipossomal (L-AMB, Ambissome)

Anfotericina B dispersão coloidal (ABCD –
Amphocil ou Amphotec)

Anfotericina B Complexo lipídico (ABLCL, Abelcet)

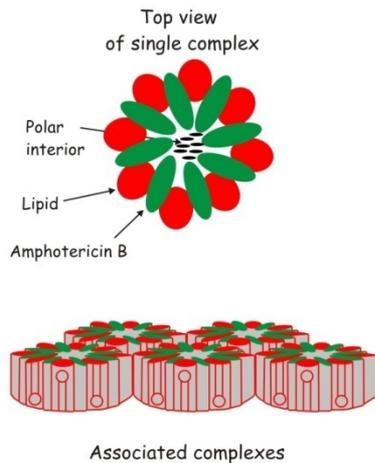


**Eficácia semelhante a
AMB desoxicolato**

↓↓ Efeitos colaterais

Formulações lipídicas da AMB desoxicolato

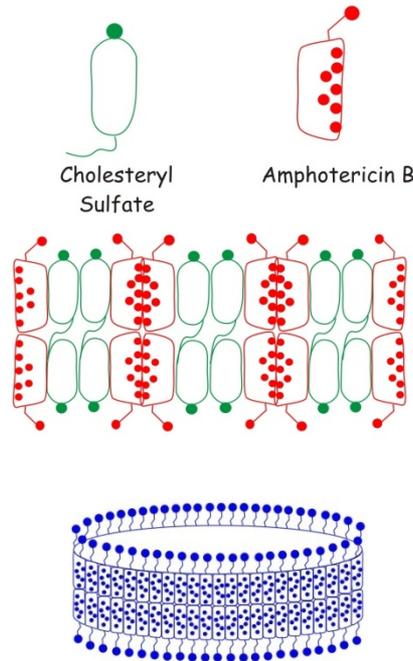
Abelcet[®] ABLC Complexo lipídico



Ribbon-like particles
Carrier lipids: DMPC, DMPG
Particle size (µm): 1.6-11

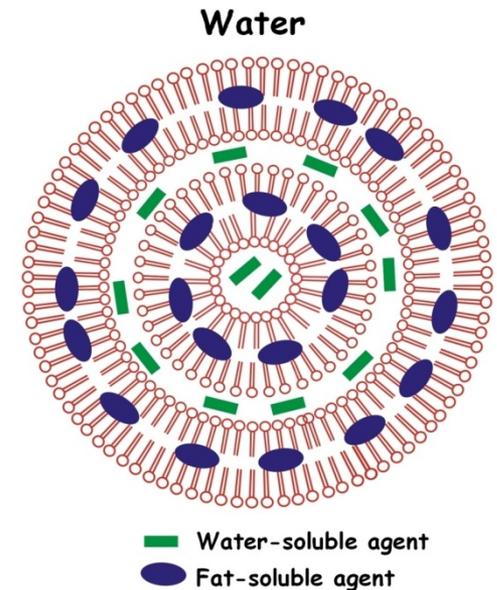
DMPC-Dimyristoyl phosphatidylcholine
DMPG- Dimyristoyl phosphatidylglycerol

Amphotec[®] ABCD Dispersão coloidal



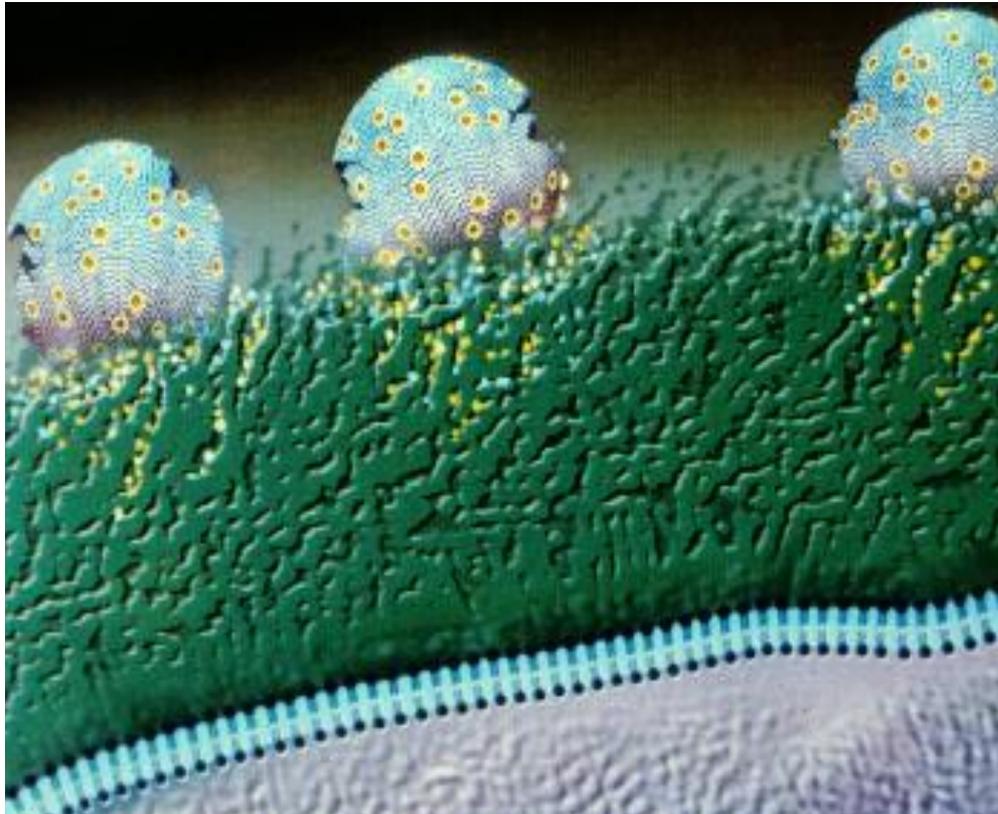
Disk-like particles
Carrier lipids: Cholesteryl sulfate
Particle size (µm): 0.12-0.14

Ambisome[®] L-AMB AMB lipossomal



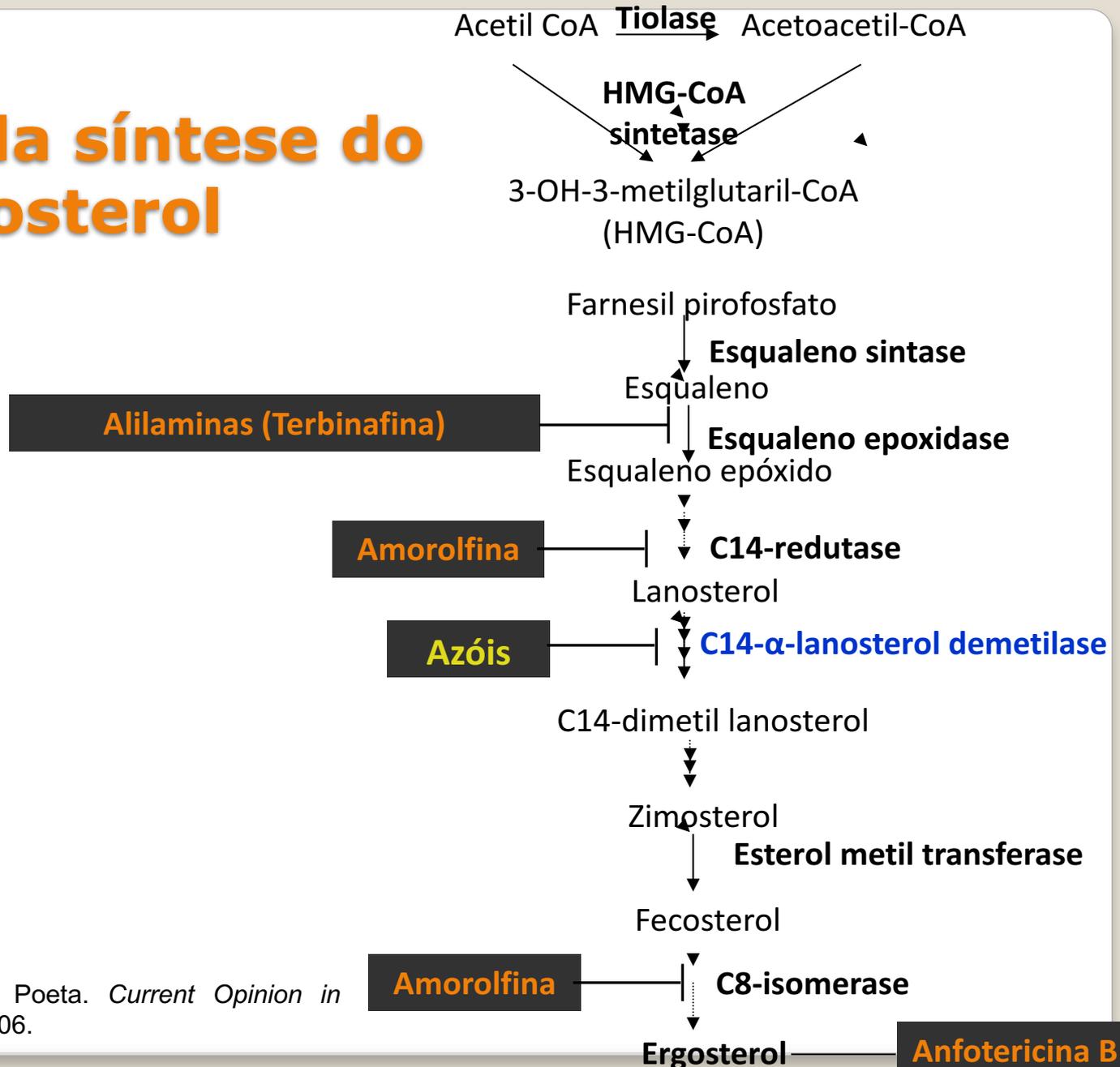
Unilamellar liposome
Carrier lipids: HSPC, DSPG, cholesterol
Particle size (µm) : 0.08
HSPC-Hydrogenated soy phosphatidylcholine
DSPG-Distearoyl phosphatidylcholine

AMB lipossomal - Ambissome®



- Maior afinidade pela célula fúngica
- Menor toxicidade, por impedir liberação nas células do hospedeiro
 - Permite maiores dosagens
- Custo muito elevado (~100 x a mais que a AMB desoxicolato)

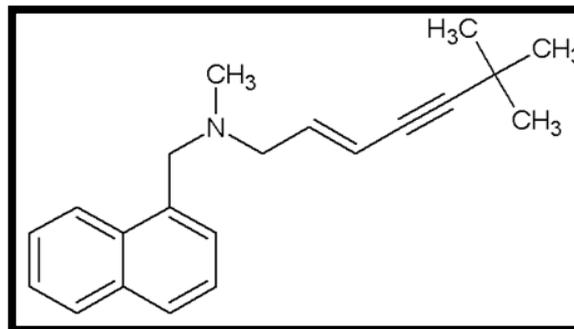
Inibição da síntese do ergosterol



Adaptado de Shea e Del Poeta. *Current Opinion in Microbiology*, 9: 352-358, 2006.

Alilaminas: terbinafina e butenafina

Terbinafina



Inibe a enzima esqualeno epoxidase

Efeito antifúngico devido o acúmulo de esqualeno e falta de ergosterol

Onicomioses causadas por dermatófitos

Efetivo em 90 % dos casos

Uso tópico (1% em creme) e oral

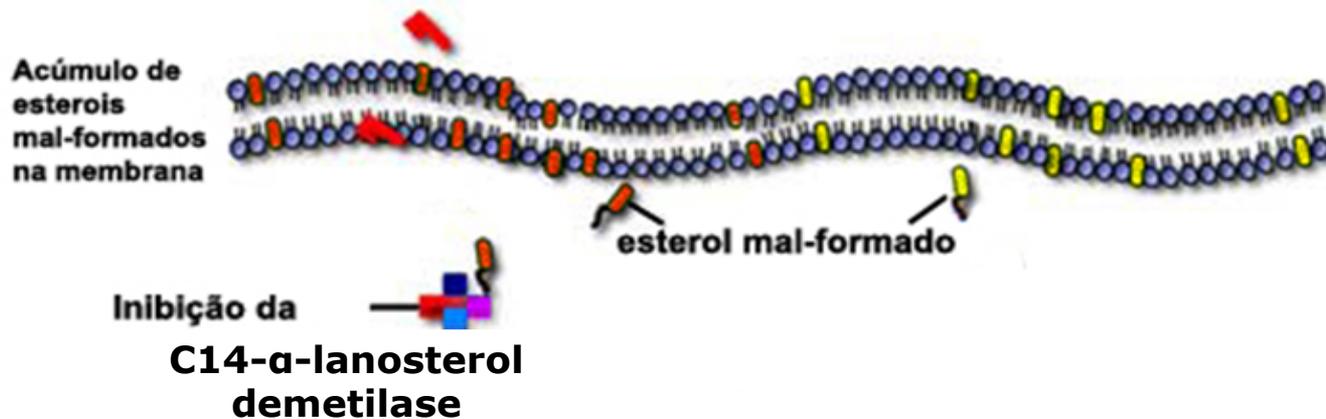
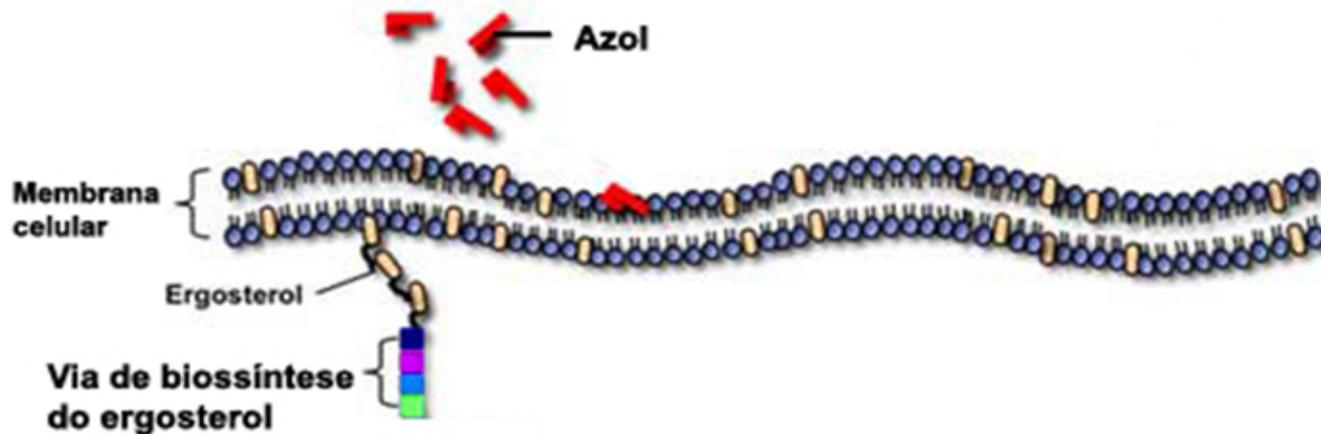
Acumula na pele, unha e tecido adiposo

Reações adversas: diarreia, náuseas, erupções cutâneas, urticária e fotossensibilidade.

Azóis: imidazóis e trizóis

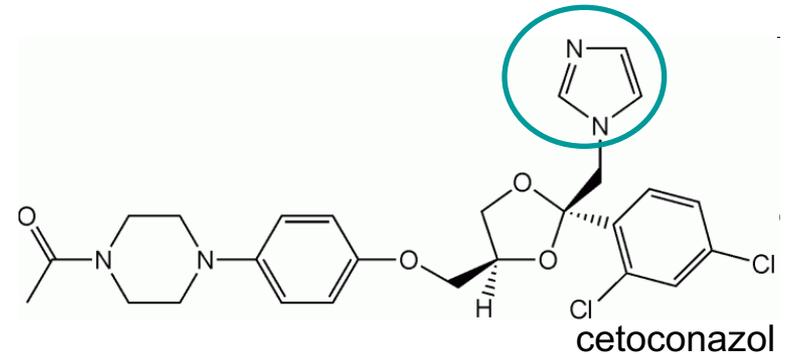
- Imidazóis
 - 1ª. Geração
 - 2ª. Geração
- Triazóis
 - 1ª. Geração
 - 2ª. Geração
 - 3ª. Geração

Azóis: imidazóis e trizóis



Agentes azólicos: imidazóis

- Econazol
 - Miconazol
 - Clotrimazol
- } Tópico



- Cetoconazol (tópico e sistêmico)
 - (Nizoral, Jassen Pharmaceutica)

São Fungistáticos

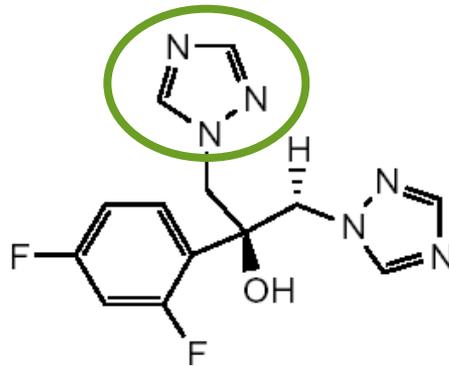
Dermatofitoses, candidíasis cutânea/mucocutânea

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

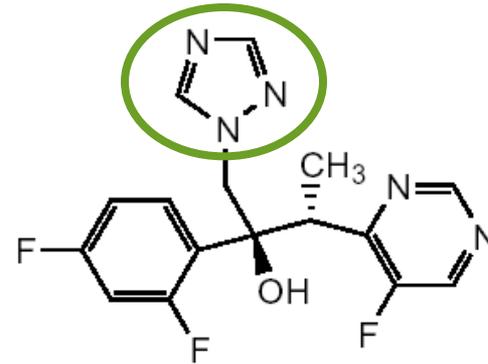
Absorção do cetoconazol – pH ácido

São hepatotóxicos, altera níveis de testosterona e cortisol

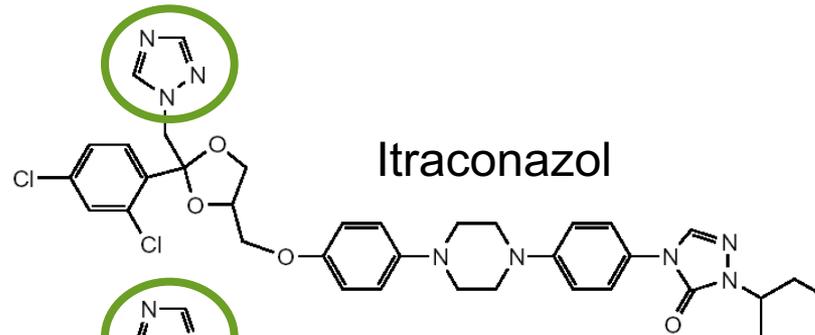
Agentes azólicos: triazóis



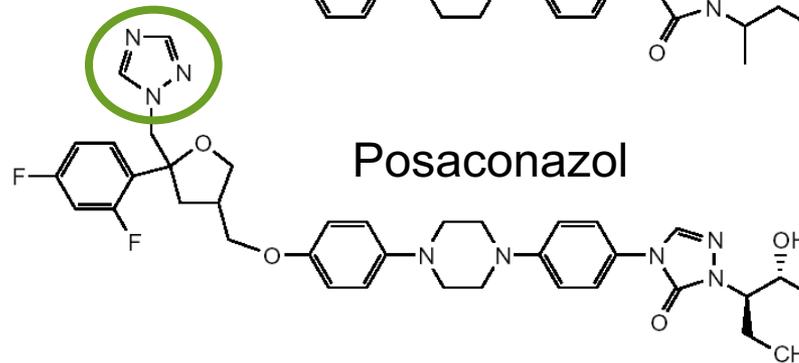
Fluconazol



Voriconazol



Itraconazol



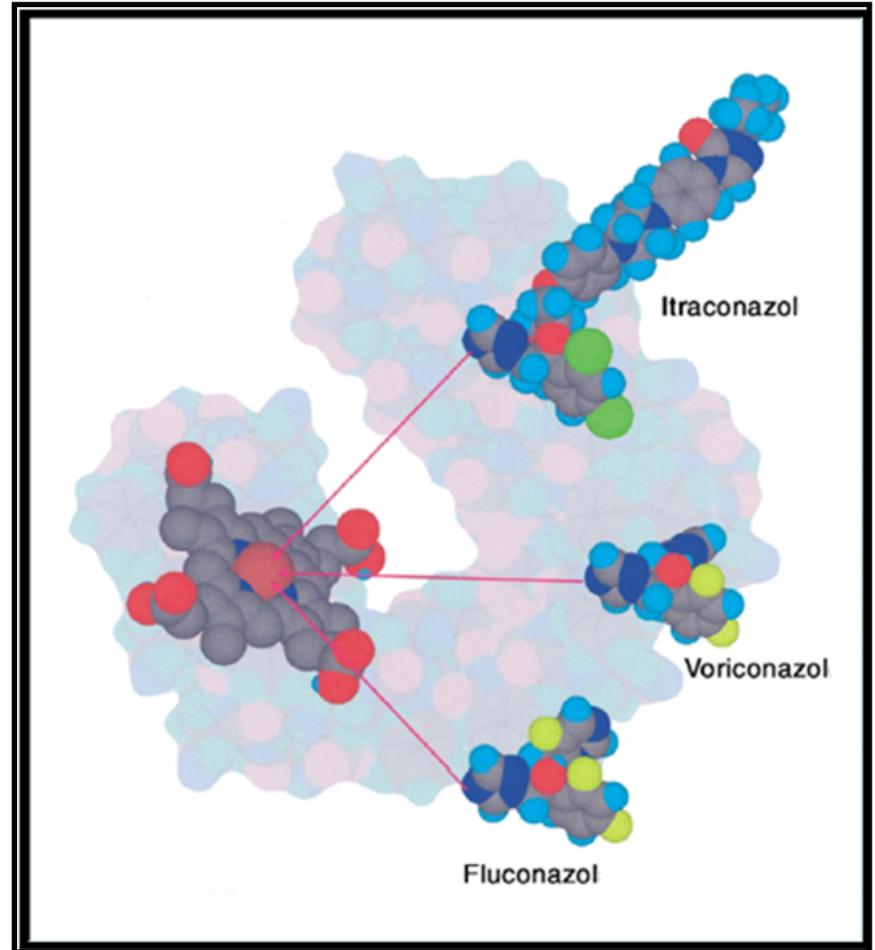
Posaconazol

No tratamento de Infecções sistêmicas.

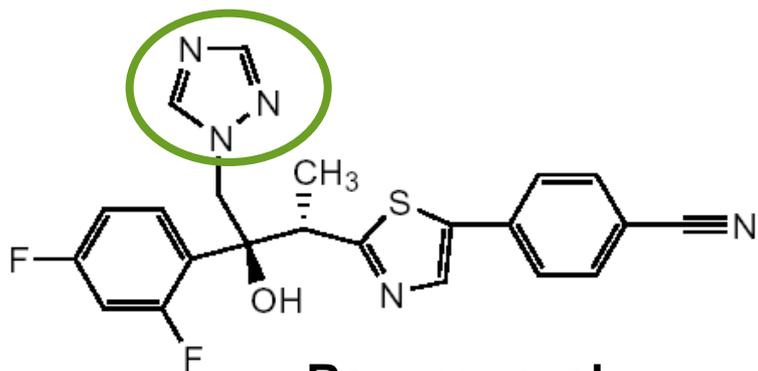
Alta afinidade pela C14- α demetilase – ↓efeitos colaterais

São mais específicos para a
enzima do citocromo P450

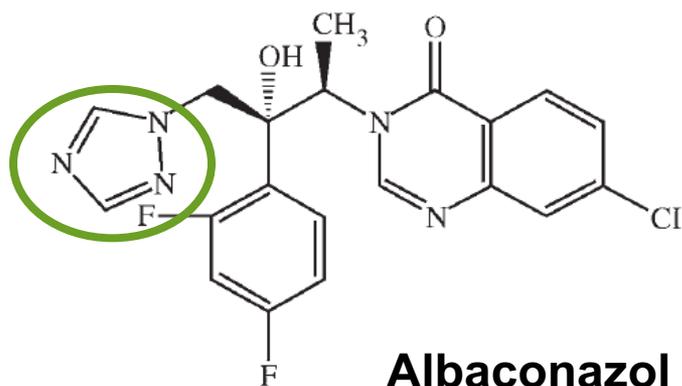
Espectro de ação ampliado:
dermatófitos, fungos
filamentosos, leveduras e
fungos dimórficos



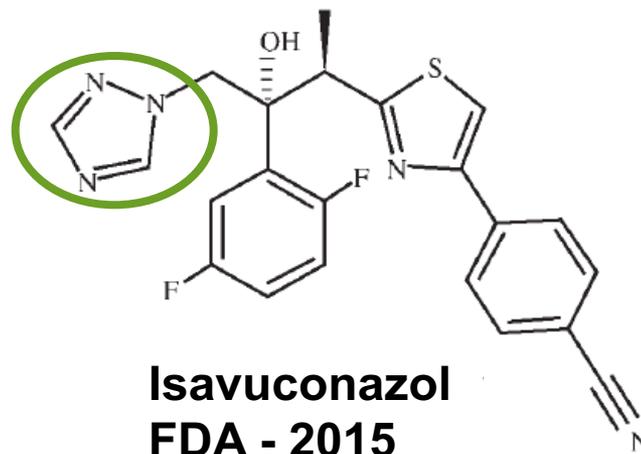
	Fluconazol (Pfizer)	Voriconazol (Pfizer)	Itraconazol (Janssen Pharmaceuticals)	Posaconazol (Schering-Plough) – 2006 (FDA)
Indicação	-Candidíase (<i>C. krusei</i> e <i>C. glabrata</i> baixa susceptibilidade) -Criptococose. -Profilaxia	Amplo espectro, exceto Zigomicetos	- Paracoccidiodomicose (PCM) - Esporotricose Candidíase Criptococose	- Candidíase esofágica, - Infecção fúngica refratária e profilaxia
Efeito antifúngico	Fungistático	-Fungistático: <i>Candida</i> spp. e <i>Cryptococcus</i> spp. -Fungicida: <i>Aspergillus</i> spp.	Fungistático	Fungicida para: - <i>Candida</i> spp., - <i>Cryptococcus</i> spp., - <i>Aspergillus</i> spp.
Características relevantes	-Bem tolerada -Possível hepatotoxicidade	Farmacocinética semelhante ao fluconazol	- pH estomacal – influencia na absorção - Não passa pela barreira hematoencefálica	- pH estomacal – influencia na absorção - Não passa pela barreira hematoencefálica



Ravuconazol



Albaconazol



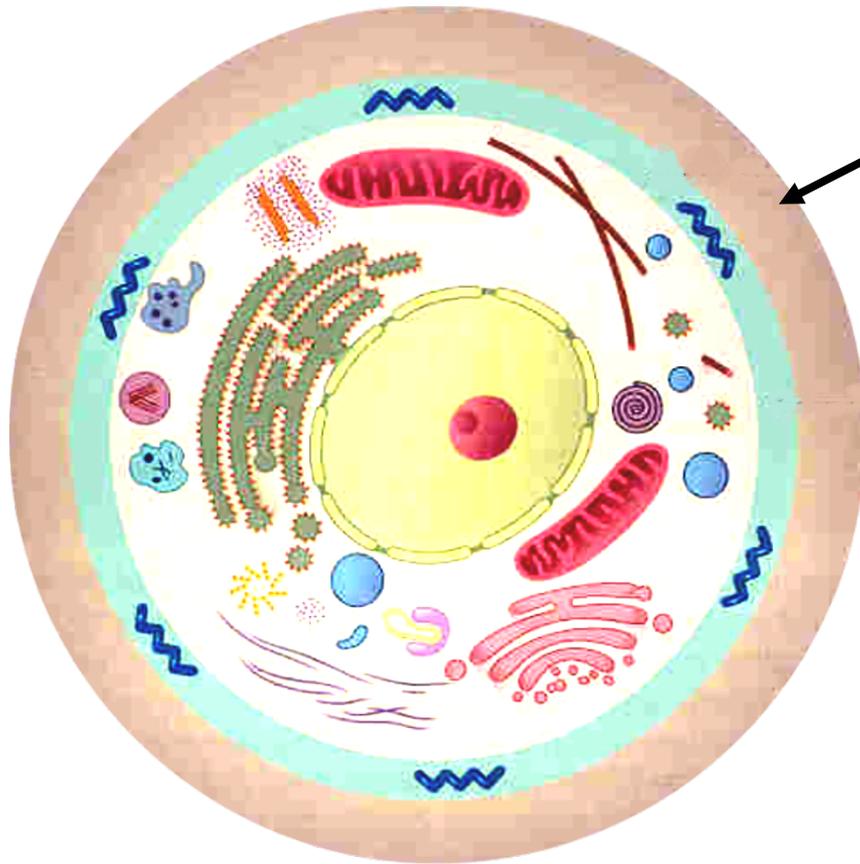
Isavuconazol
FDA - 2015

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	+++	+++	+++	+	+

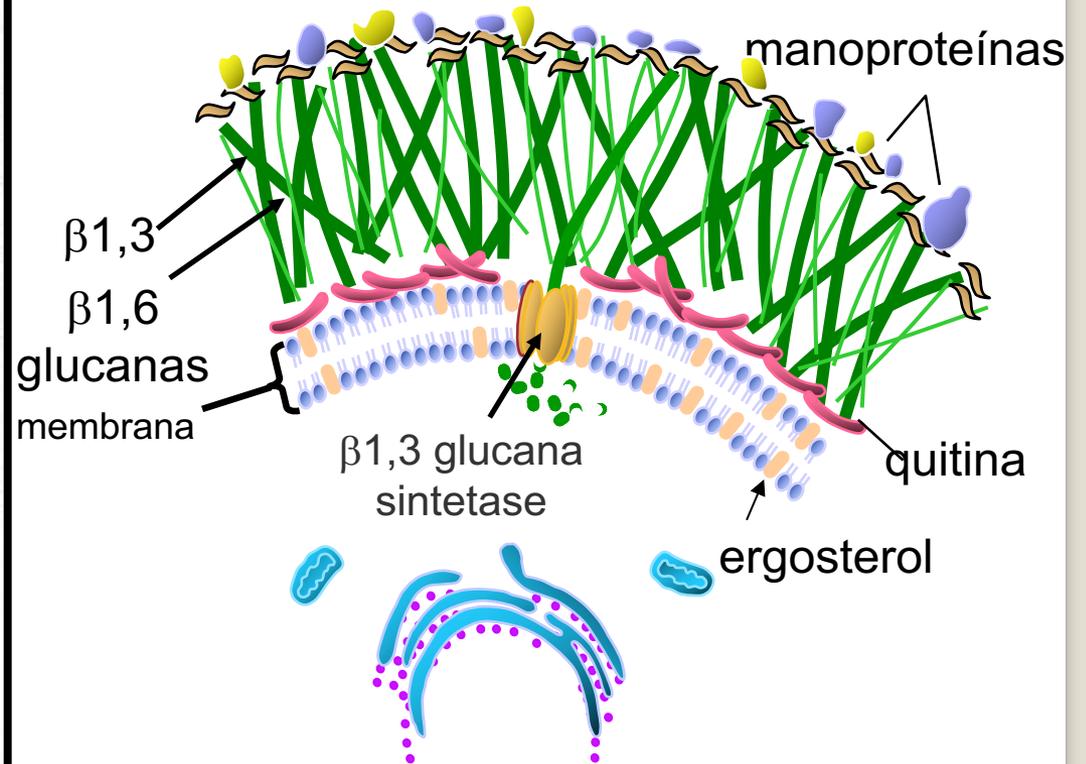
Antifúngicos que agem na síntese da parede celular



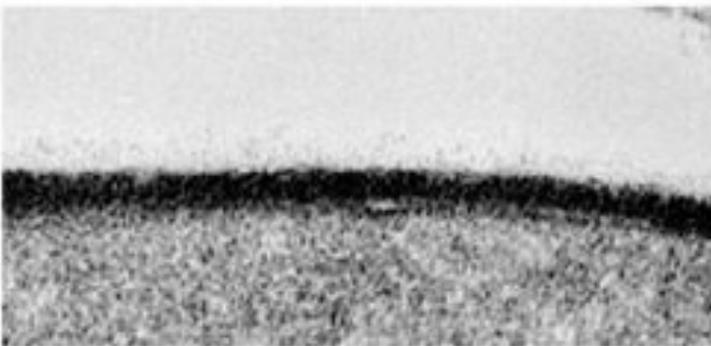
Parede celular

- Equinocandinas
 - Caspofungina
 - Micafungina
 - Anidulafungina
 - Aminocandina

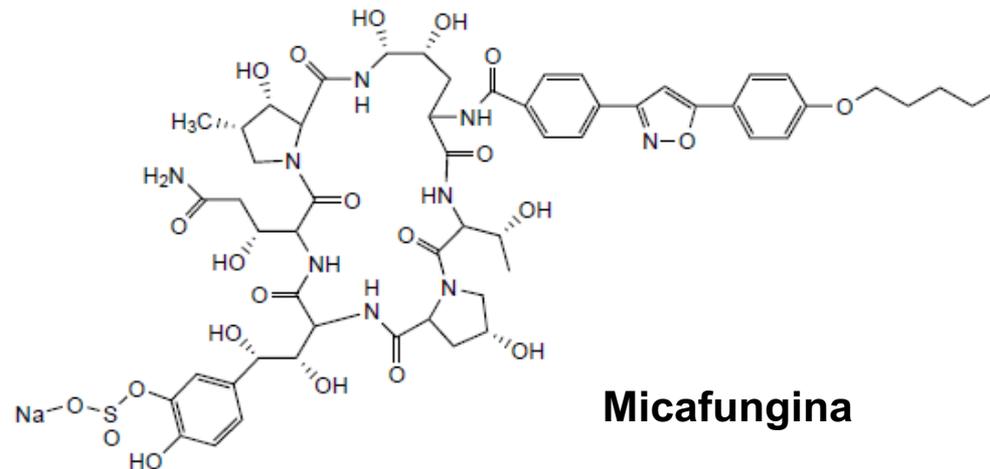
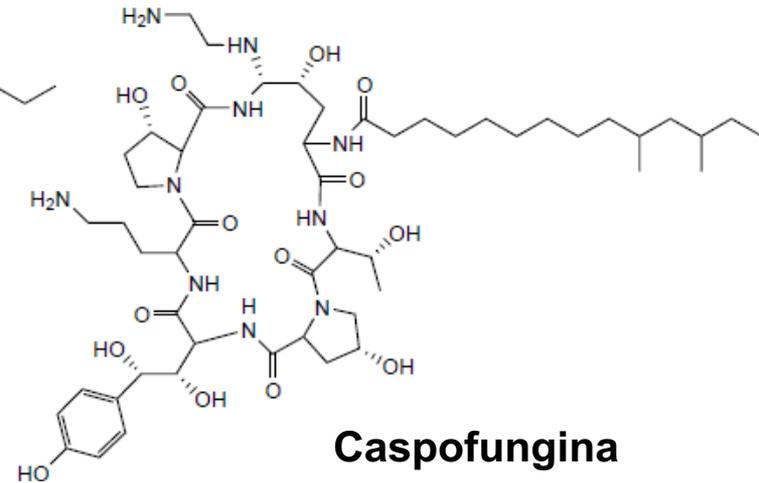
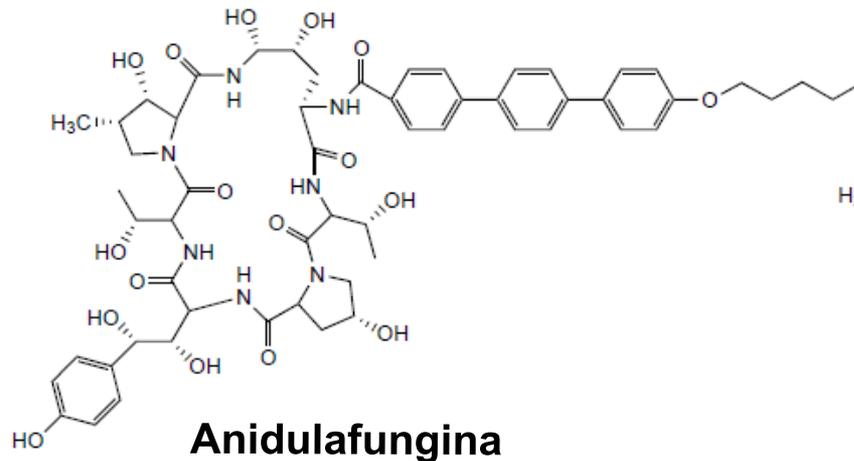
Pared celular fúngica



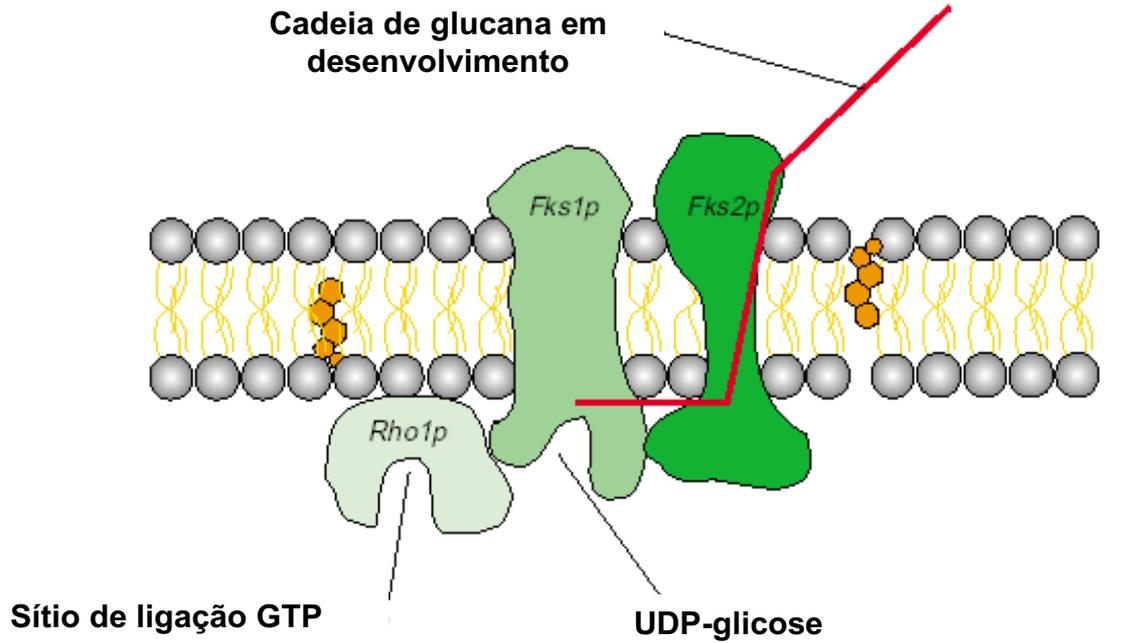
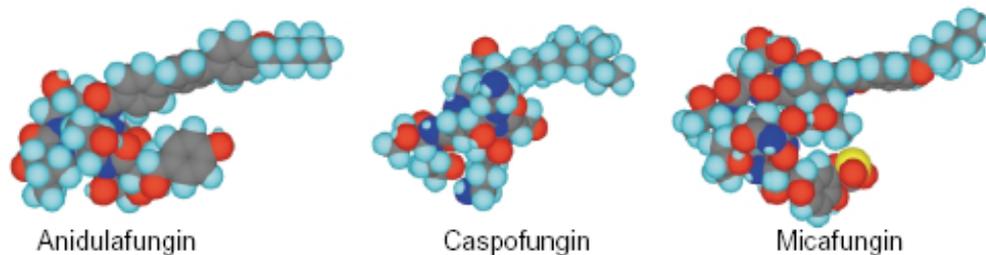
A



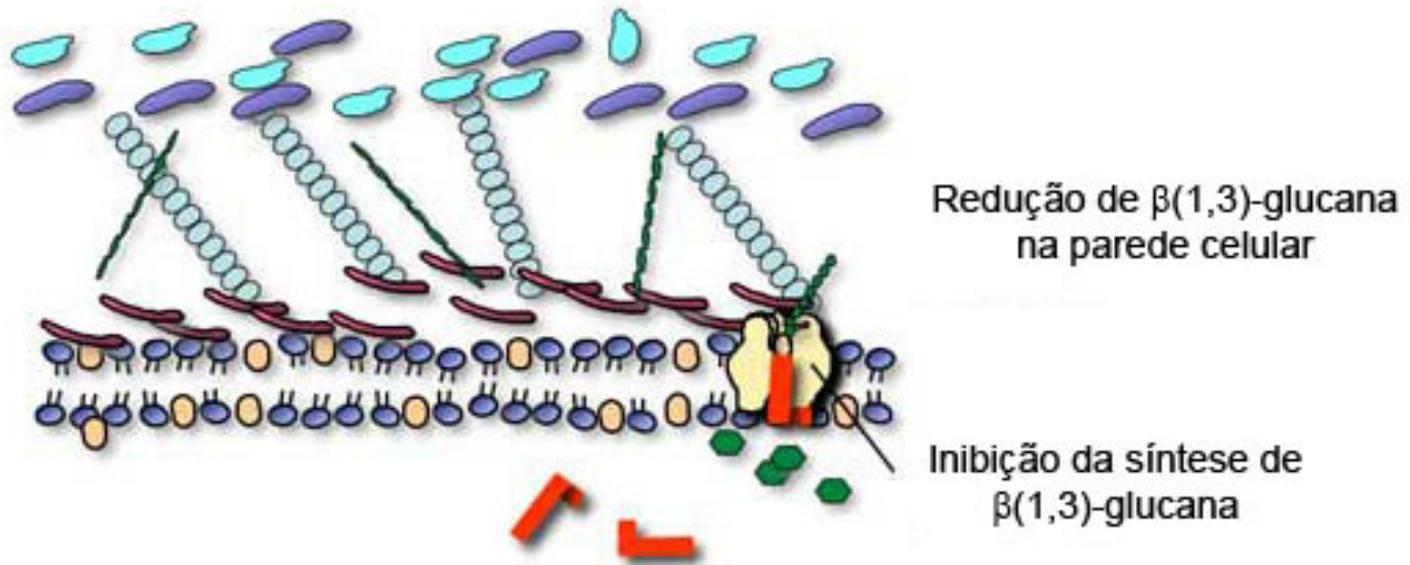
Agentes lipopeptídico: peptídio cíclico + cadeia de ácido graxo



Inibidores não-competitivos



TRENDS in Microbiology



Perda da integridade da parede celular

Fragilidade Osmótica

Efeito fungicida

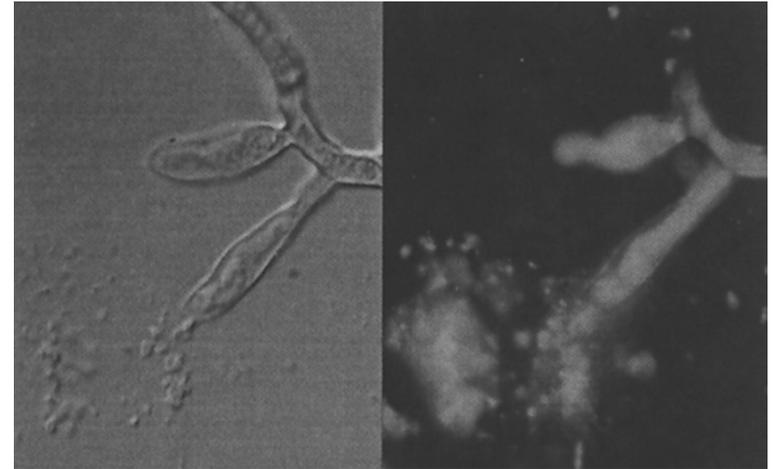
Ativos contra:

***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.

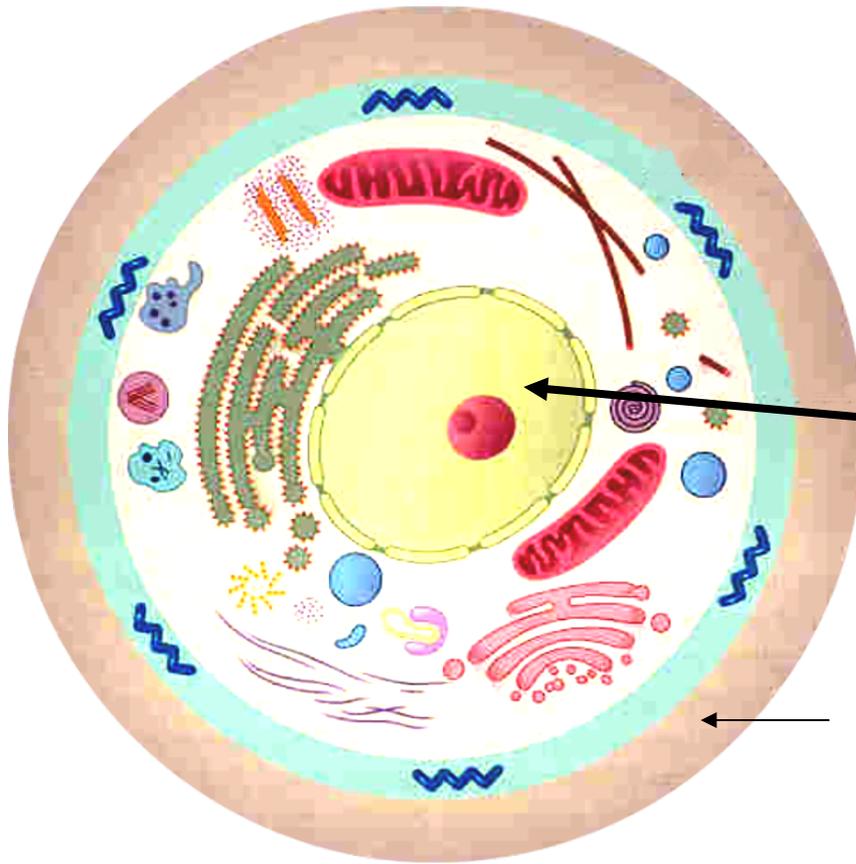
Pouca interação com outras drogas

Efeitos adversos: gastrointestinais

Não apresenta resistência cruzada os agentes azólicos

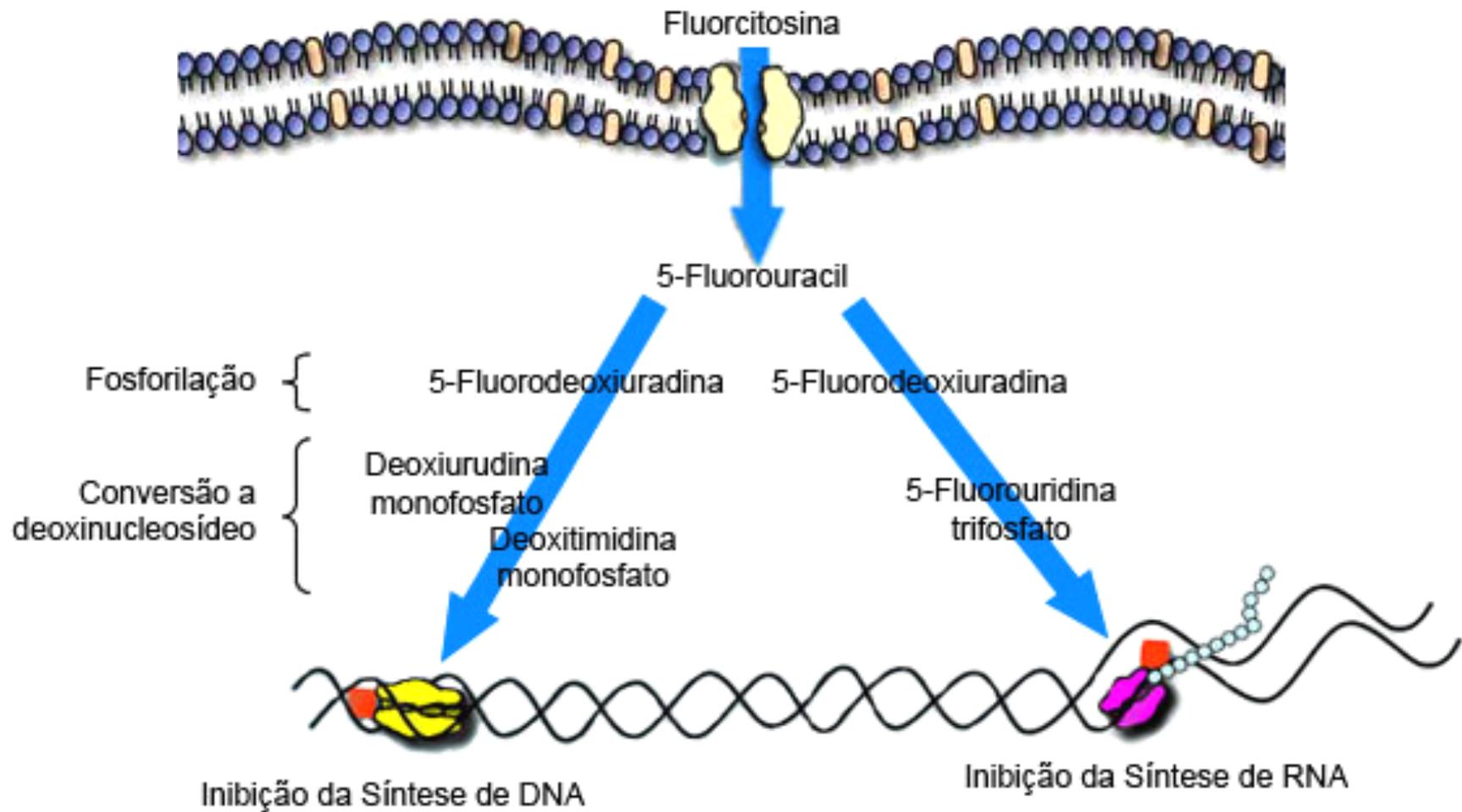
Caspofungina, Anidulafungina e Micafungina - São
similares - eficácia e segurança

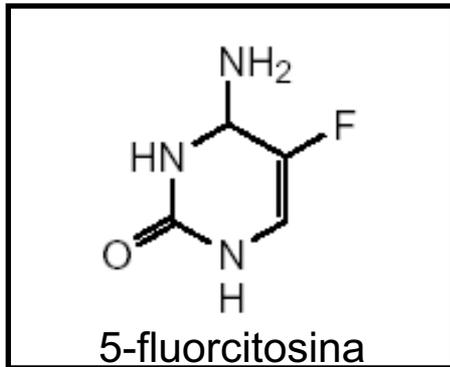
Antifúngico que inibe a síntese de ácidos nucleicos



Síntese DNA/RNA

- Análogos de Pirimidina
- 5- Flucitosina (5-FC)





Sintetizada em 1957 como agente anti-tumoral

1962 – atividade antifúngica

- Administração oral e intravenosa
- Espectro de ação restrito (*C. neoformans* e *Candida* sp.)
Monoterapia Limitada
Usada em combinação com Anfotericina B e fluconazol
- Resistência desenvolvida rapidamente durante o tratamento
- Resistência: Mutação da citosina permease e citosina deaminase



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos
Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos

Relação Nacional de Medicamentos Essenciais Rename 2006

PARECER DE EXCLUSÃO

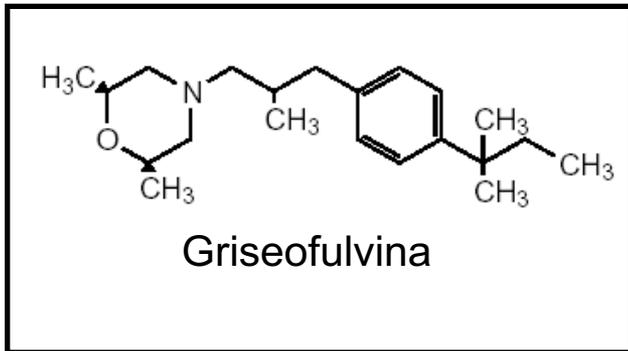
Comissão Técnica e Multidisciplinar de Atualização da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - Comare

FLUCITOSINA

Resistência primária ocorre em cerca de 10% das cepas de *C. albicans*. Resistência secundária é muito comum, tendo sido observada em até 30% dos pacientes,¹ pelo que a monoterapia com flucitosina foi abandonada. O uso deste fármaco justifica-se em associação com anfotericina B, com a qual apresenta sinergismo da ação, em infecções fúngicas graves causadas por *Cryptococcus neoformans*, *Candida sp* e algumas cepas de *Aspergillus*². No entanto, itraconazol apresenta eficácia para as mesmas indicações.

Entre os efeitos adversos destacam-se náuseas, vômitos, diarreia, sonolência e depressão medular que ocasiona anemia, leucopenia e trombocitopenia³. Oitenta por cento do fármaco são excretados em forma inalterada na urina, onde se atingem elevadas concentrações. Por isso, é preciso reajuste de esquema em insuficiência renal. Flucitosina foi retirada do mercado brasileiro pelo fabricante há mais de 12 anos. Por tais motivos, recomendou-se exclusão de flucitosina.

Ação sobre a organização dos microtúbulos



- Isolado de *Penicillium griseofulvum*
- 1º antifúngico descoberto (1939)
- Recomendação: tratamento das dermatofitoses
- Não é efetivo em infecções causadas por *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia* spp., *Aspergillus*, e outros

Inibe a função microtubular
(interfere na polimerização da tubulina)



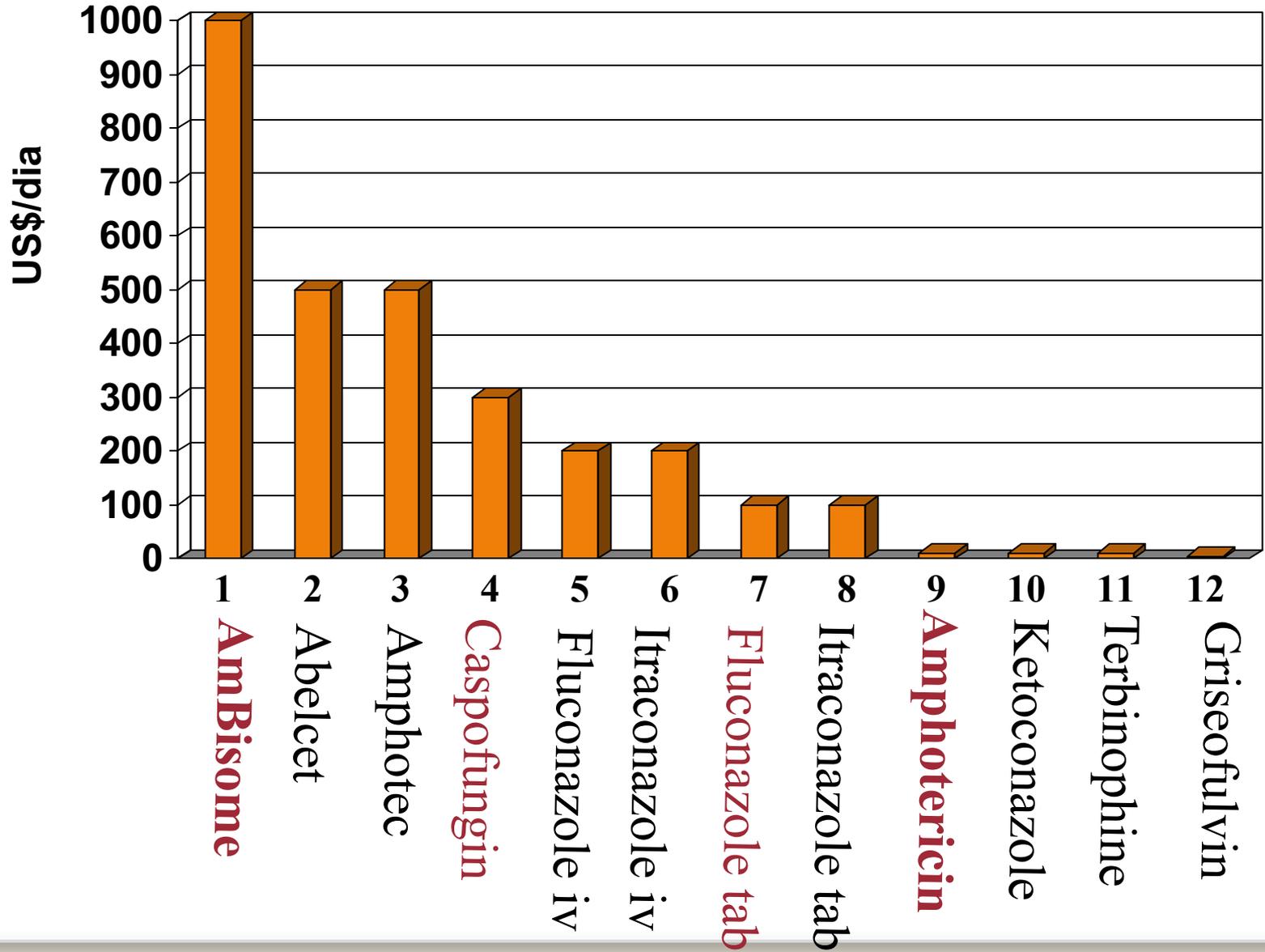
Inibe a divisão celular



Inibe o crescimento

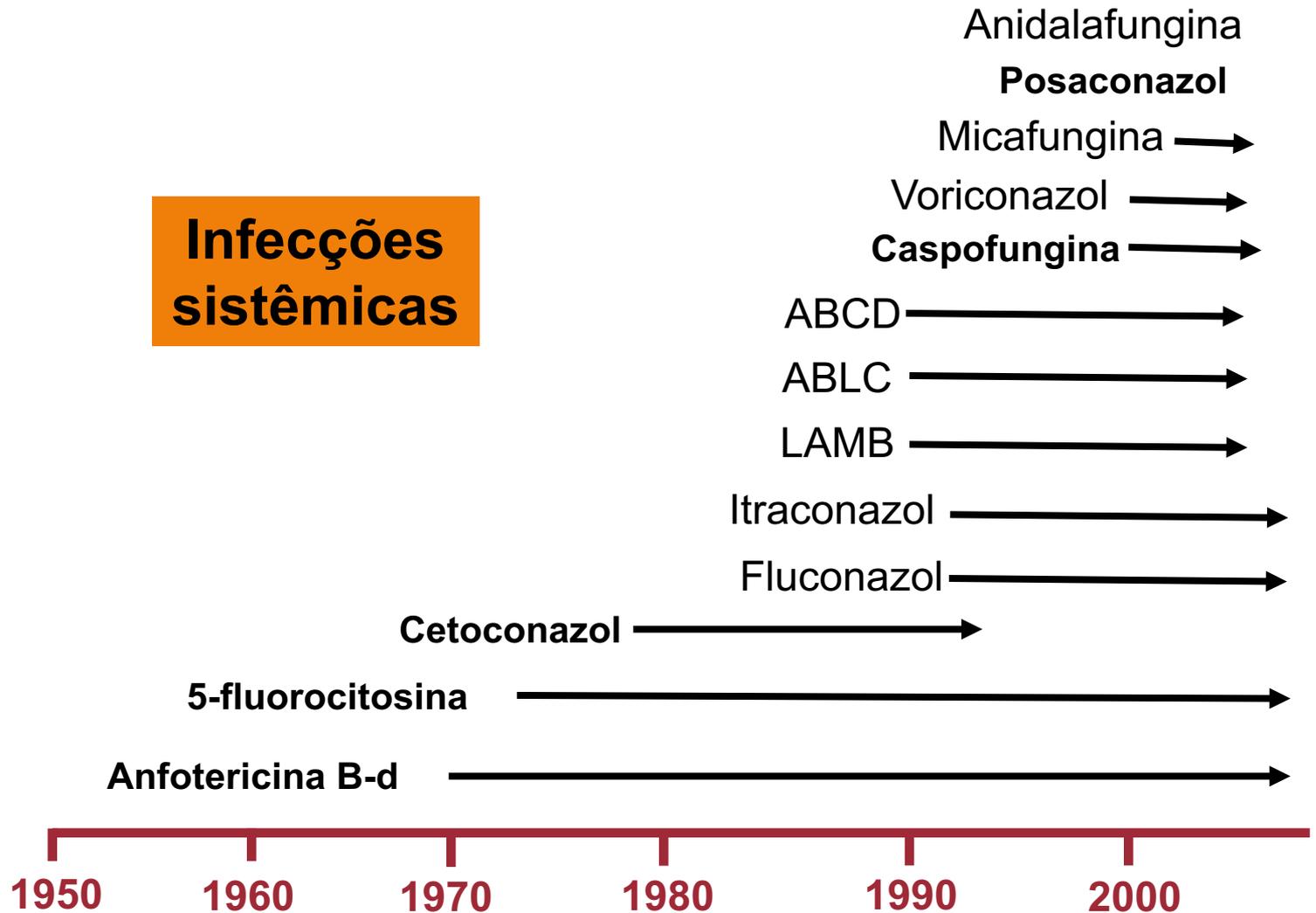


Custo da terapia antifúngica

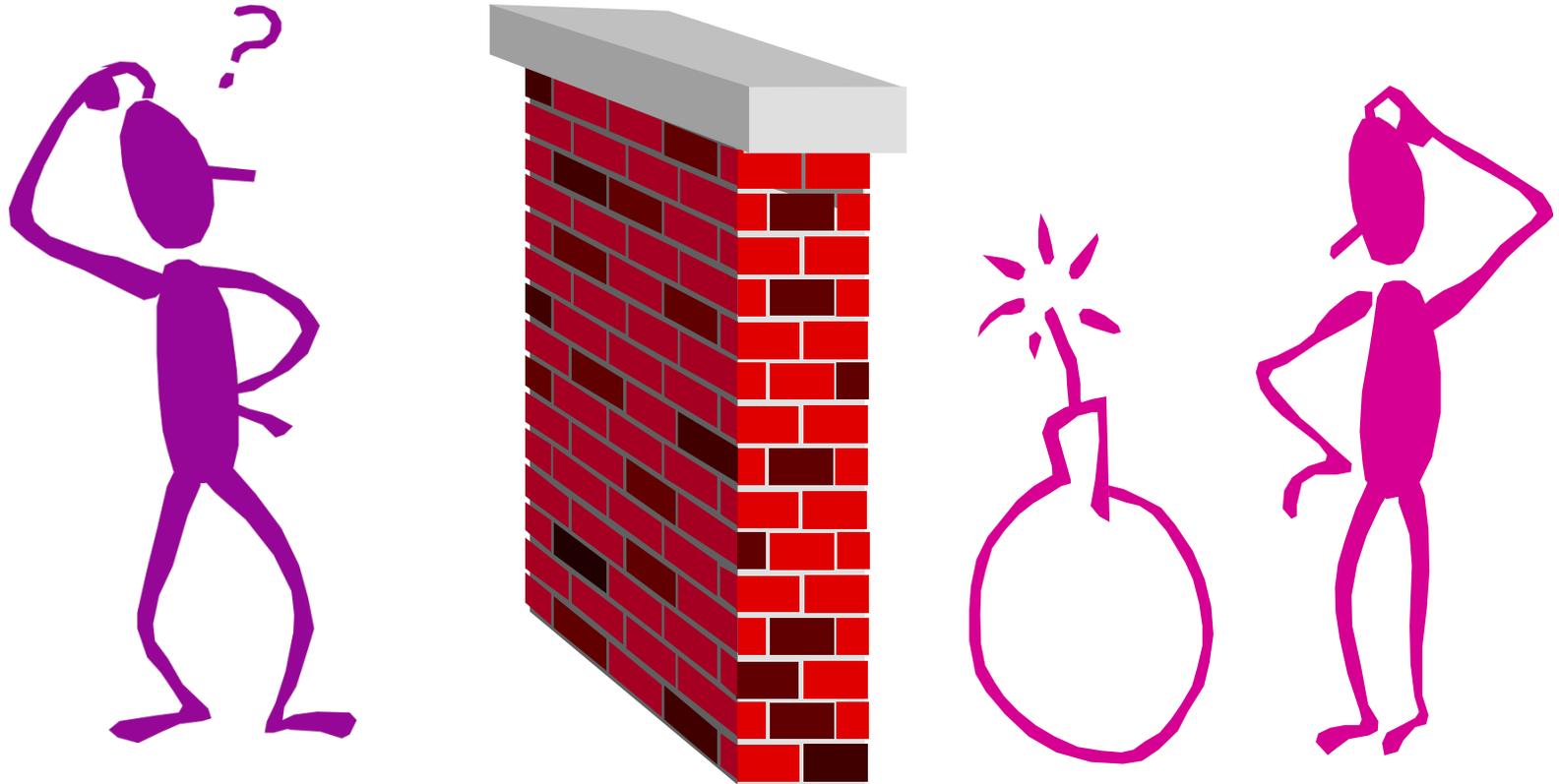


Evolução dos antifúngicos sistêmicos

Infecções sistêmicas



Resistência aos agentes antifúngicos



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

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”

- **Resistência clínica**

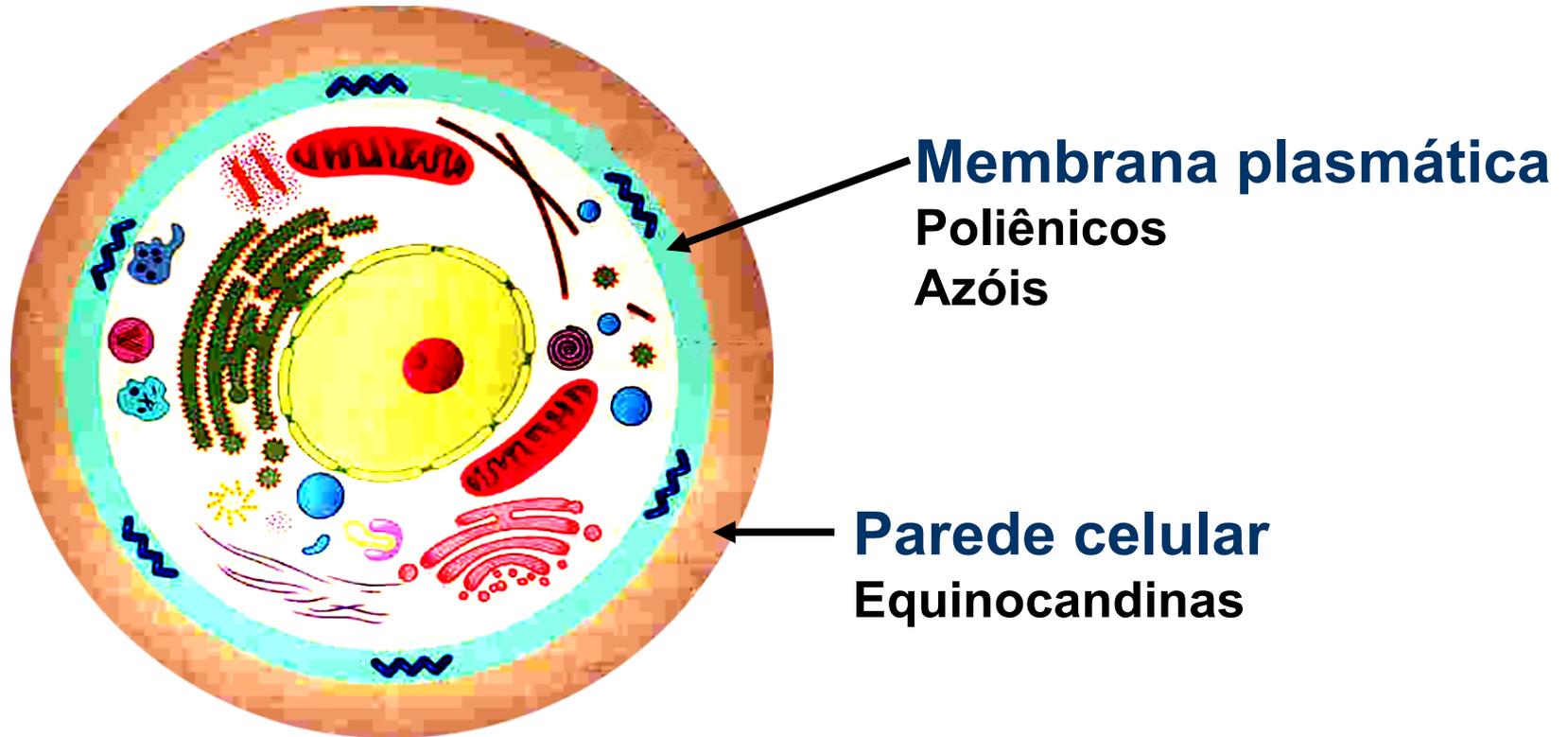
- Local da infecção
- Diagnóstico errado da doença
- Tratamento errado
- Farmacocinética desfavorável
- Dificuldade do paciente de se aderir ao tratamento

- **Resistência microbiológica** – relacionada com características do fungo

- Primária = Intrínscica (*C. krusei* ao fluconazol)
- Secundária = Extrínscica (*C. albicans* ao fluconazol)

Mecanismos de resistência aos antifúngicos

Antifúngicos



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*

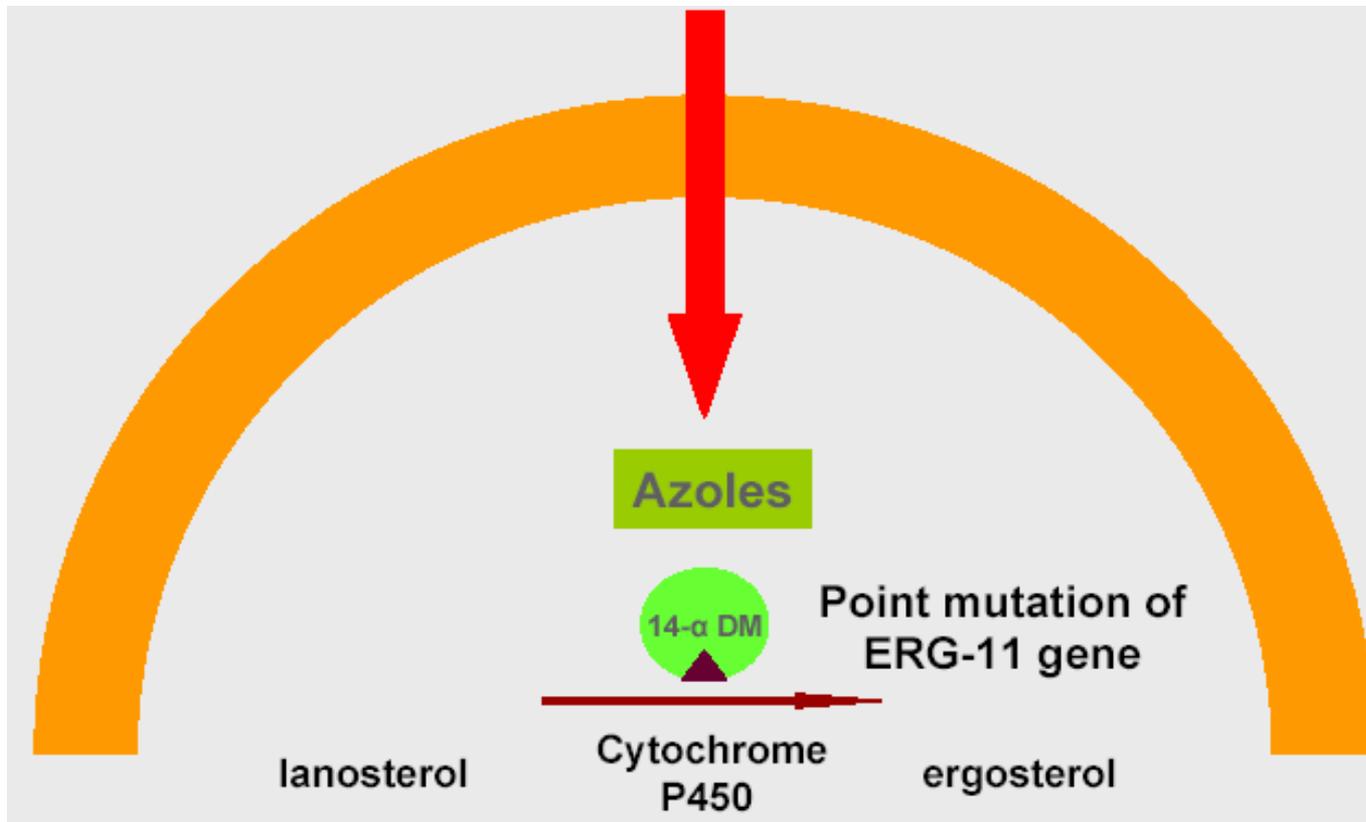
Resistência secundária: *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*

Resistência é rara.

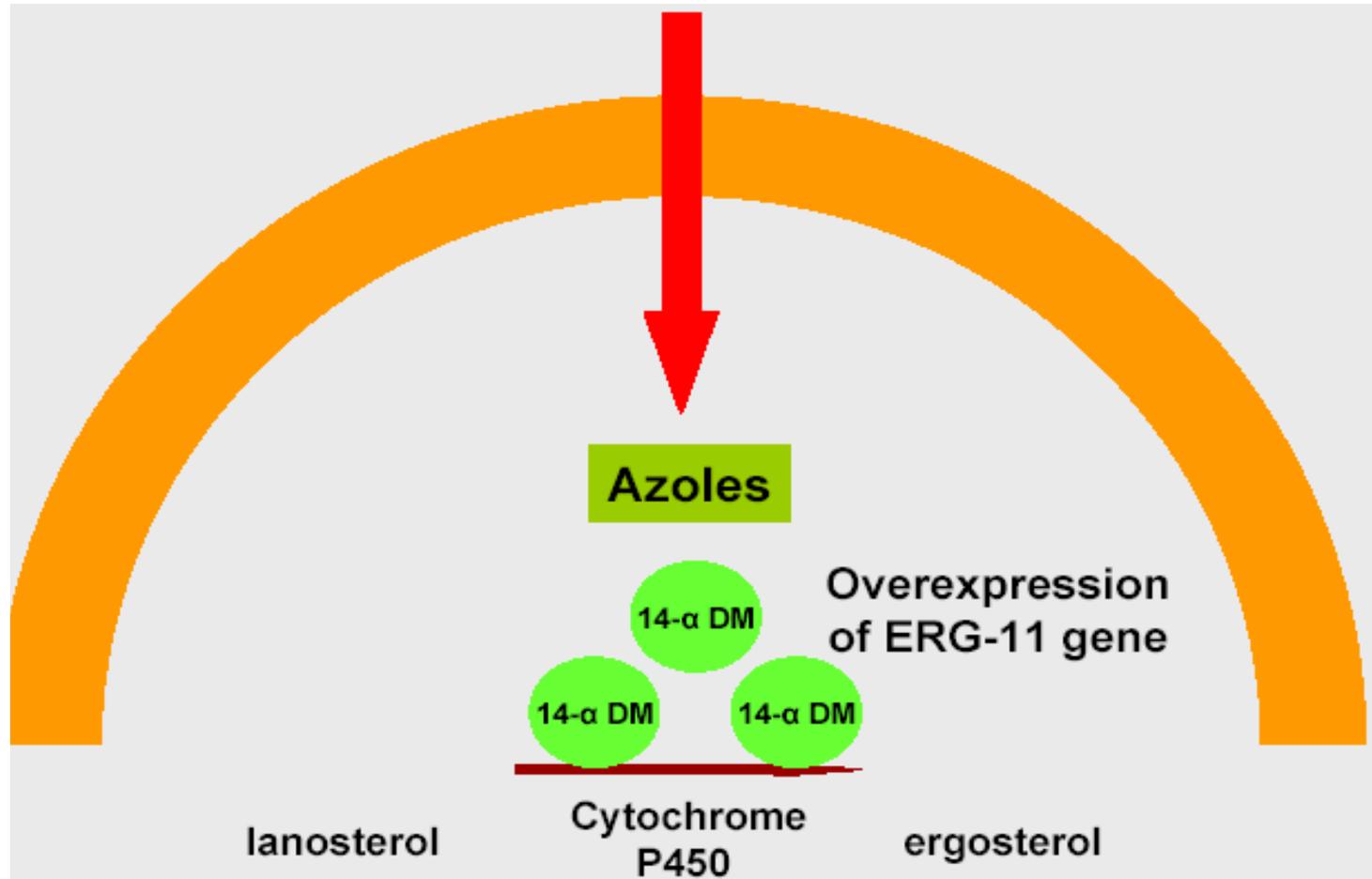
Resistência *Candida* spp. CIM > 1 µg/mL

Mecanismos de resistência aos azóis

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

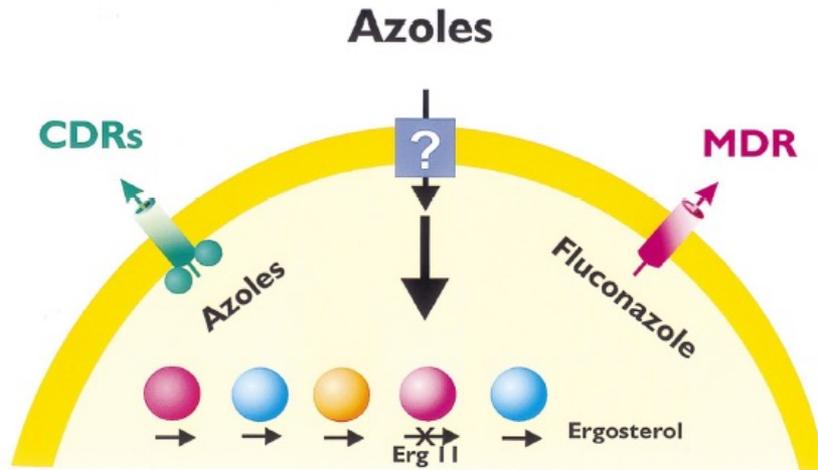


Aumento da expressão da C14- α - lanosterol demetilase

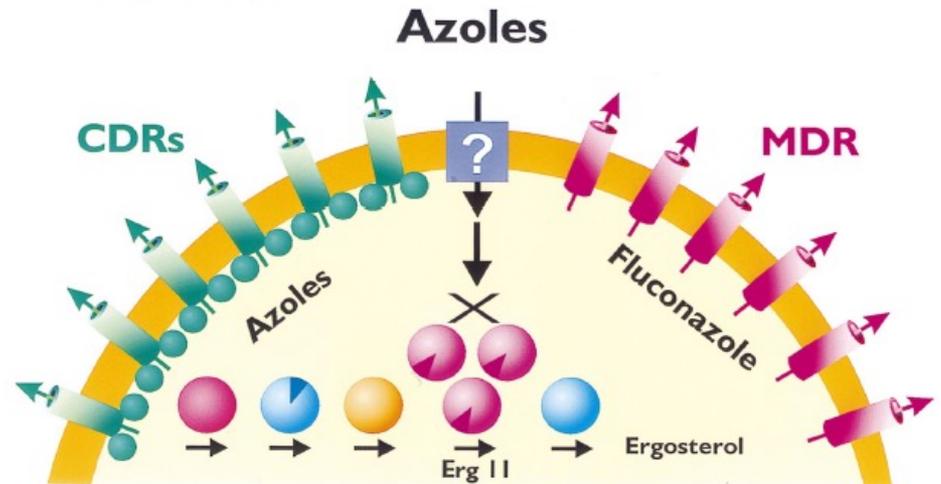


Aumento de bombas de eflujo

SUSCEPTIBLE

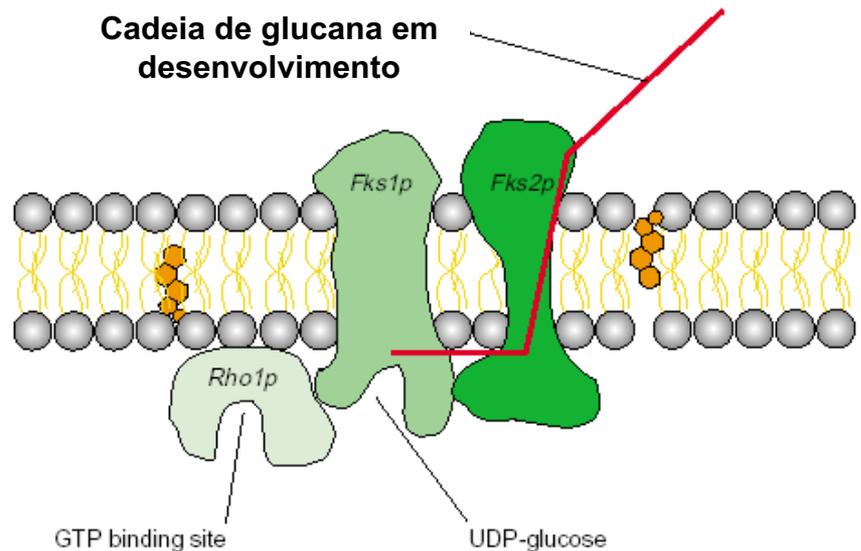


RESISTANT



Resistência às equinocandinas

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



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.



(Formerly NCCLS)

Comitês

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

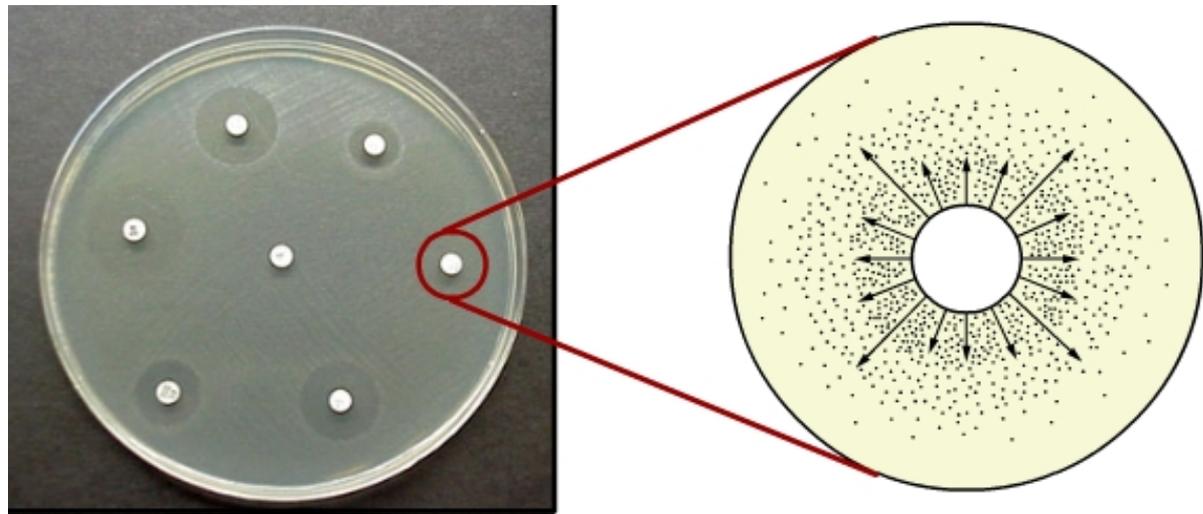
1. Padronização das técnicas
2. Critérios para interpretação dos resultados
3. Parâmetros para o controle qualidade

- 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

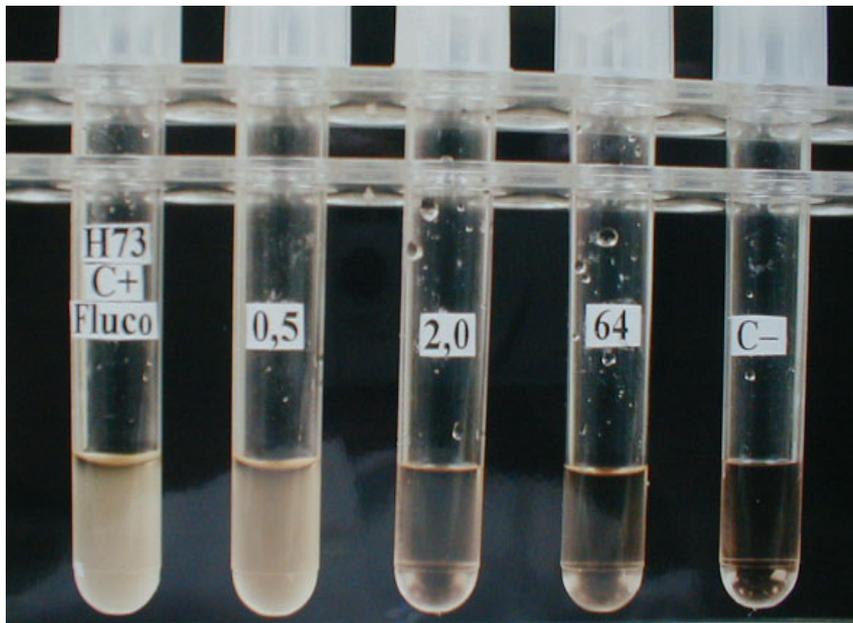
Técnica de difusão em ágar– Documento **44-A2** (CLSI, 2004).
Candida spp.

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

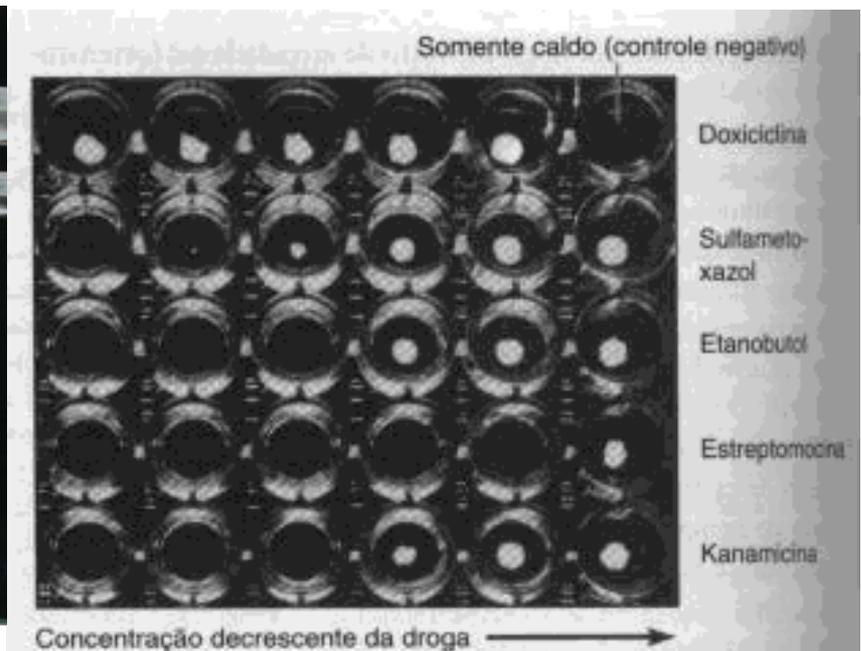


Diluição em caldo

- Técnica de diluição em caldo
 - Leveduras - documento M27-A3 - CLSI, 2008
 - Filamentoso – documento M38-A2 – CLSI, 2008
 - CIM – inibição de 50 e 90-100% do crescimento fúngico



Macrodiluição



Microdiluição

E teste[®] - bioMérieux

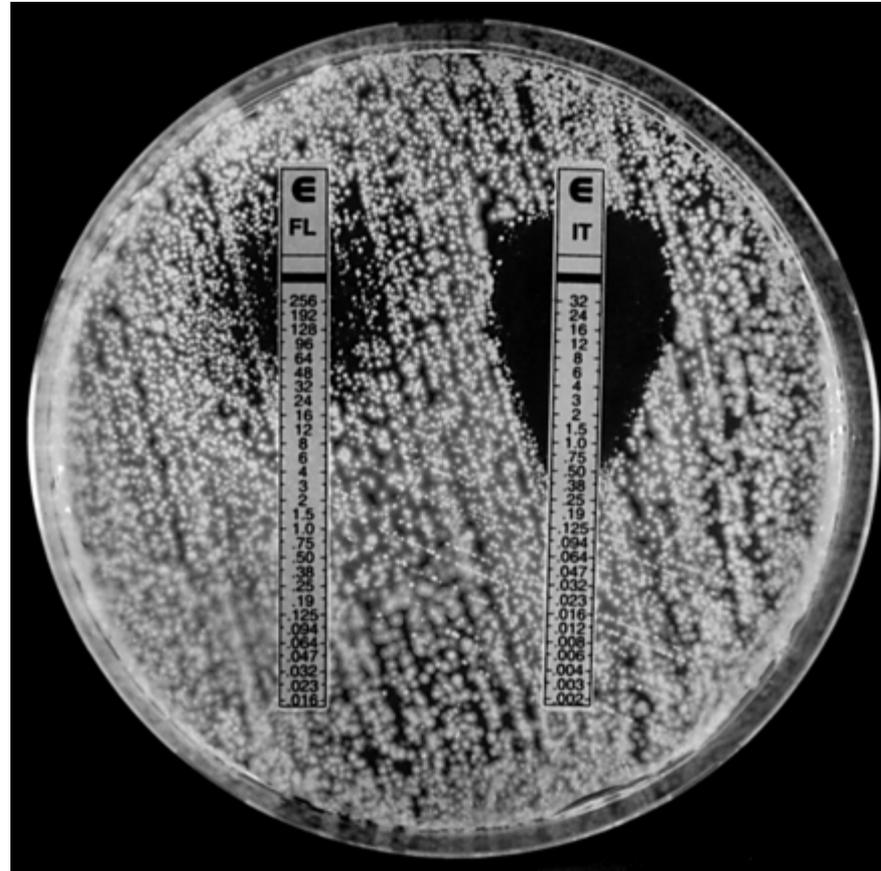


Figure 1

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

Automação

Identificação e testes de susceptibilidade e resistência



Vitek 2 bioMérieux

<http://www.biomerieux.com.br/>

Sensititre YeastOne (TREK Diagnostic Systems)

