

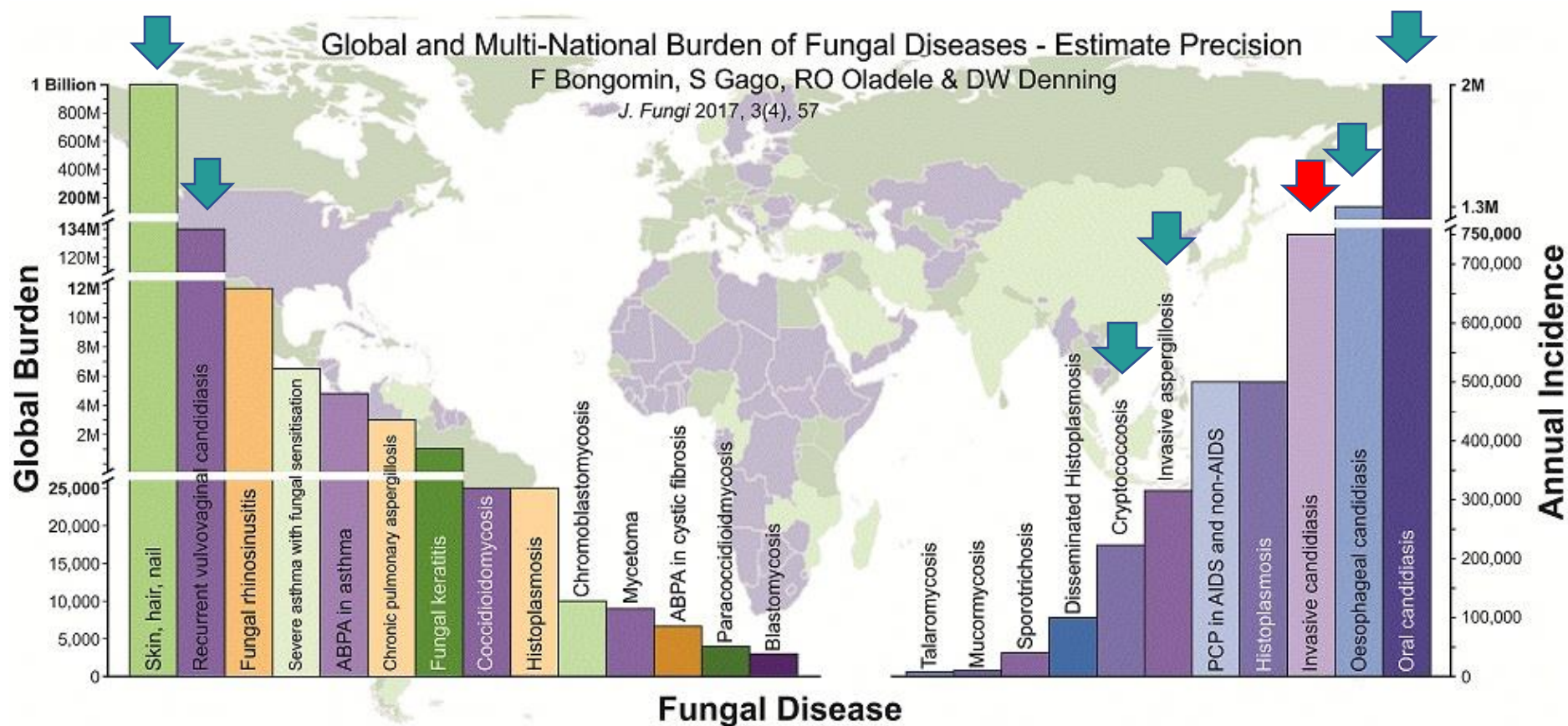
Antifúngicos: mecanismo de ação e de resistência

Kelly Ishida

Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade de São Paulo



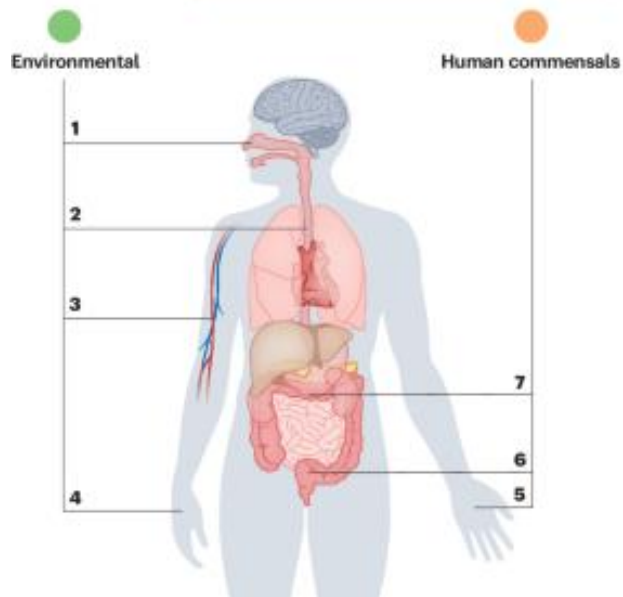
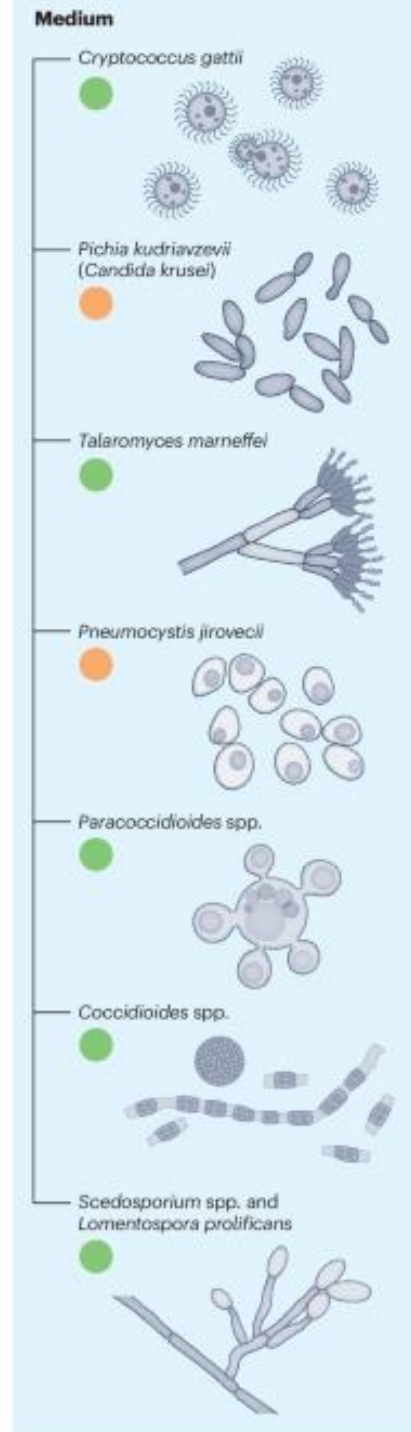
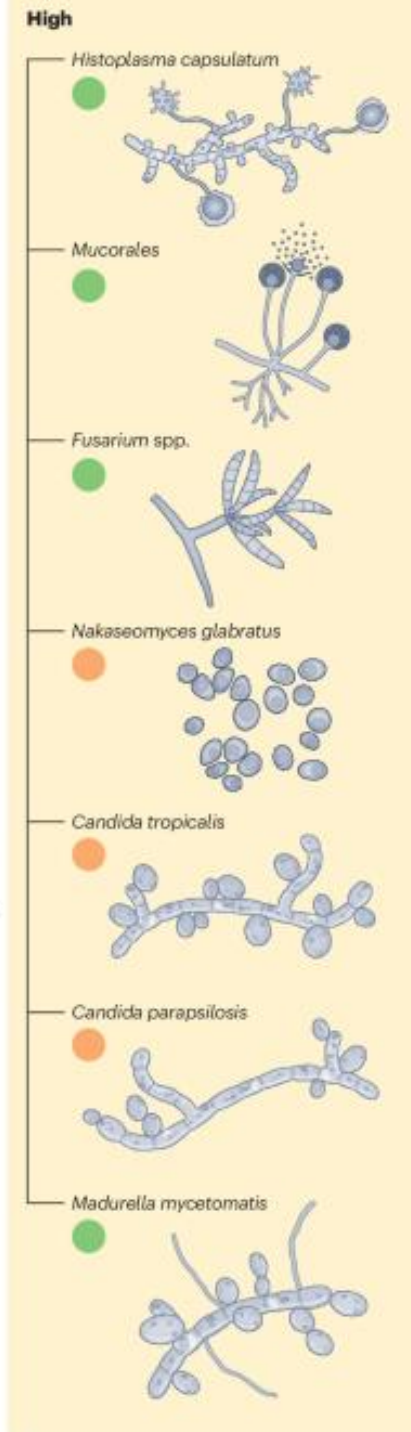
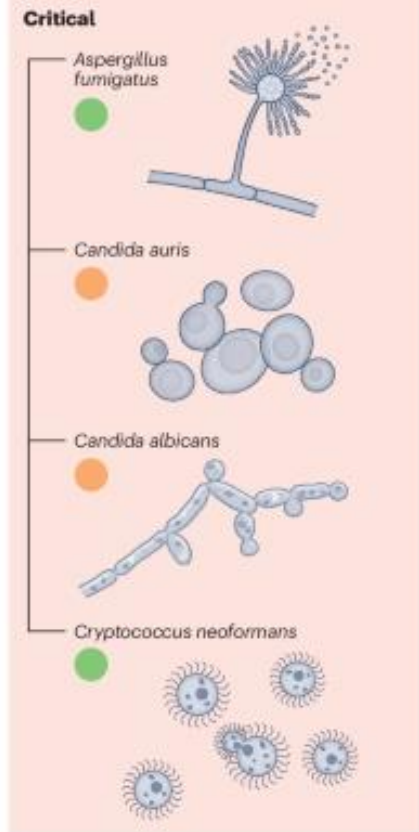
Infecções fúngicas



- Mais de 1,7 bilhões – Infecções fúngicas
- Mais de 2 milhões - Infecções fúngicas invasivas (IFIs)
- Altas taxas de mortalidade (70-95%)

Classificação das micoses

Micose	Tecido	Agentes etiológicos
Superficial	Extrato córneo do tecido epitelial, pelo e cabelo	<i>Malassezia</i> spp. <i>Hortaea werneckii</i> <i>Piedraia hortae</i> <i>Trichosporon</i> spp.
Cutânea	Porções queratinizadas da pele, pelo e cabelo	<i>Trichophyton</i> spp. <i>Microsporum</i> spp. <i>Epidermophyton floccosum</i>
Subcutânea	Derme, músculos e tecido conjuntivo	<i>Sporothrix</i> spp. <i>Fonsecaea pedrosoi</i> e outros
Sistêmica	Inicia-se com uma infecção pulmonar podendo atingir qualquer órgão	<i>Paracoccidioides</i> spp. <i>Histoplasma</i> spp. <i>Coccidioides</i> spp., <i>Blastomyces</i> spp.
Sistêmica Oportunista	Qualquer tecido	<i>Candida</i> spp., <i>Cryptococcus</i> spp. <i>Pneumocystis jirovecii</i> <i>Aspergillus</i> spp., <i>Fusarium</i> spp. <i>Rhizopus</i> spp., <i>Mucor</i> spp.



Lista de patógenos fúngicos prioritários da OMS para orientar pesquisa, desenvolvimento e ação de saúde pública



<https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>

Brown, G.D., Ballou, E.R., Bates, S. *et al.* The pathobiology of human fungal infections. *Nat Rev Microbiol* **22**, 687–704 (2024)

Antifúngicos

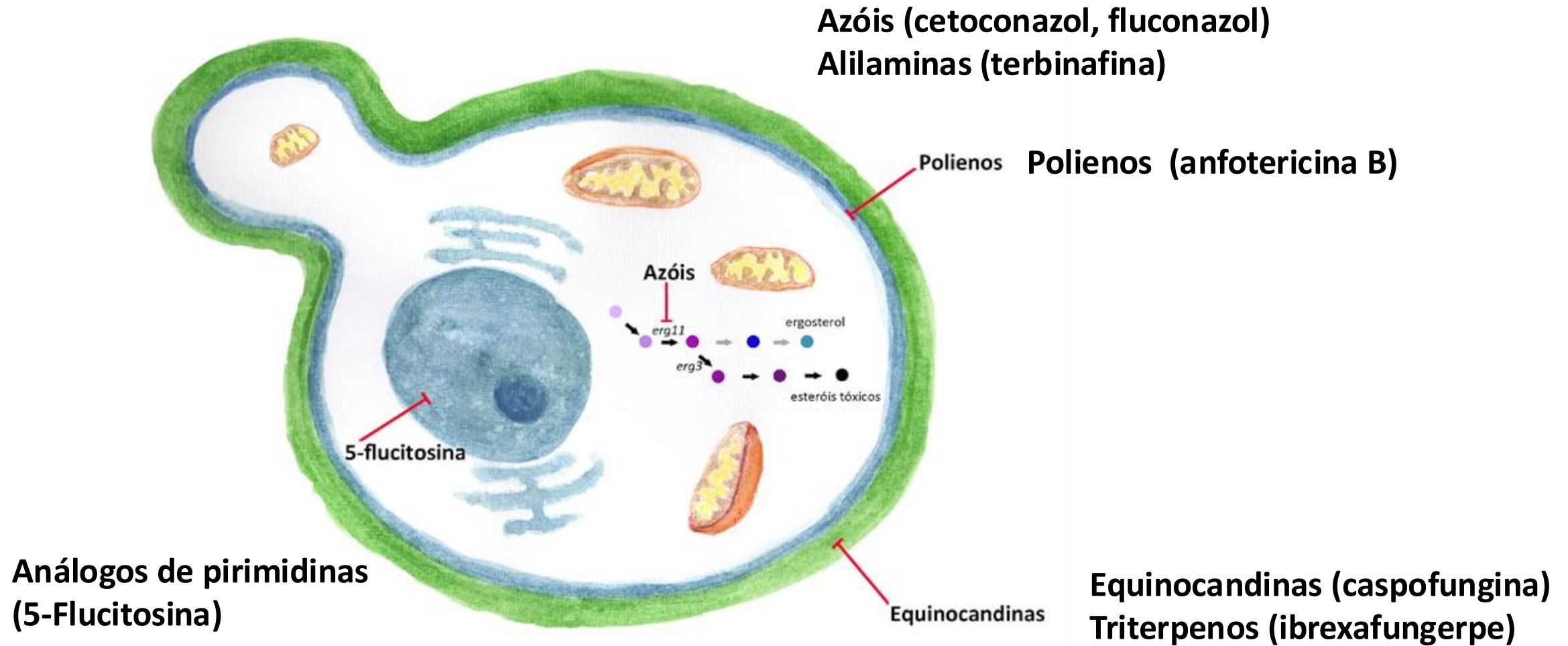
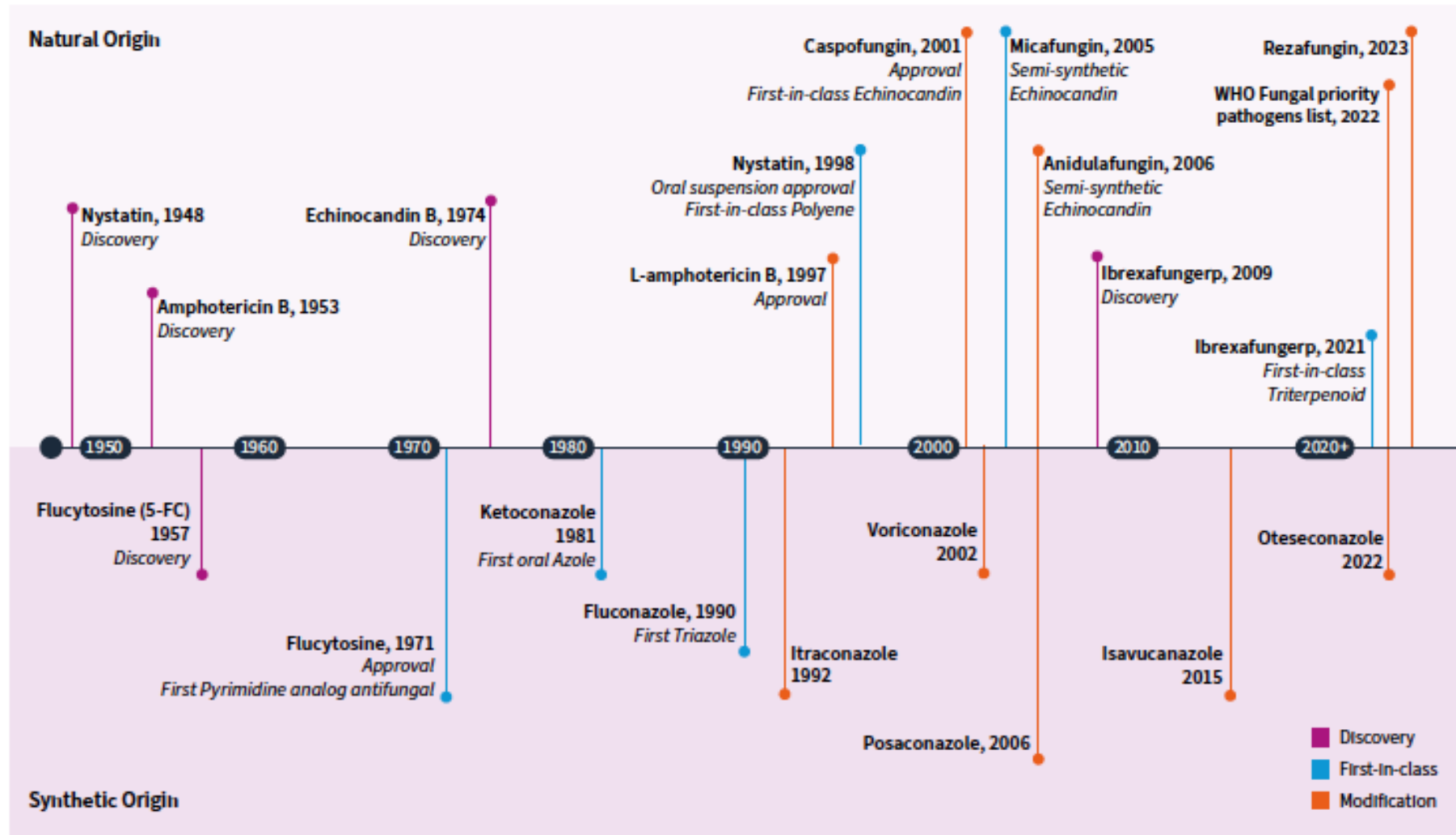


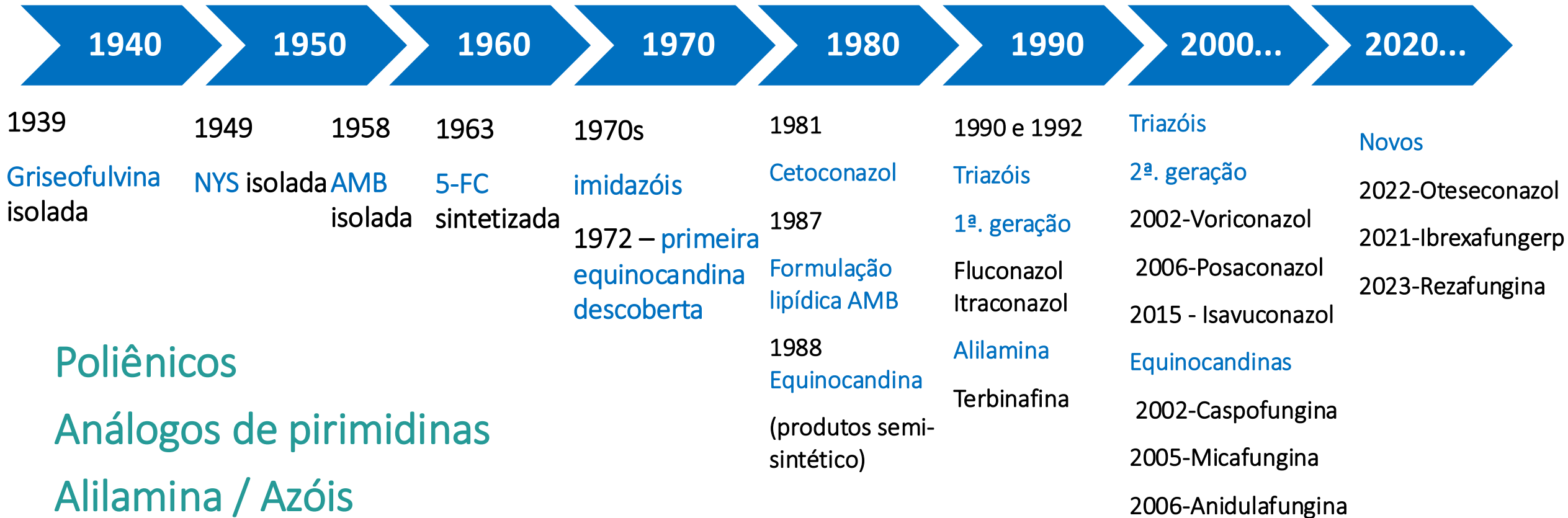
Fig. 2. Historical overview of systemic antifungal drugs and their marketing authorization



Note: The above timeline does not include antifungal agents approved for topical use, or any agent found on a discontinued drug product list.



Histórico dos Antifúngicos



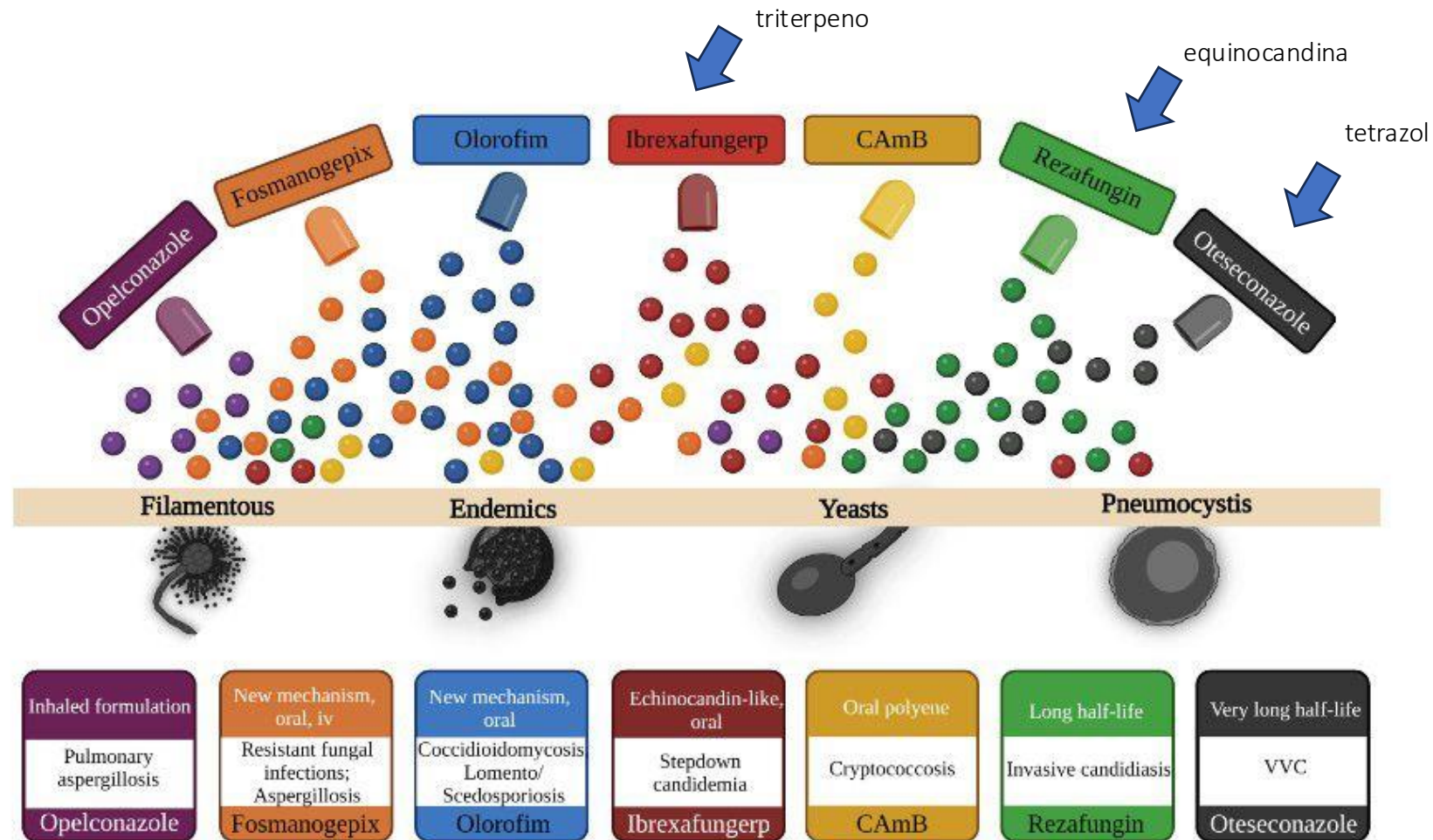
Poliênicos

Análogos de pirimidinas

Alilamina / Azóis

Equinocandinas / Triterpenos

Novos Antifúngicos

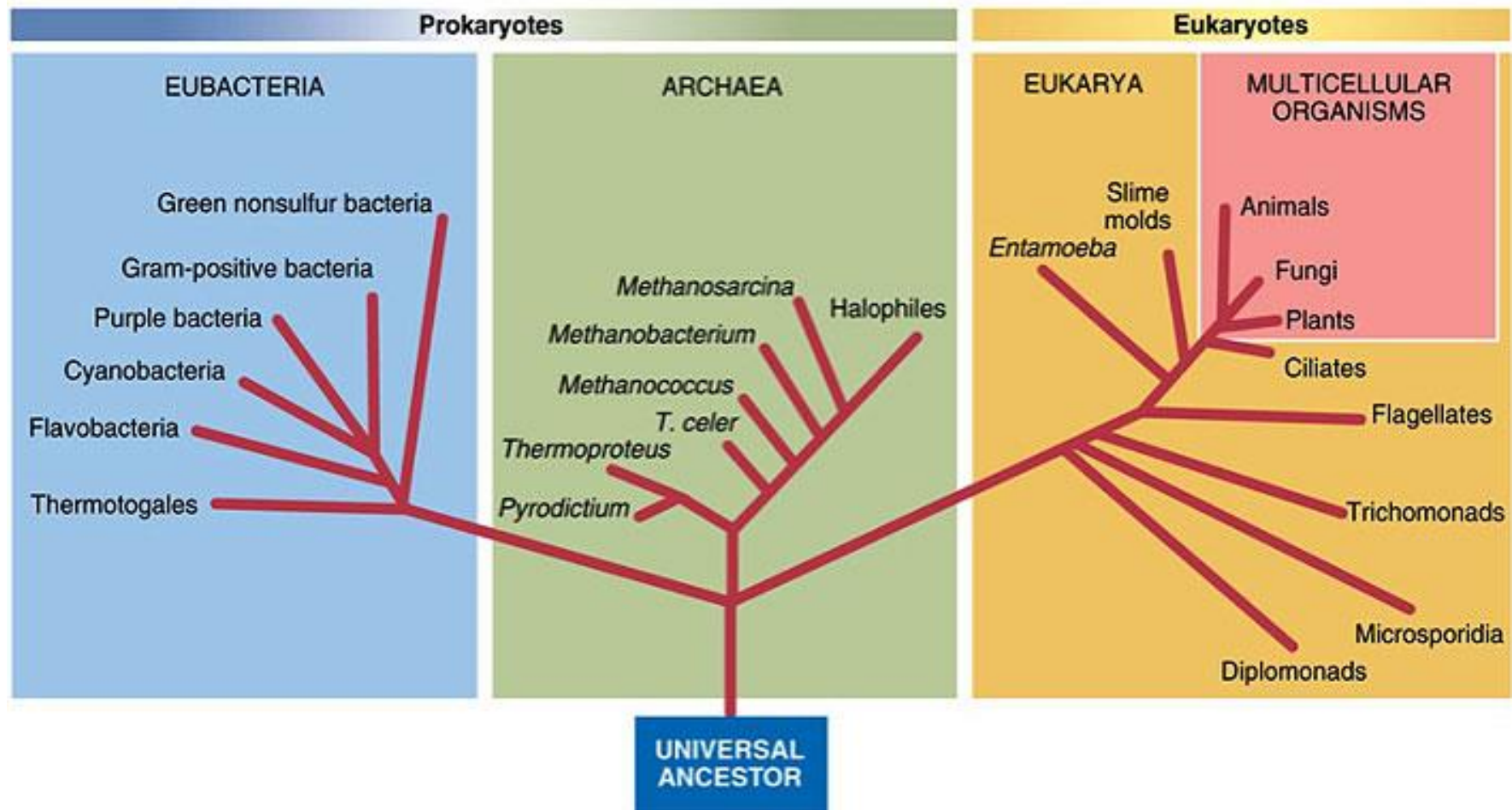


➔ Aprovado pelo FDA

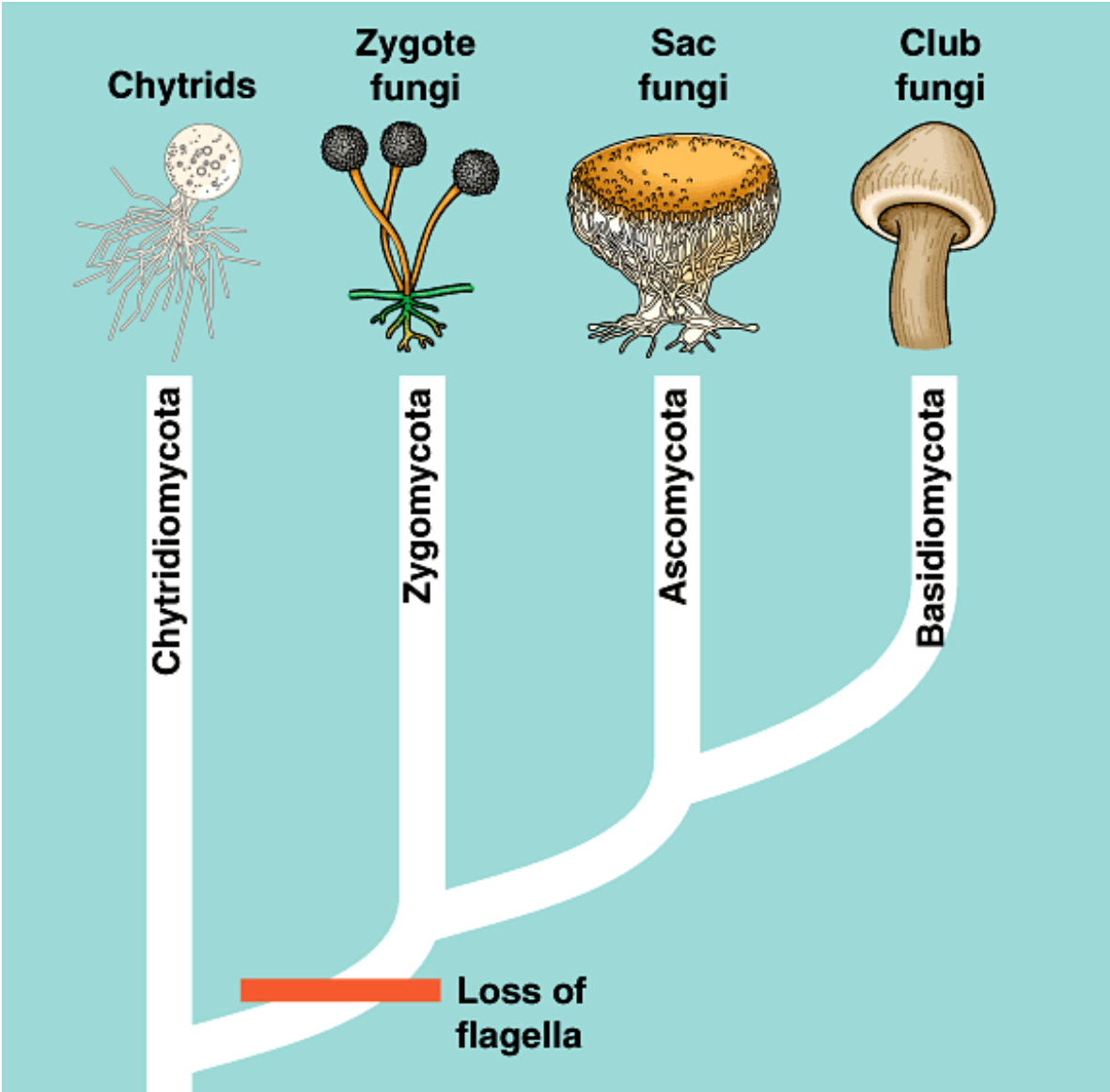
Hoening et al., 2024

<https://doi.org/10.1128/cmr.00074-23>

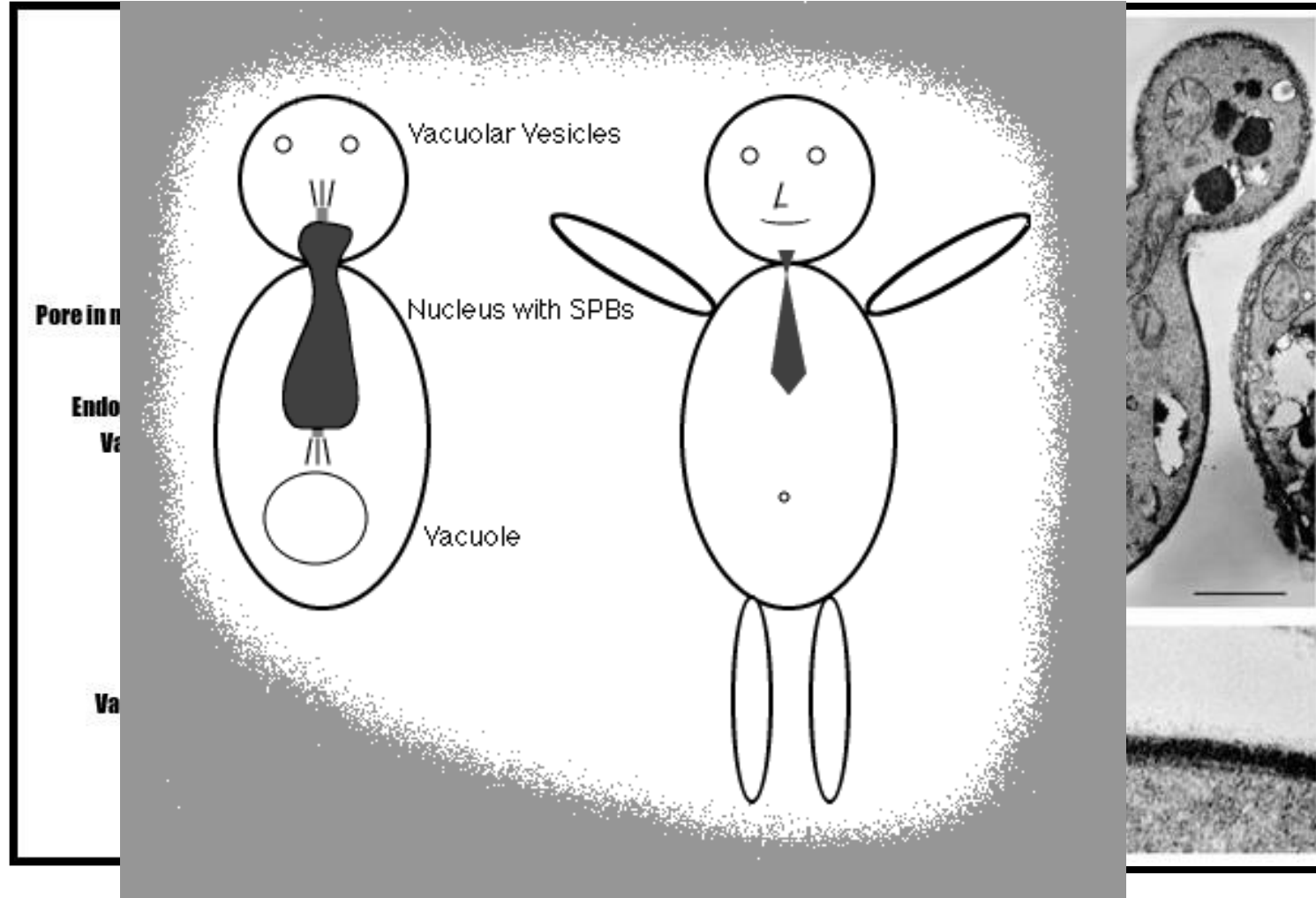
Domínio dos seres vivos



Filos



A célula fúngica



Alvos para a quimioterapia antifúngica

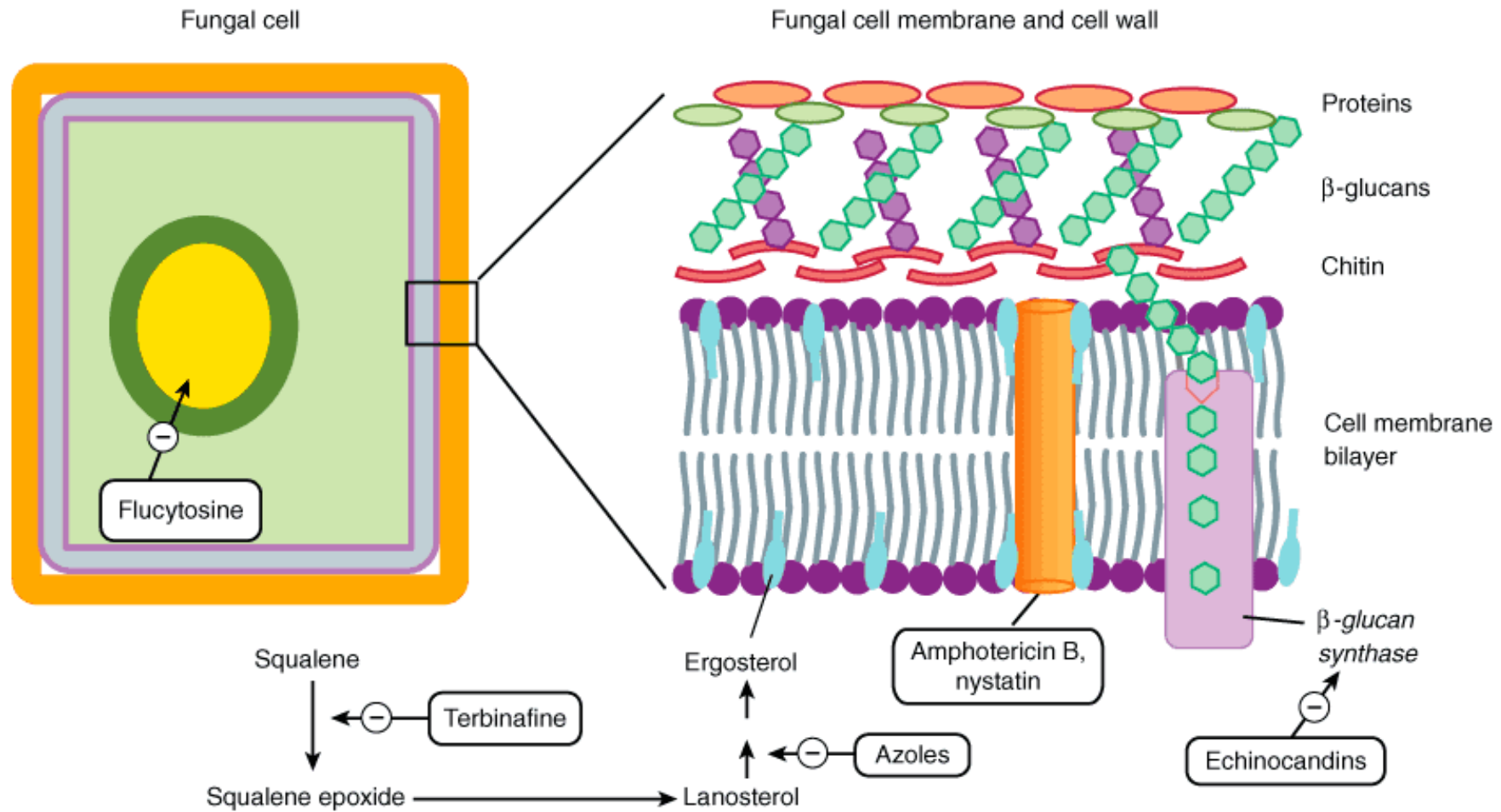


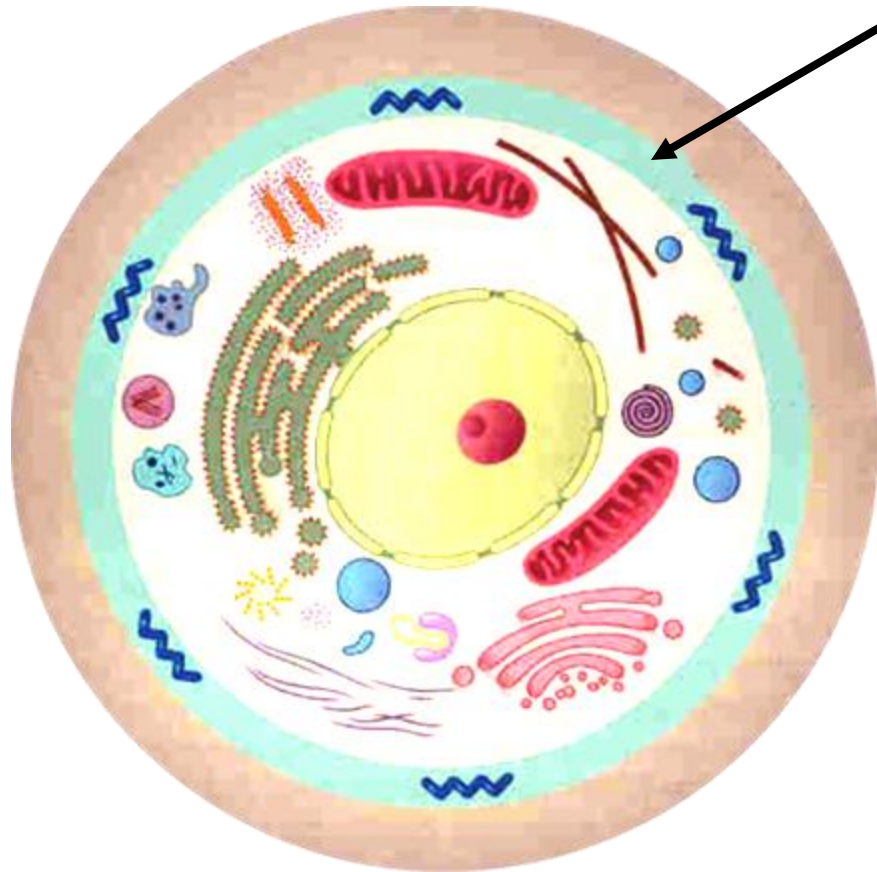
Figura: <https://microbiologyinfo.com/mode-action-antifungal-drugs/>

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 e de resistência

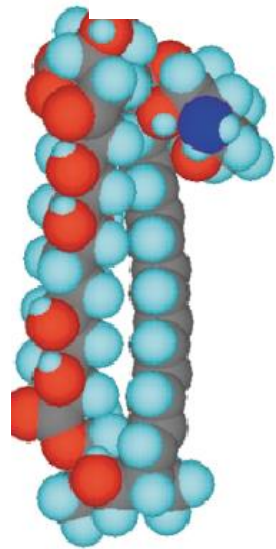
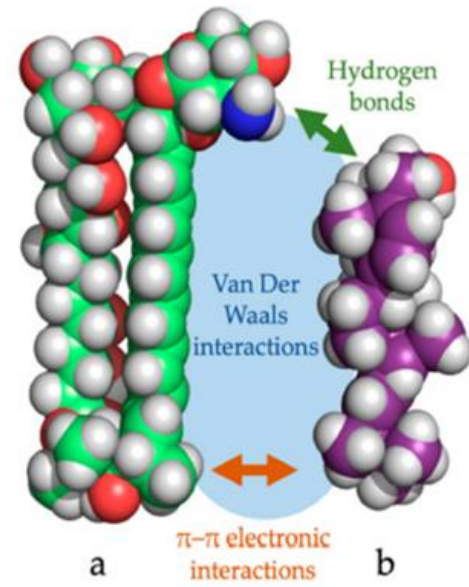
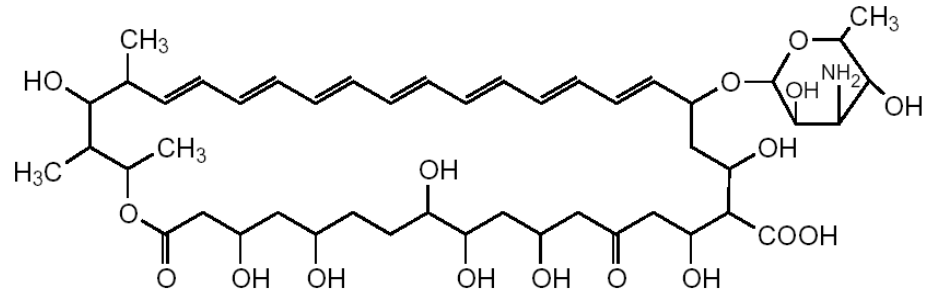
Antifúngicos que agem na membrana celular



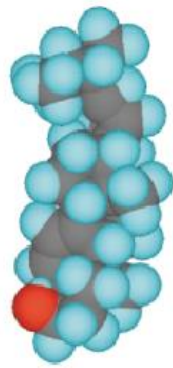
Membrana celular

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

Agentes poliênicos (Anfotericina B e nistatina)



Anfotericina B

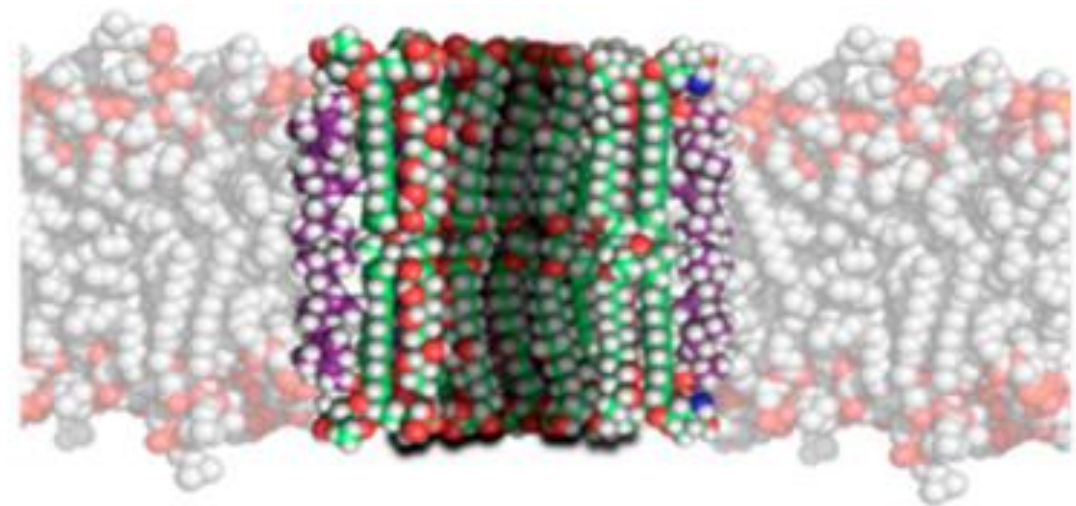


Ergosterol



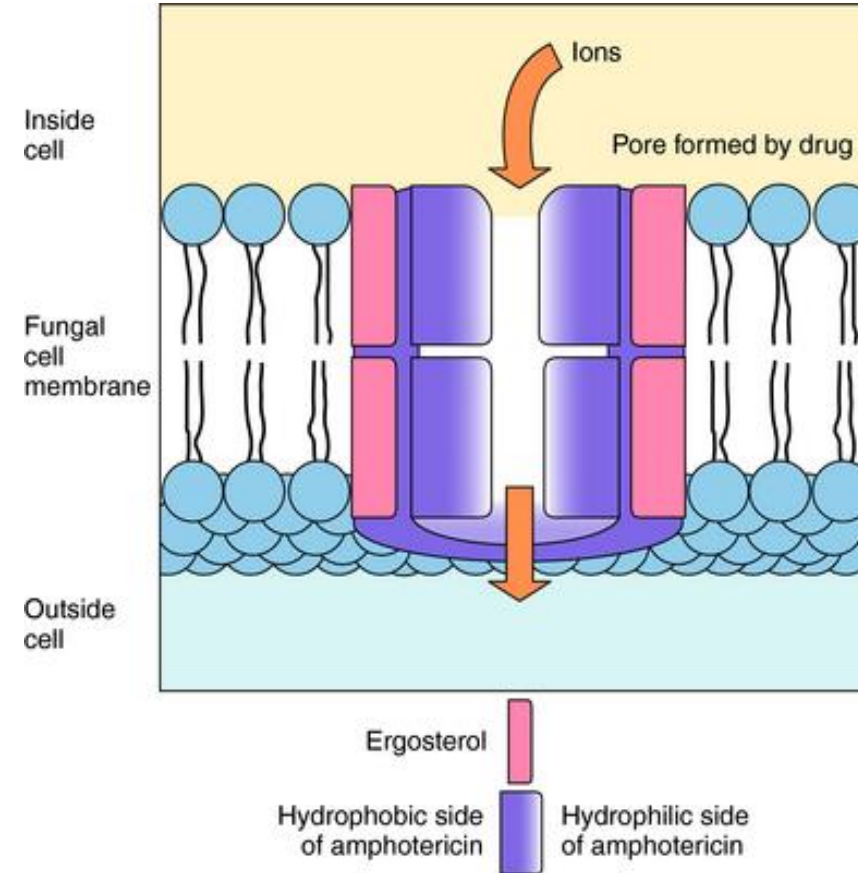
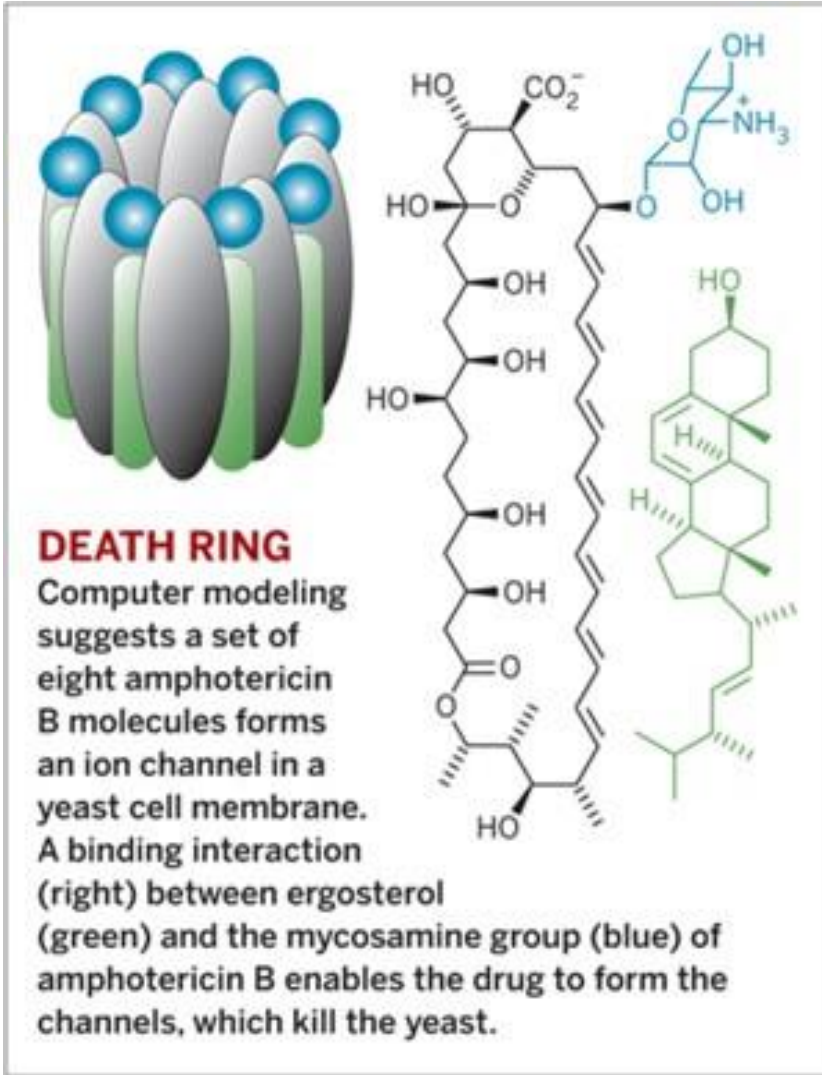
Colesterol

TRENDS in Microbiology



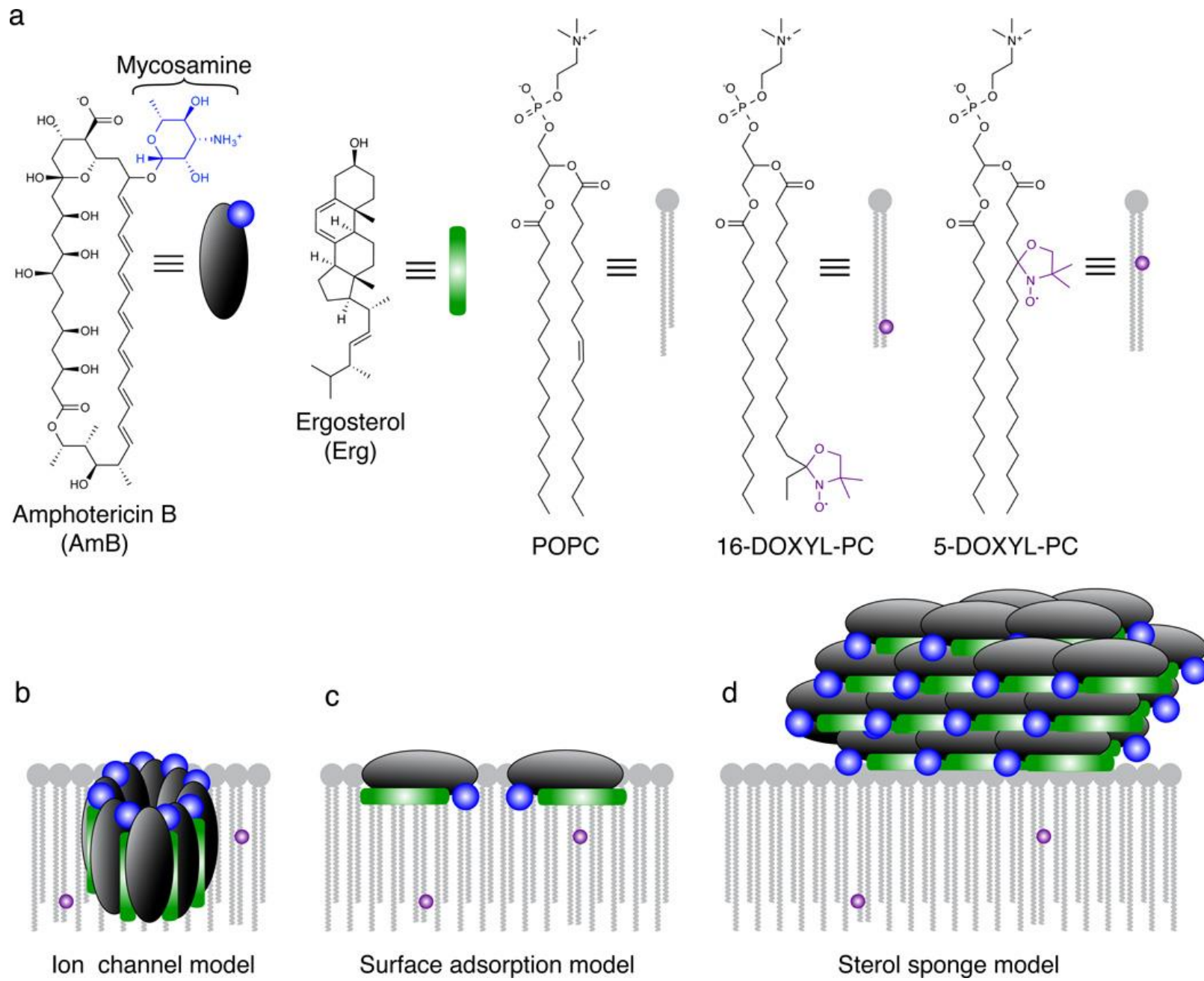
Carolus et al. *J. Fungi* 6, 321, 2020.

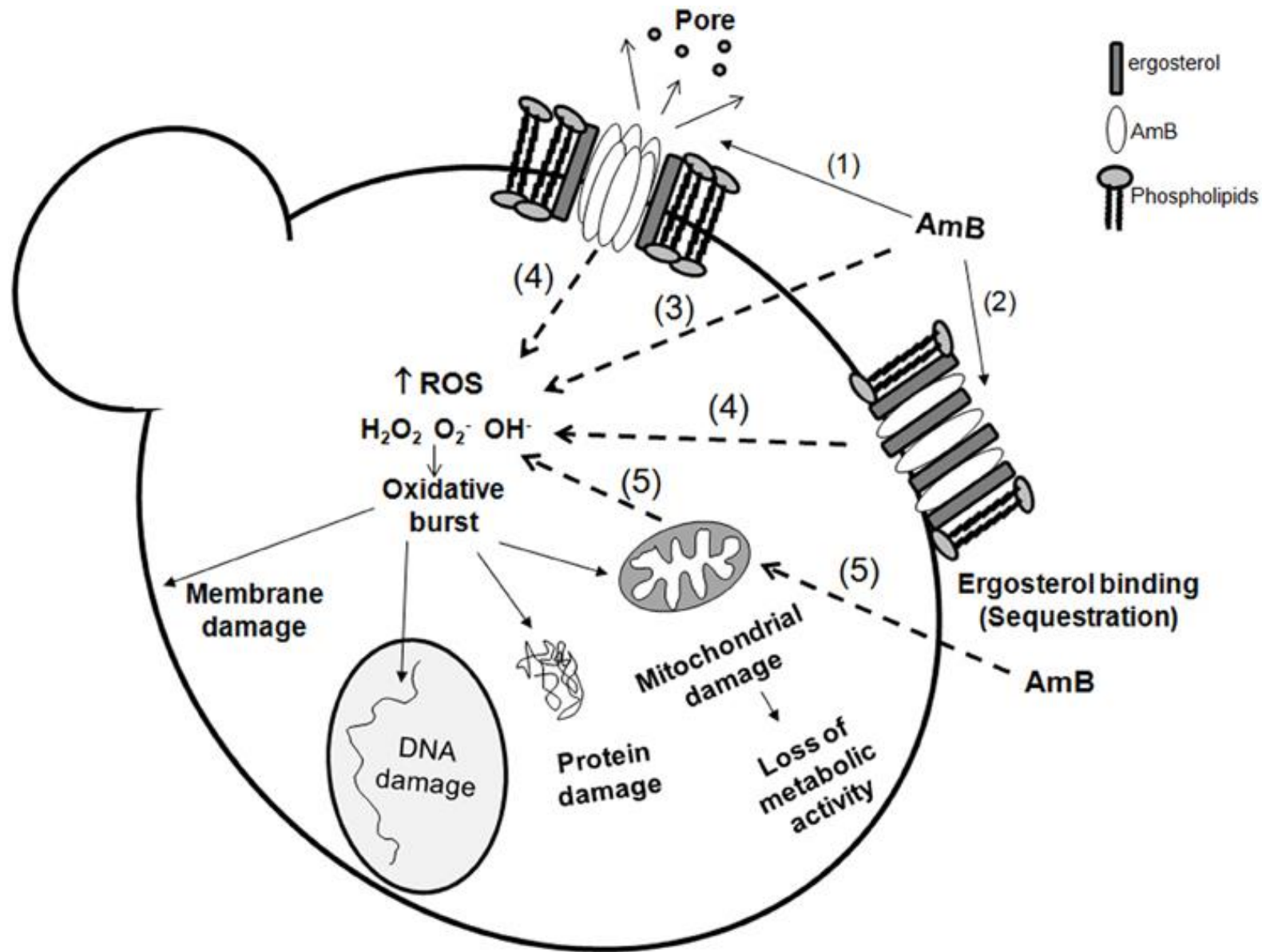
Odds et al. *TRENDS in Microbiology*, 11: 272-279, 2003.



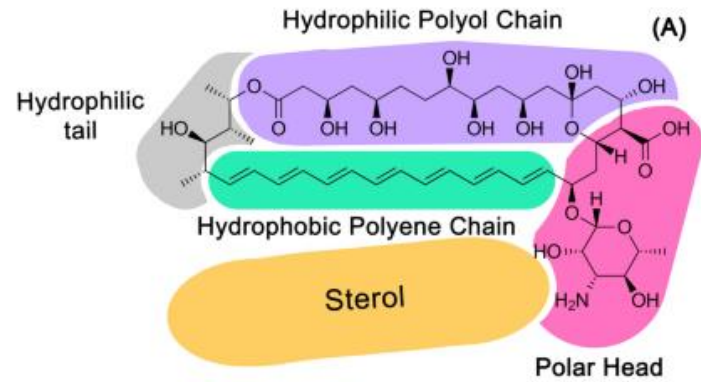
<https://doi.org/10.1073/pnas.1015023108>

<https://clinicalgate.com/antifungal-agents/>





Amphotericin-B + Sterol Binding



Antifungal Class:
Polyenes

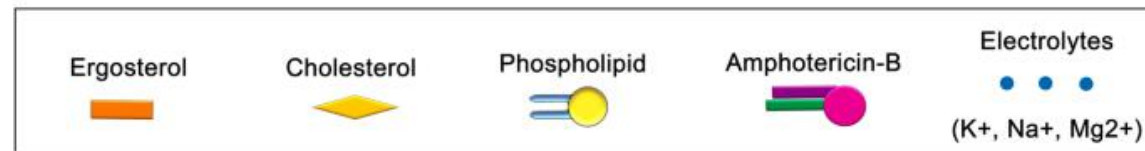
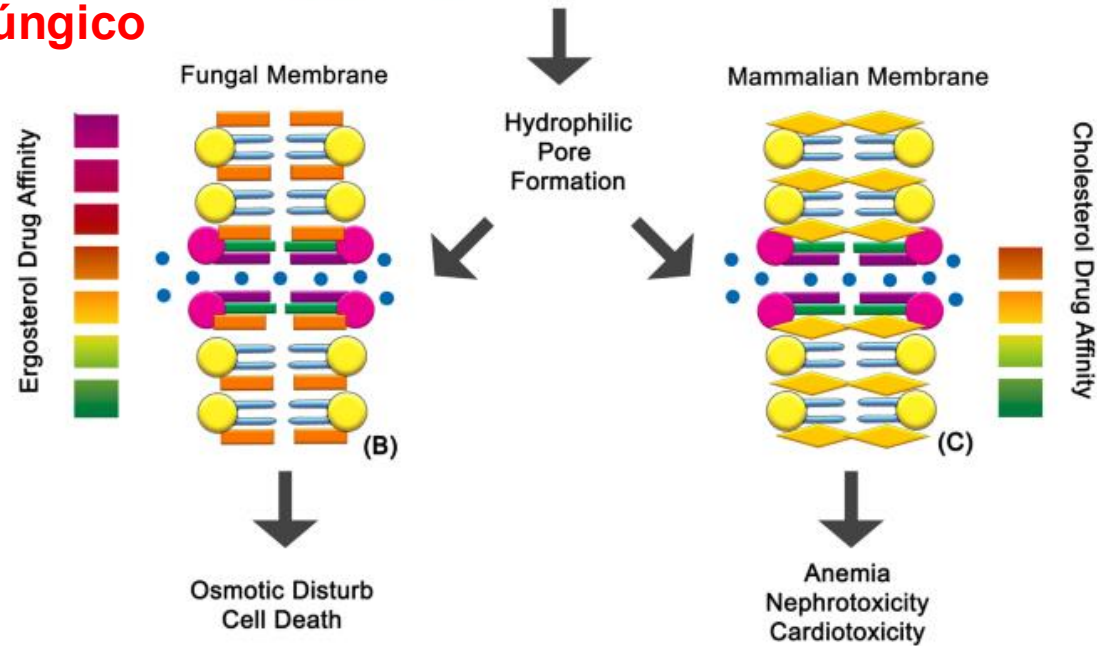
Molecular Formula:
C₄₇H₇₃NO₁₇

Molecular Weight:
924.1 g/mol

CAS Number:
1397-89-3

Efeito antifúngico

Efeito Tóxico



Nistatina

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

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 ação para:

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

- Formulação Tópica e Endovenosa

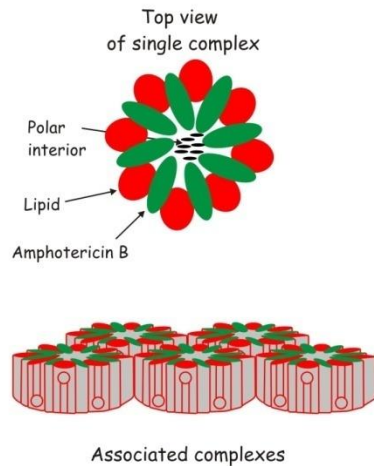
- Efeitos adversos:

Agudos - febre, calafrio, vômito, náusea, cefaléia

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

Formulações lipídicas da anfotericina B

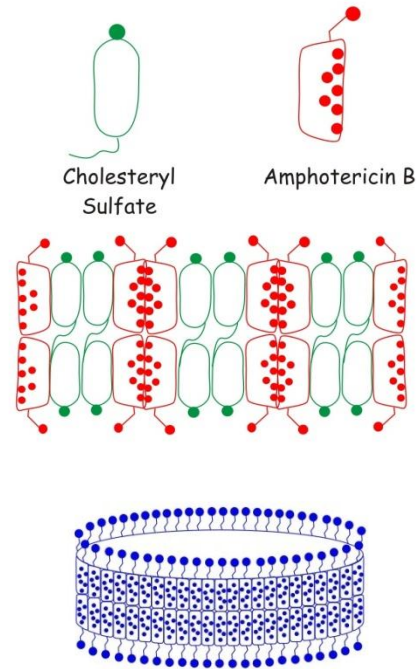
Abelcet[®] ABLC Complexo lipídico



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

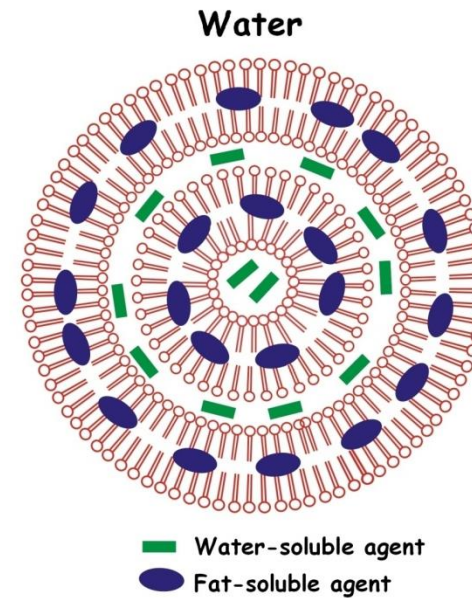
DMPC-Dimyristoyl phosphatidylcholine
DMPG- Dimyristoyl phosphatidylglycerol

Amphotec[®] ABCD Dispersão coloidal



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

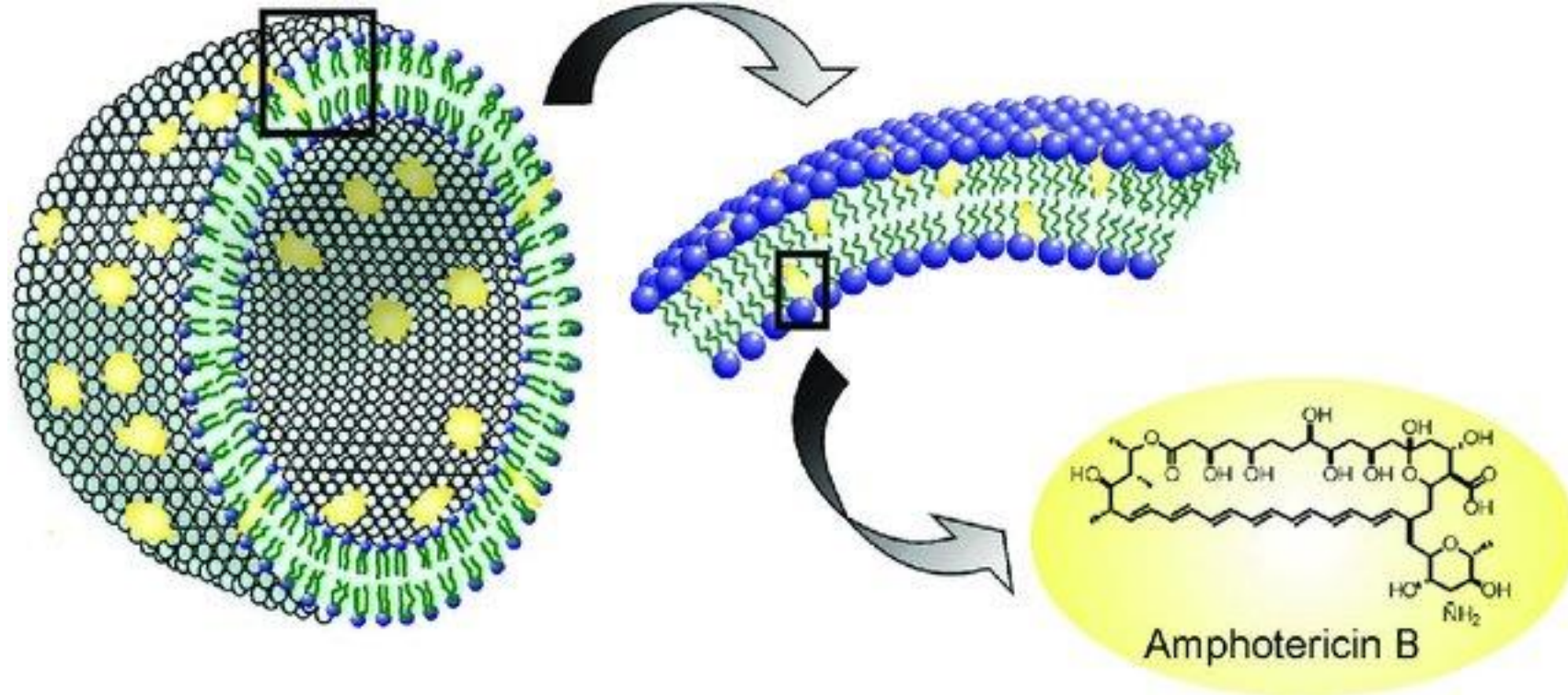
Ambisome[®] L-AMB AMB lipossomal



Unilamellar liposome
Carrier lipids: HSPC, DSPG, cholesterol
Particle size (µm) : 0.08

HSPC-Hydrogenated soy phosphatidylcholine
DSPG-Distearoyl phosphatidylcholine

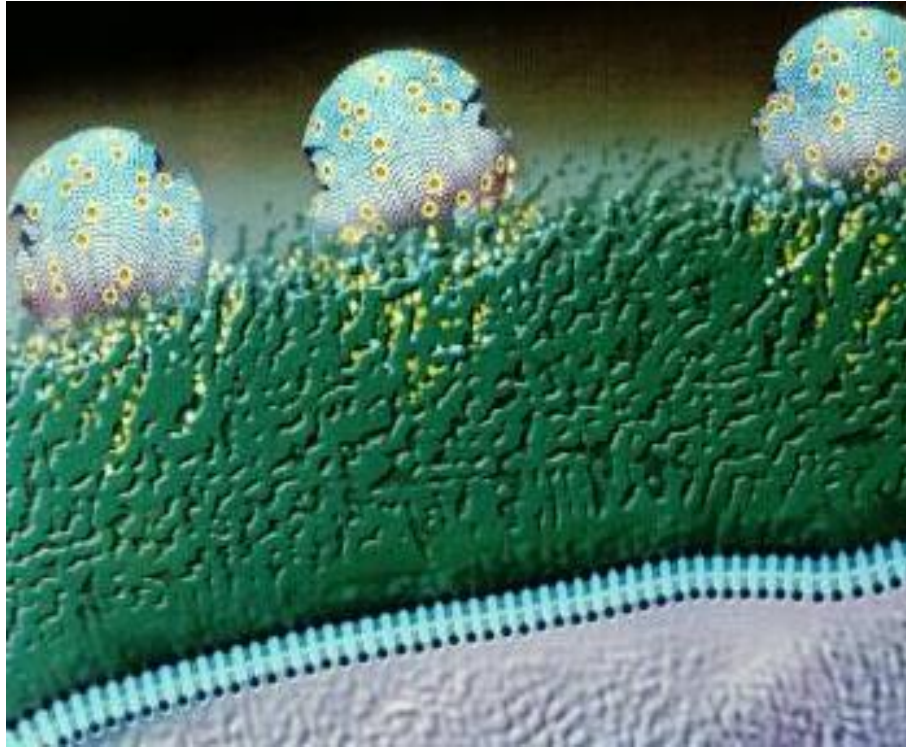
Ambisome[®] L-AMB
AMB lipossomal



**Eficácia semelhante a AMB
desoxicolato**

↓↓ **Efeitos colaterais**

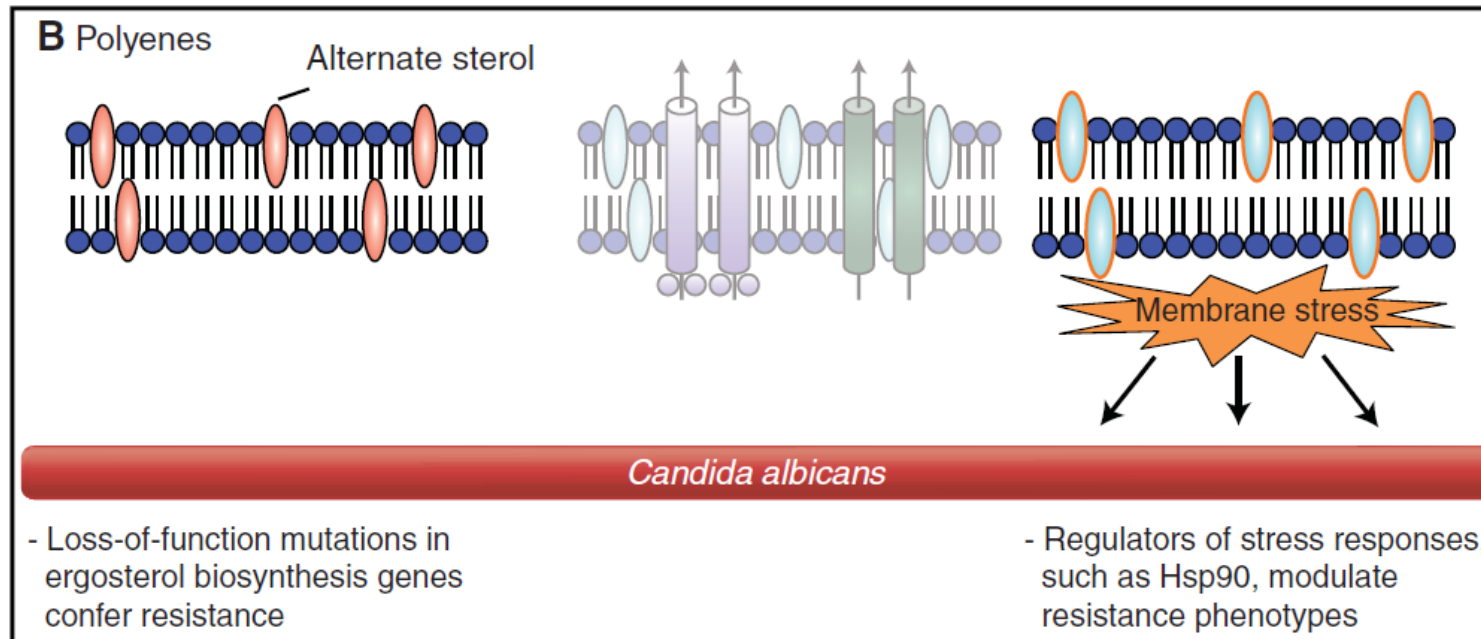
AMB lipossomal



- ✓ Maior afinidade pela célula fúngica
- ✓ Menor toxicidade, por impedir liberação nas células do hospedeiro
- ✓ Permite maior dosagem e tempo de tratamento
- ✓ Custo muito elevado (~100x a mais que a AMB desoxicolato)

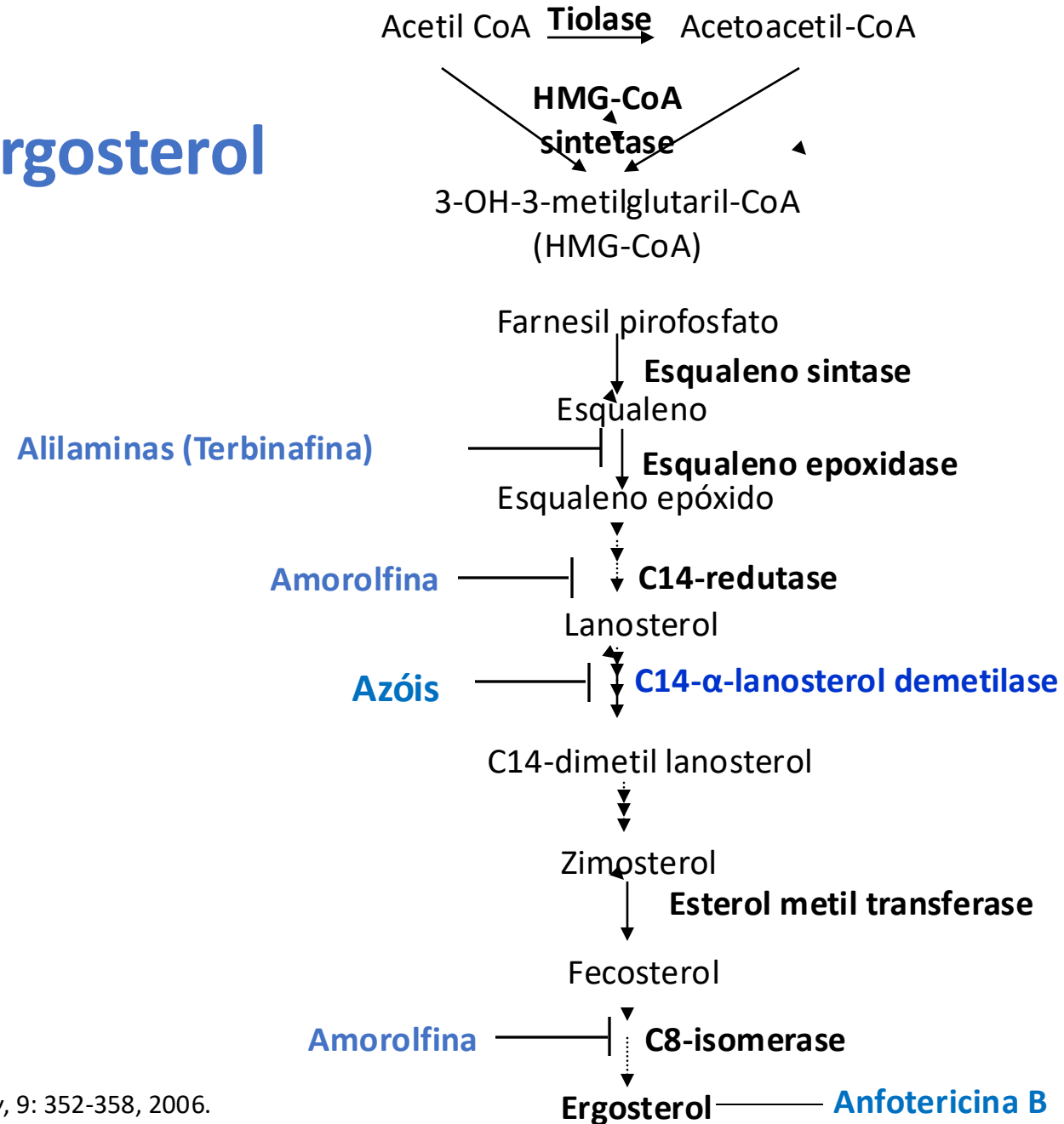
Resistência à Anfotericina B é rara!!!

Candida lusitanae, *Candida auris*, complexo *Candida haemulonii*

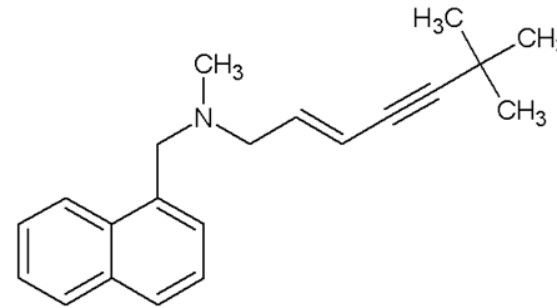


- ✓ Diminuição da quantidade de ergosterol (mutação no gene *ERG2* e *ERG3*)
- ✓ Acúmulo de outro esteroide, diferente de ergosterol, com baixa afinidade pelos polienos
- ✓ Aumento da atividade catalase e outras enzimas – reduz o dano oxidativo

Inibição da síntese do ergosterol



Alilaminas (terbinafina e butenafina)



- Inibe a enzima **esqualeno epoxidase**

Efeito antifúngico devido o acúmulo de esqualeno e falta de ergosterol

- Onicomioses causadas por **dermatófitos**

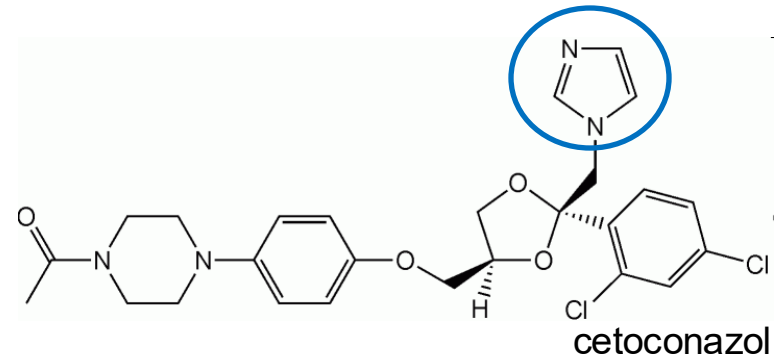
Efetivo em 90 % dos casos

- 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 triazóis

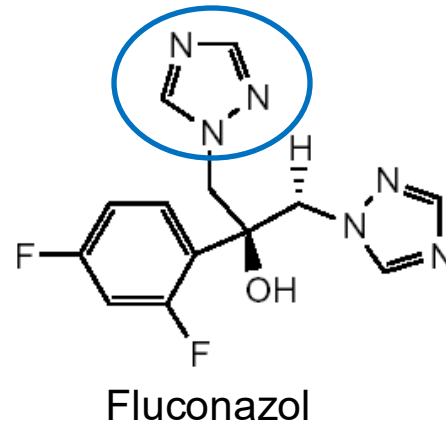
- Imidazóis

- 1ª. Geração
- 2ª. Geração



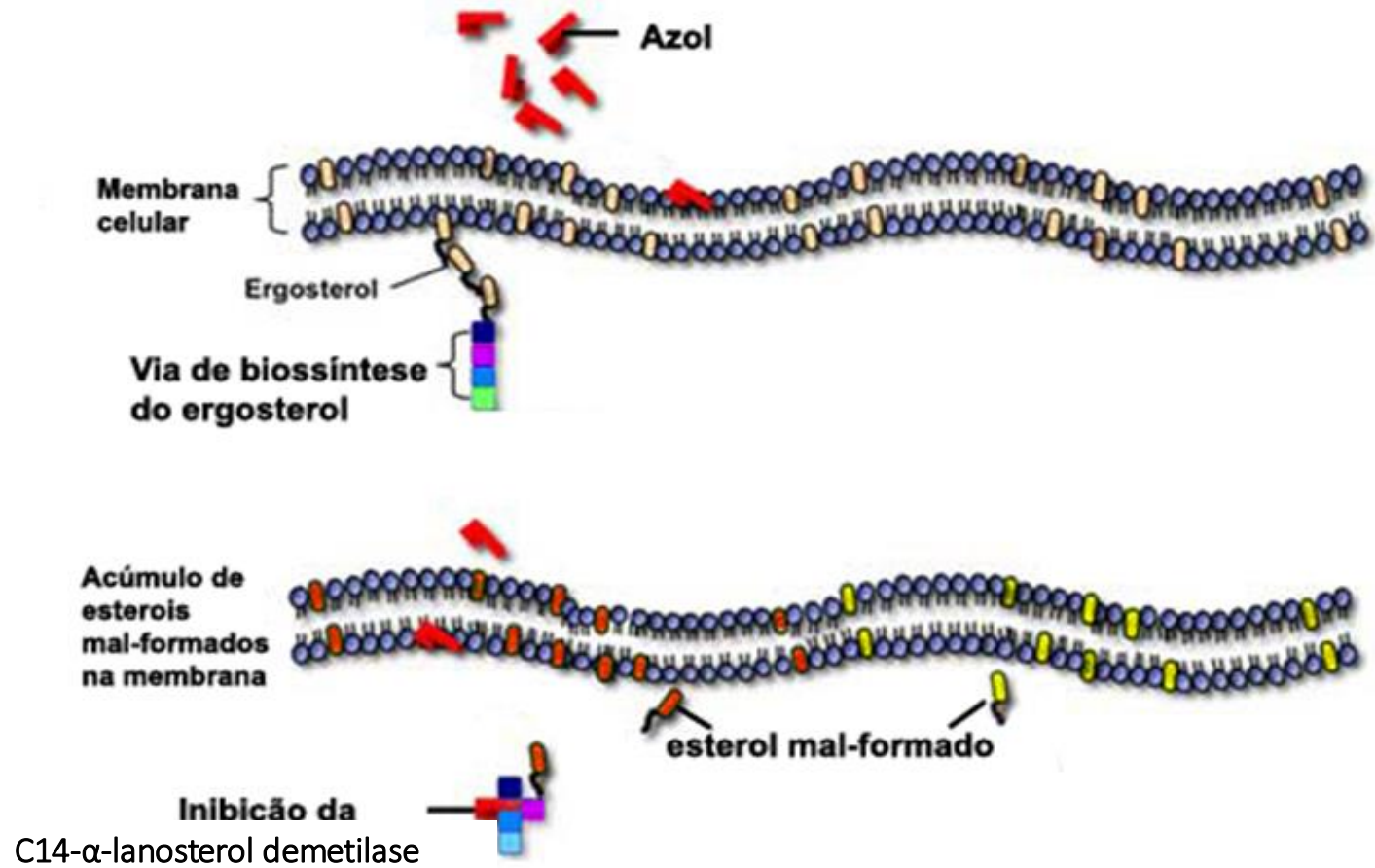
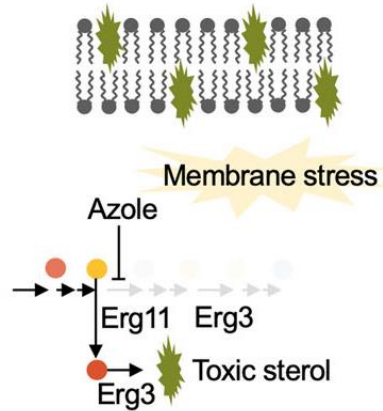
- Triazóis

- 1ª. Geração
- 2ª. Geração
- 3ª. Geração



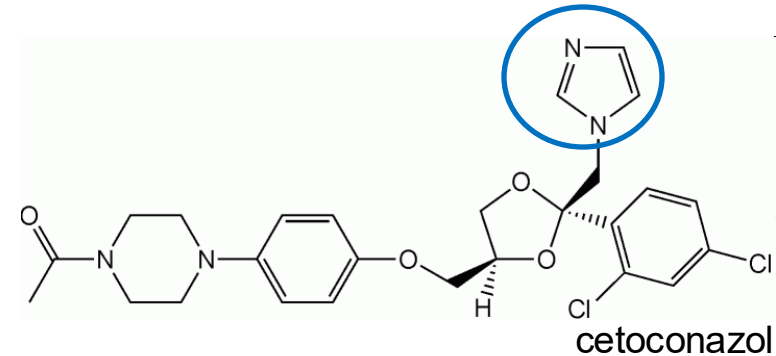
Azóis: imidazóis e triazóis

(b) AZOLES



Imidazol

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



São Fungistáticos

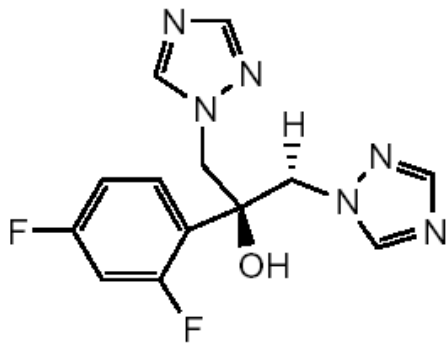
Dermatofitoses, candidíasis cutânea/mucocutânea

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

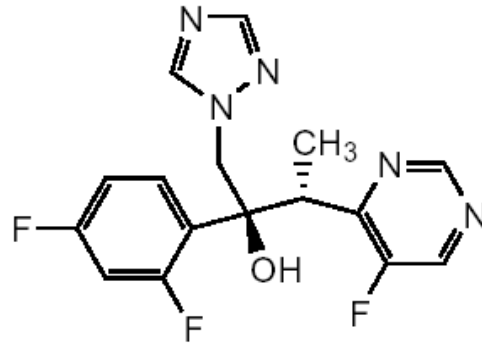
Absorção do cetoconazol – pH ácido

São hepatotóxicos, altera níveis de testosterona e cortisol

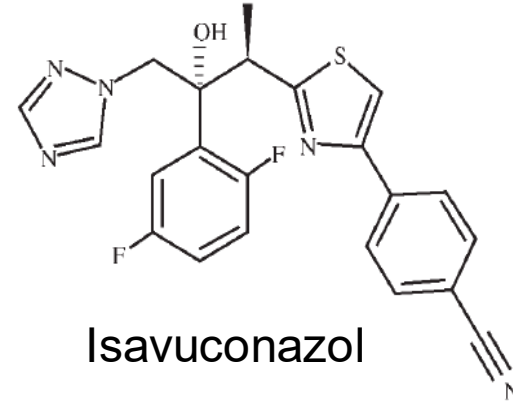
Triazol



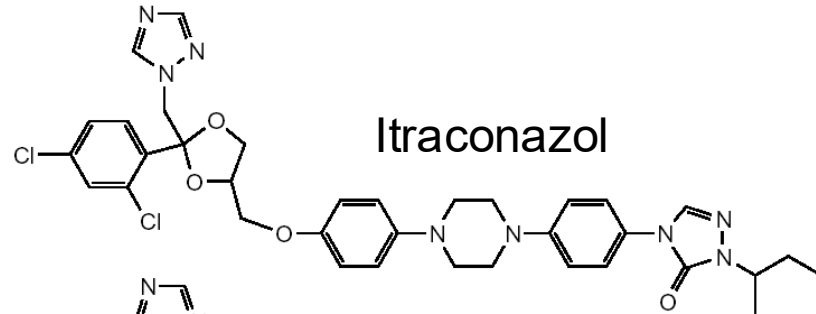
Fluconazol



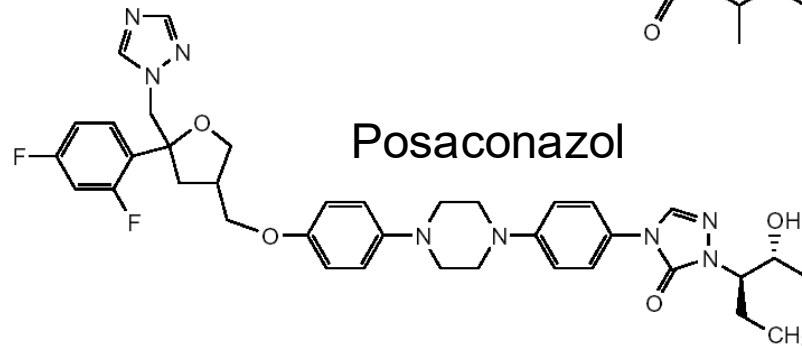
Voriconazol



Isavuconazol



Itraconazol

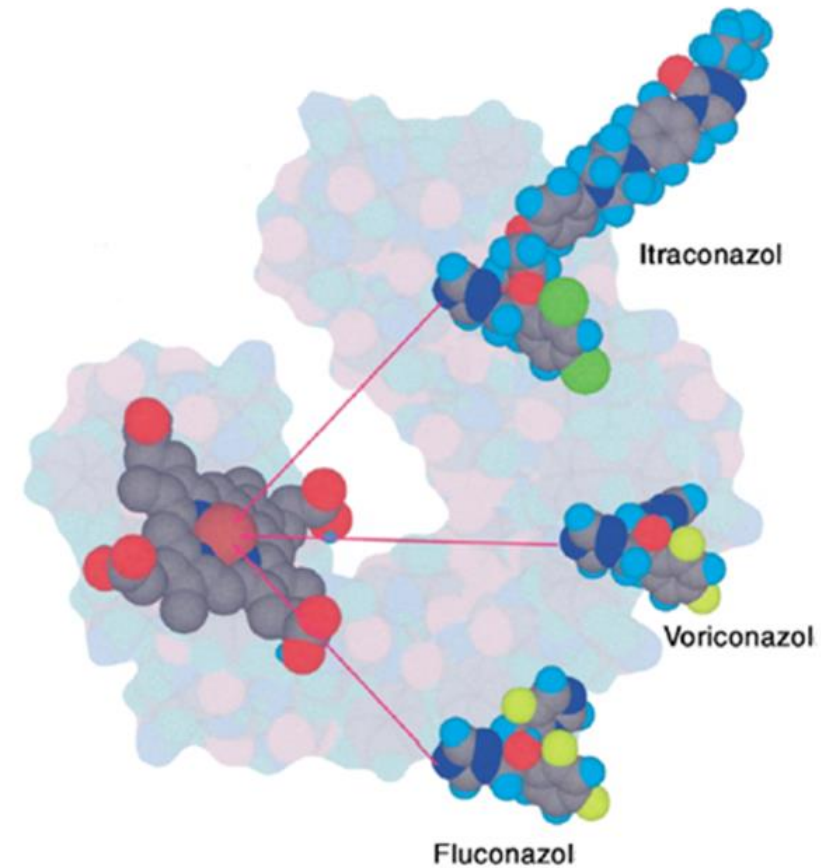


Posaconazol

No tratamento de Infecções sistêmicas.

Alta afinidade pela C14- α -lanosterol demetilase

- ✓ São mais específicos para a enzima do fungo
 - ✓ Redução dos efeitos colaterais
- ✓ Espectro de ação ampliado: leveduras, dermatófitos, fungos filamentosos e fungos dimórficos



	Fluconazol (Pfizer)	Voriconazol (Pfizer)	Itraconazol (Janssen Pharmaceuticals)	Posaconazol (Schering-Plough)
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

Características farmacológicas

Espectro de ação

Triazóis	<i>Candida</i>	<i>Cryptococcus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Mucorales</i>
Fluconazol (FLC)	+++/-	+++	-	-	-
Itraconazol (ITC)	+++	++	+++	-	-
Voriconazol (VRC)	+++	+++	+++	++	-
Posaconazol (POS)	+++	+++	+++	++	+
Isavuconazol (ISV)	+++	+++	+++	+	+

Formulação: oral e IV

Metabolizados no fígado isoenzimas do citocromo (CYP450)

Principal efeito colateral: hepatotoxicidade (VOR)

Interação medicamentosa (VRC)

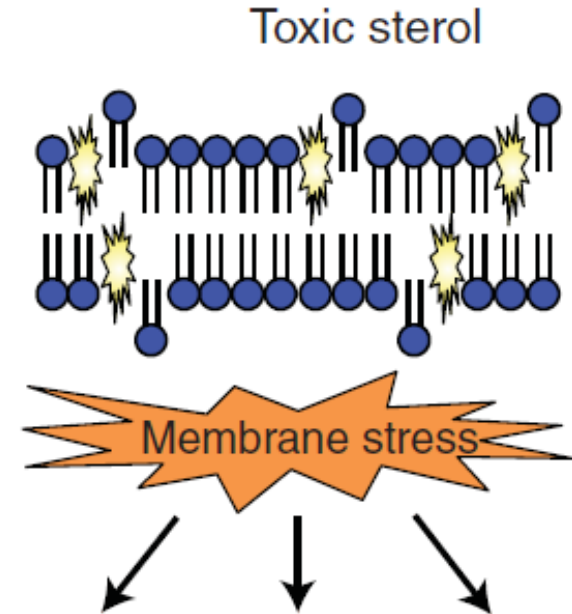
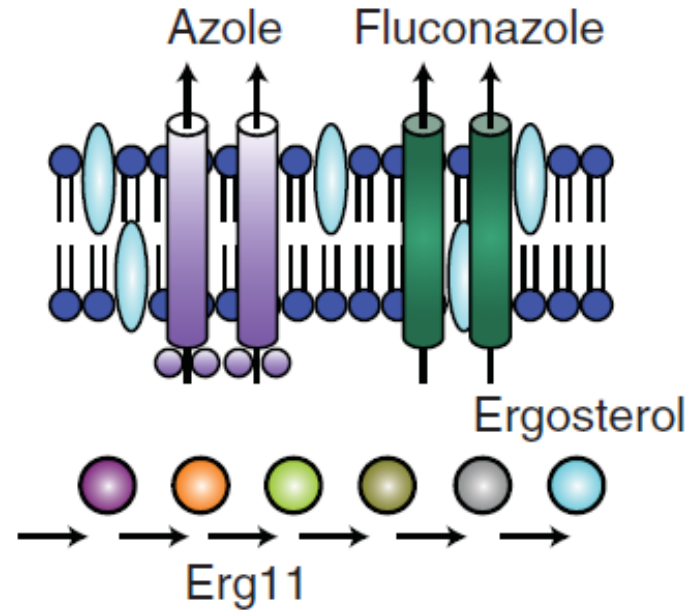
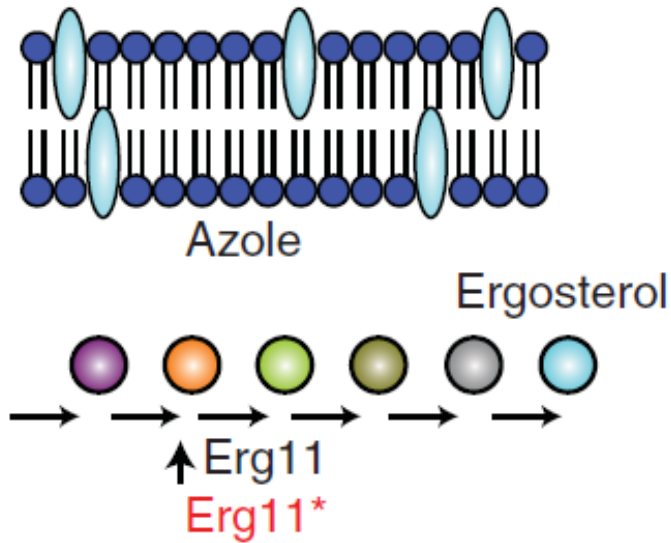
Mecanismos de resistência aos azóis

Target alteration
or overexpression

Up-regulation of
multidrug transporters

Cellular stress responses

A Azoles



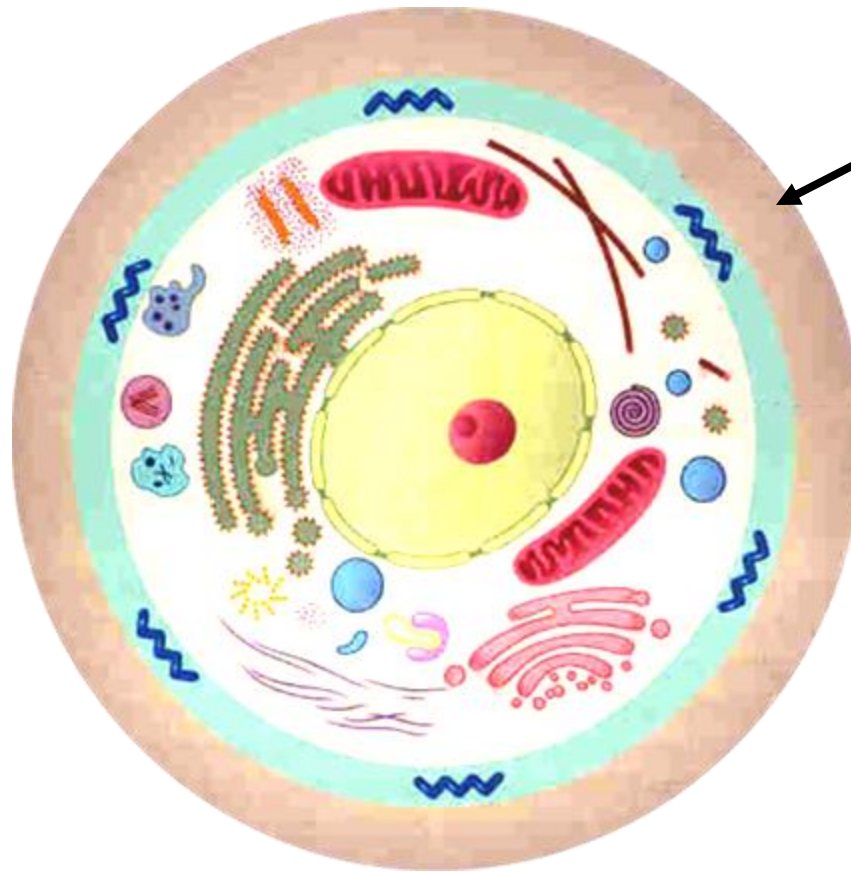
Candida albicans

- Mutations in *ERG11* and *UPC2*
- Loss of heterozygosity
- Isochromosome [i(5L)]

- Overexpression of Cdr1, Cdr2, and Mdr1
- Mutations in *TAC1* and *MRR1*
- Loss of heterozygosity
- Isochromosome [i(5L)]

- *erg3* mutations confer stress-response-dependent resistance
- Mediators of stress-response pathways include: Hsp90, Sgt1, calcineurin, KDACs, PKC

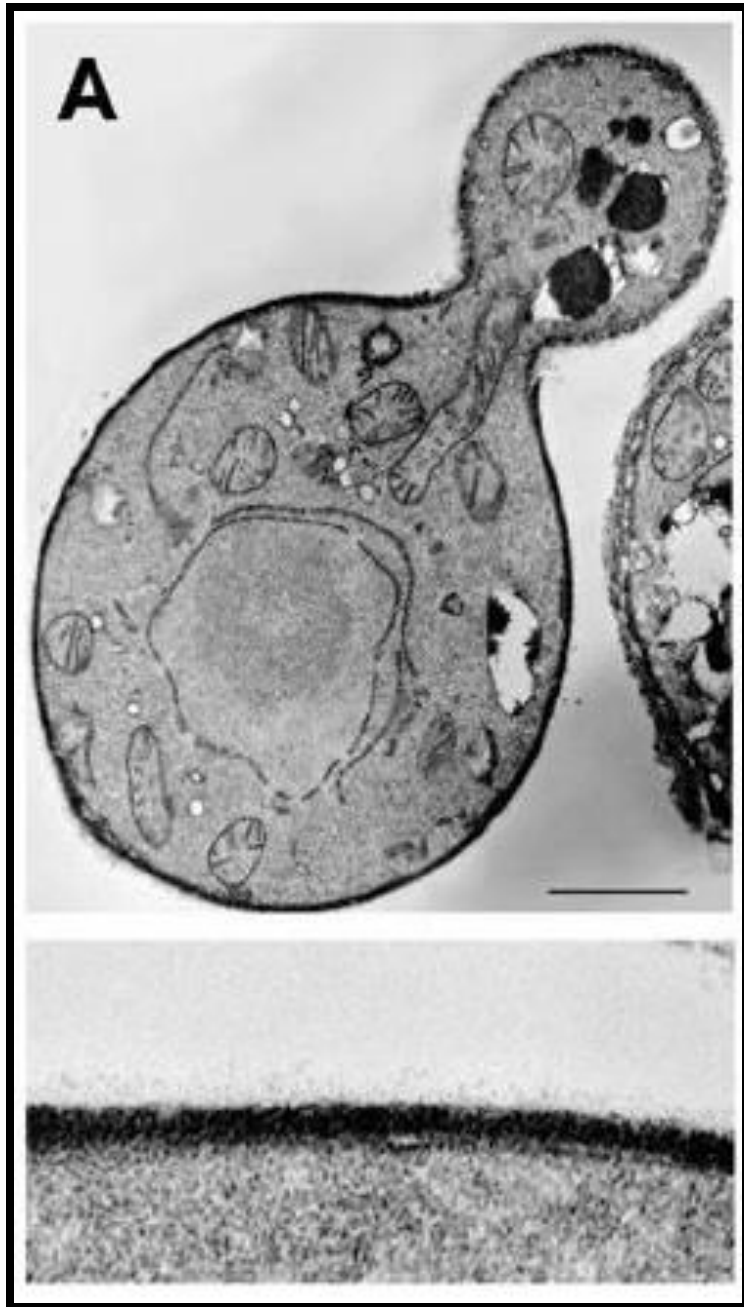
Antifúngicos que agem na síntese de parede celular



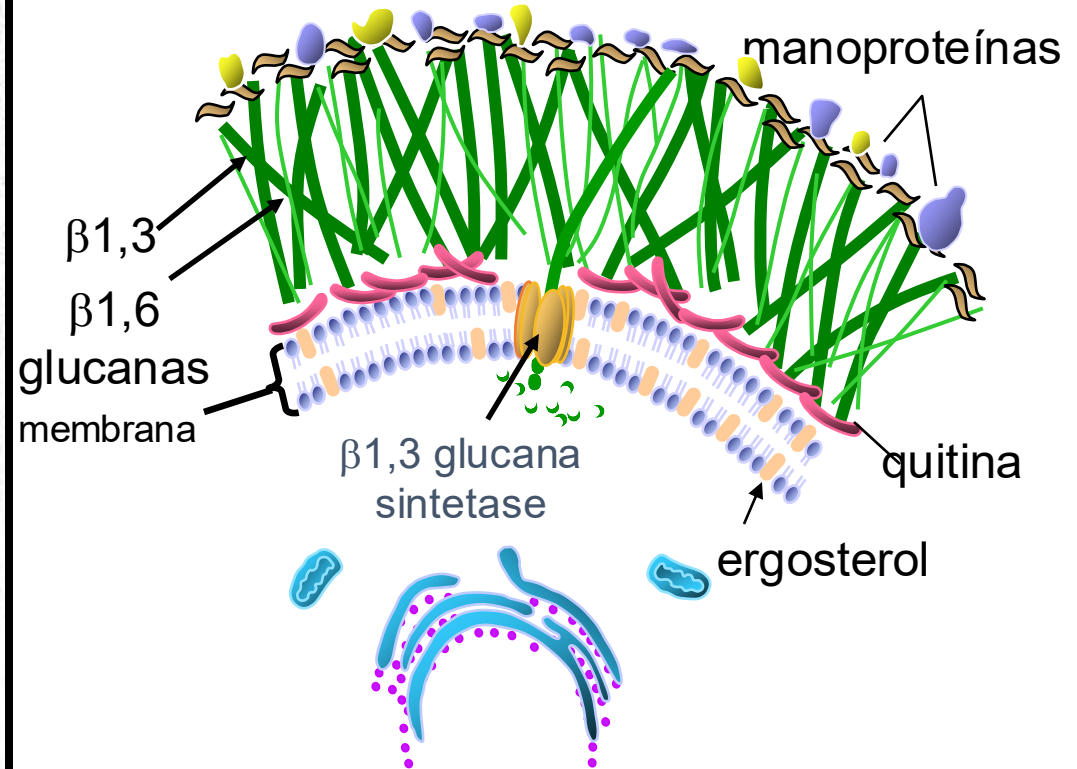
Parede celular

- Equinocandinas
- Caspofungina
- Micafungina
- Anidulafungina
- Rezafungina*

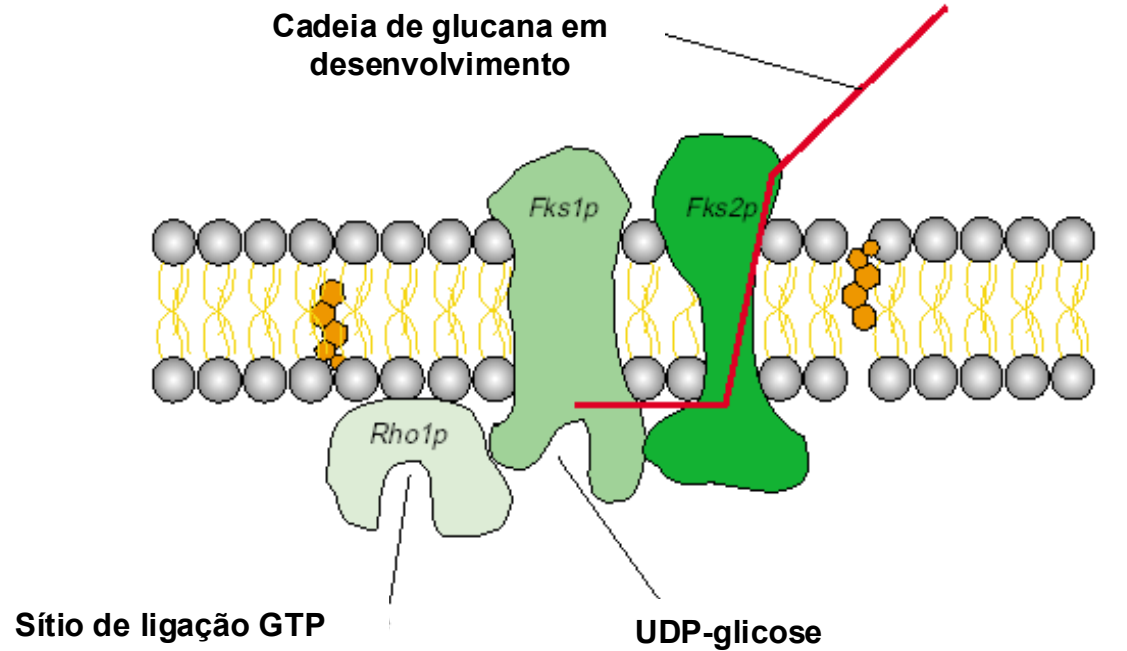
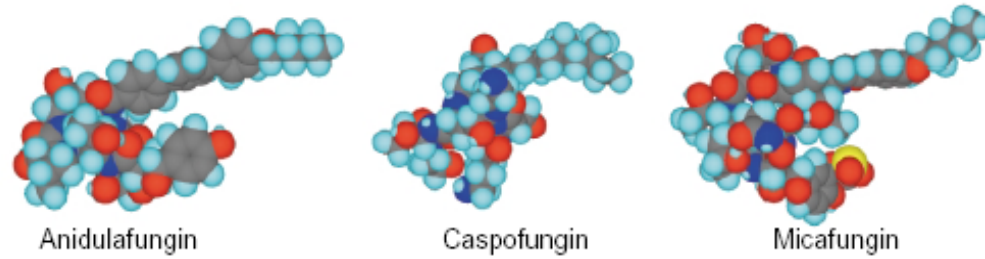
*Aprovado pelo FDA 2023 e pela ANVISA 2024



Pared celular fúngica



Inibidores não-competitivos



TRENDS in Microbiology

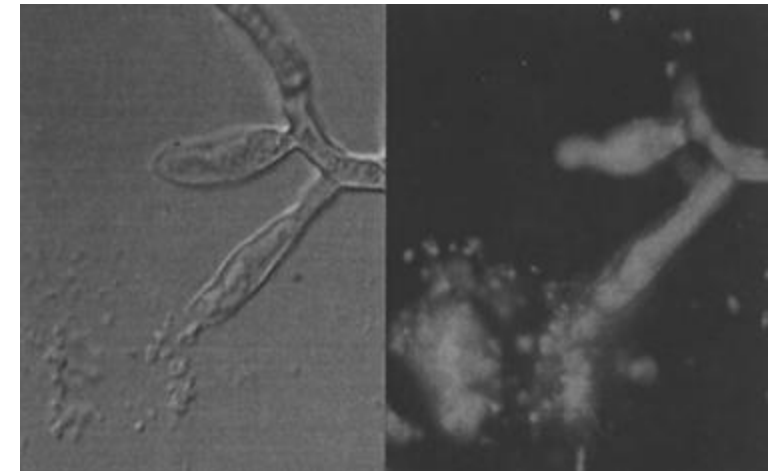
Espectro de ação

- ✓ *Candida* spp. - fungicida
- ✓ *Aspergillus* spp. - fungistático
- ✓ **Indicação:** candidíase esofágica, candidemia, candidíase invasiva, Aspergilose invasiva refratária a outros antifúngicos
- ✓ Não apresenta resistência cruzada aos agentes azólicos
- ✓ Não é ativo para *Cryptococcus*, *Fusarium* e zigomicetos
- ✓ São similares em eficácia e segurança

Características farmacológicas

- ✓ Via de administração IV uma vez por dia.
- ✓ Pouca interação com outras drogas
- ✓ Efeitos adversos: gastrointestinais

Aspergillus



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

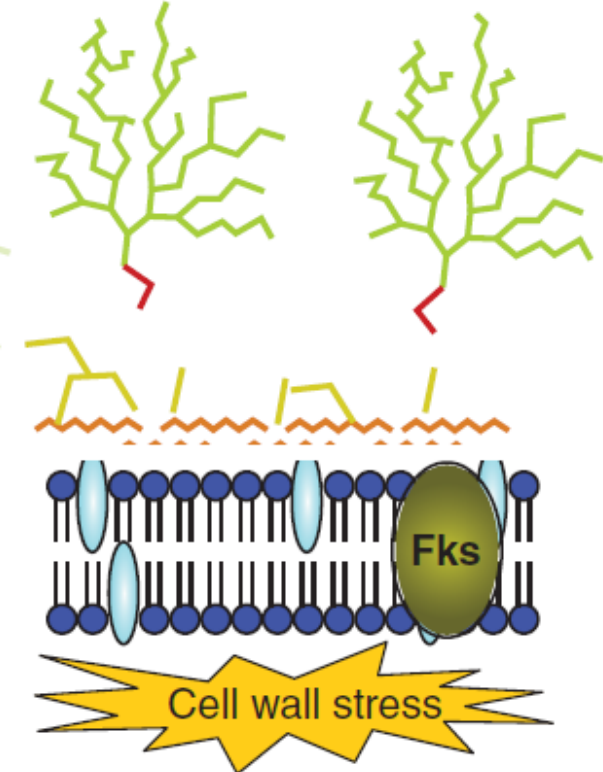
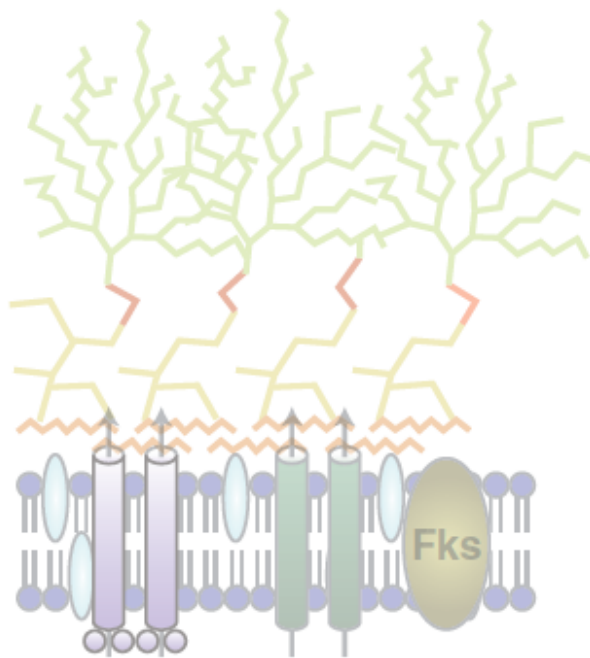
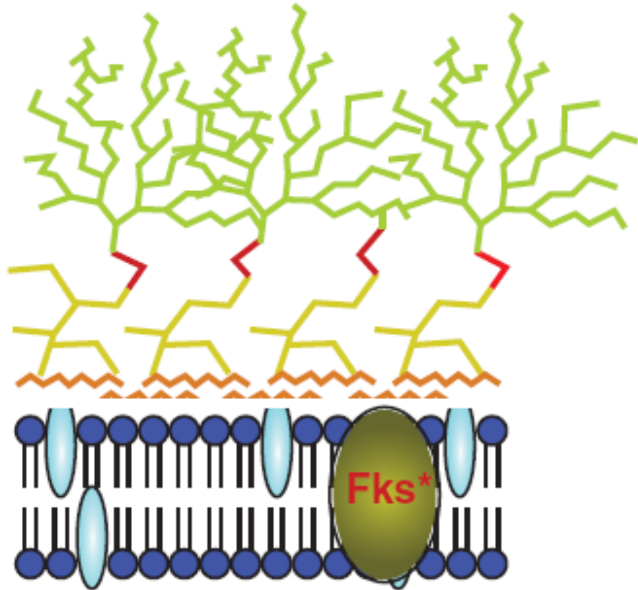
Mecanismos de resistência às equinocandinas

Target alteration
or overexpression

Up-regulation of
multidrug transporters

Cellular stress responses

A Echinocandins

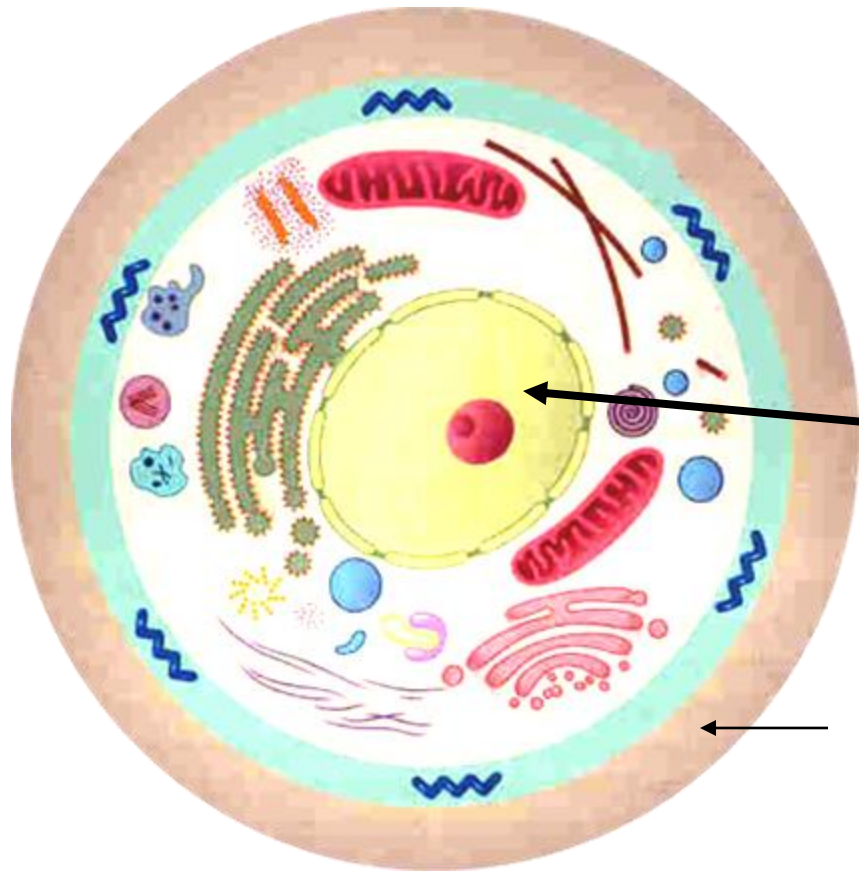


Candida albicans

- Mutations in *FKS1*

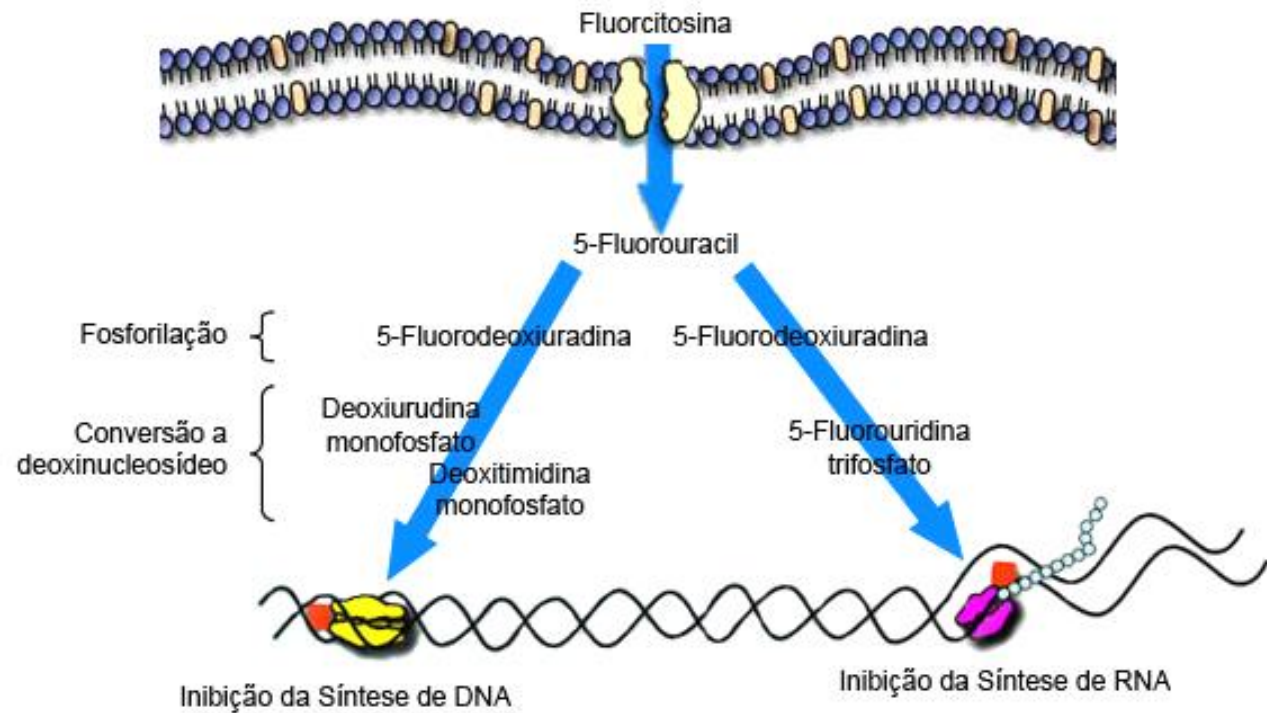
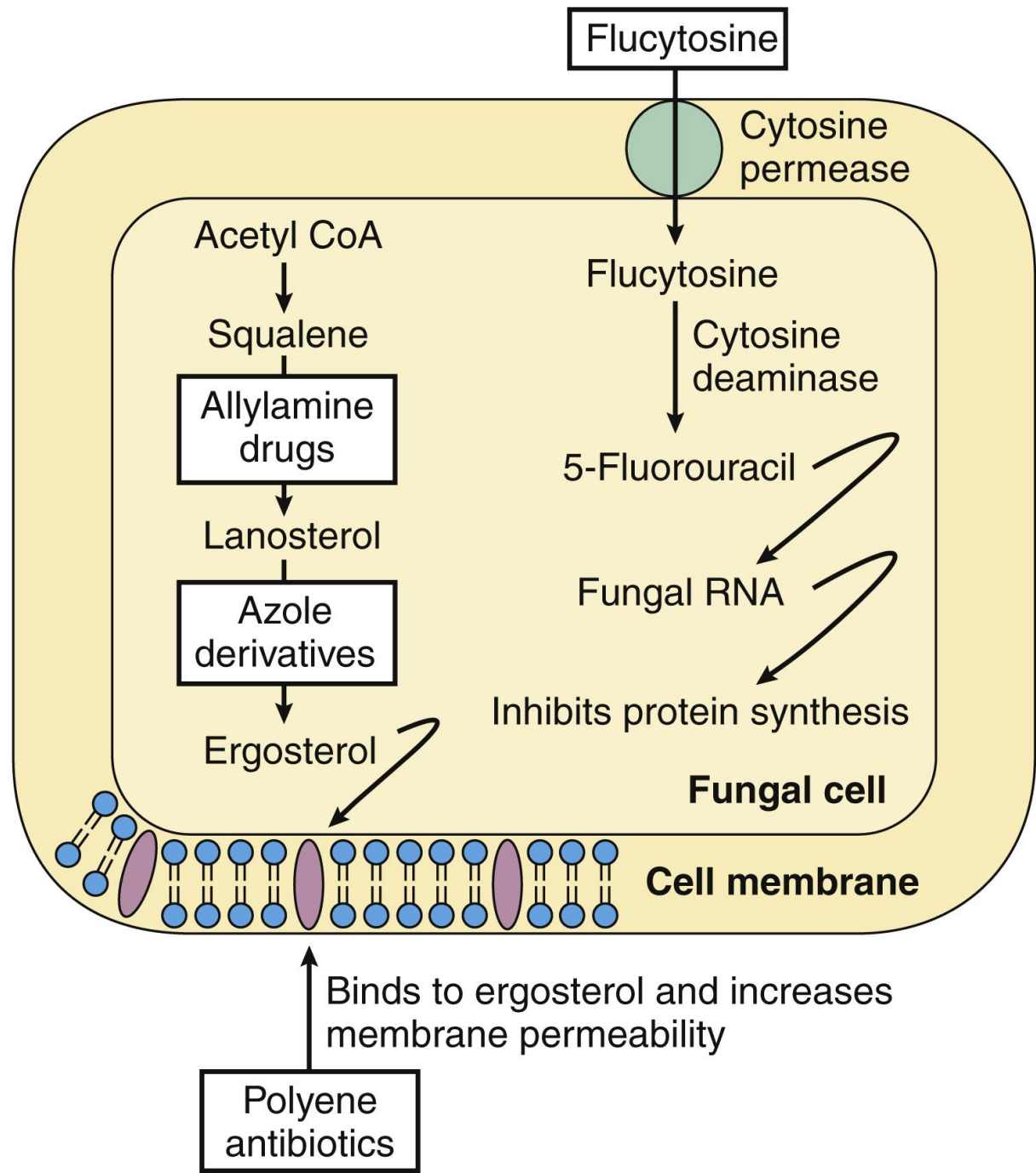
- Mediators of stress-response pathways include: Hsp90, calcineurin, PKC, HOG, and KDACs

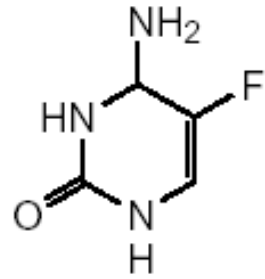
Antifúngicos que inibem a síntese de ácidos nucleicos



Síntese DNA/RNA

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





5-fluorocitosina

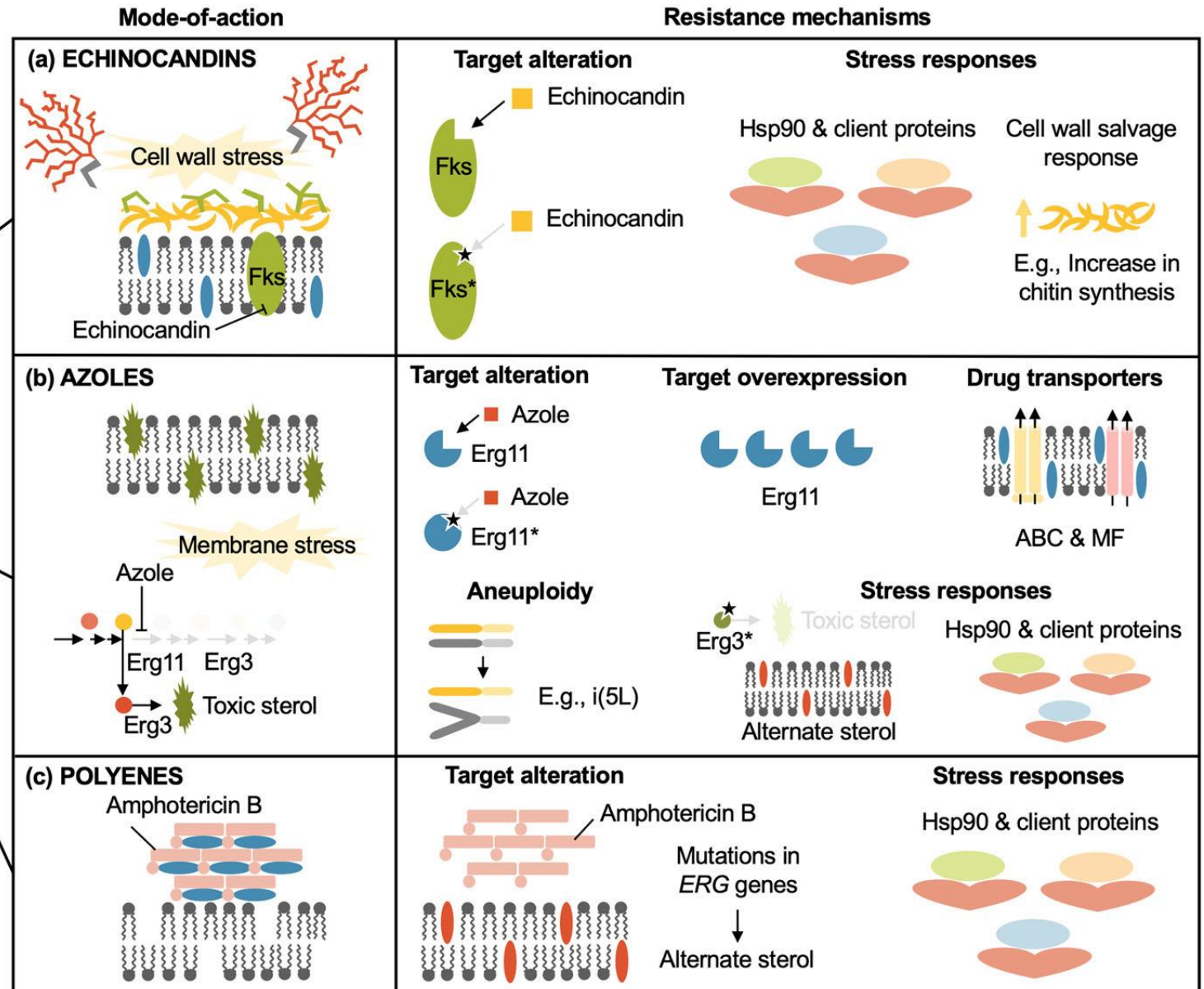
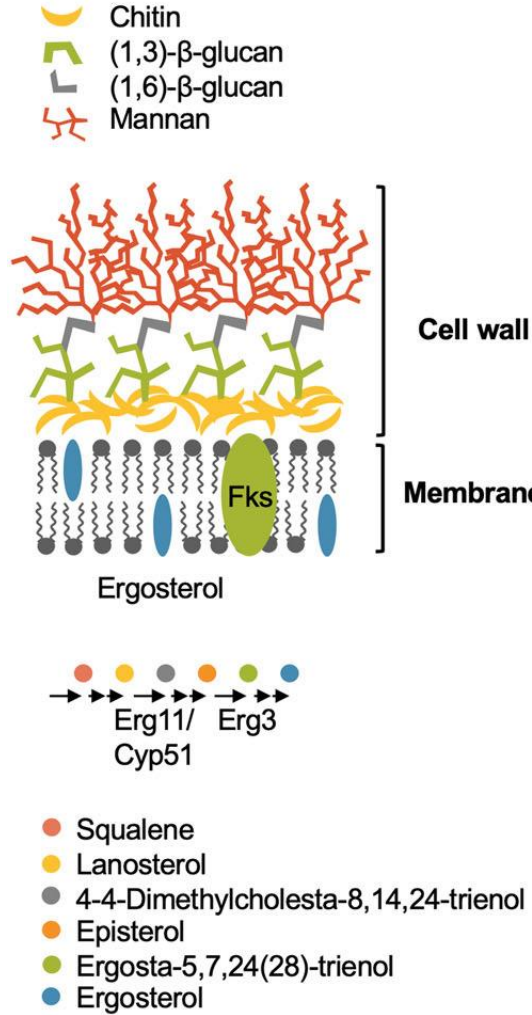
Sintetizada em 1957 como agente antitumoral

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

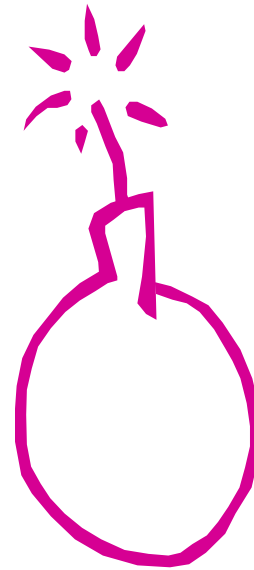
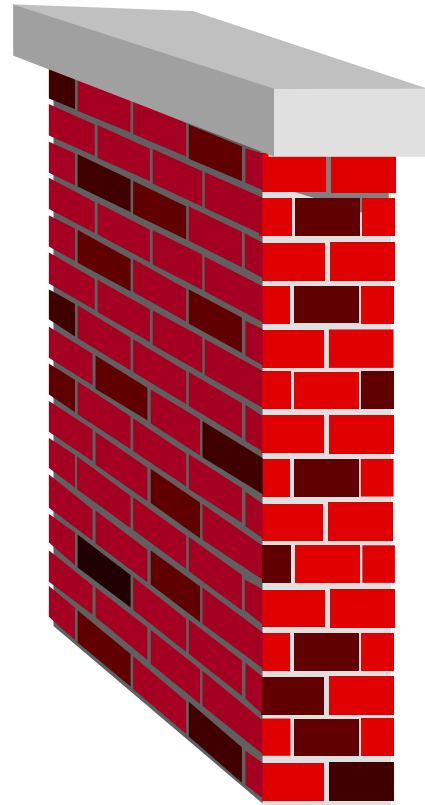


Sugestão de leitura : Lee et al. npj Antimicrobials & Resistance (2023) 1:5 ; <https://doi.org/10.1038/s44259-023-00007-2>



Antifungal mode-of-action and mechanisms of resistance

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 ($\mu\text{g/mL}$)

O que pode levar a resistência?

“ O antimicrobiano não induz à resistência”

O que ocorre é a seleção natural de microrganismos resistentes ao antimicrobiano”

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

Qual é a causa do aumento de isolados de *Candida* resistentes ?

original yeast population

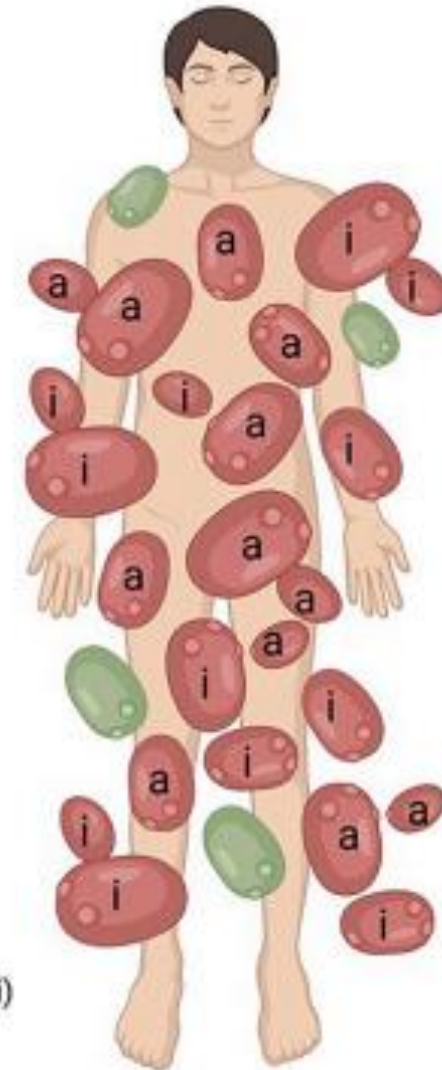



Tempo prolongado
Subdose


Exposure to antimycotics →

- Selects (resistant) pathogens
- Triggers genomic changes

final yeast population



 Susceptible yeast strains

 Resistant yeast strains | acquired (a) or inherent (i)

- **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)

Como minimizar o aparecimento de resistência?

- ✓ Diagnóstico correto e tratamento adequado
- ✓ Evitar o uso indiscriminado de antifúngicos
- ✓ Utilizar dosagens adequadas e suficientes
- ✓ Utilizar associação de drogas
- ✓ Mudar tão logo de antifúngico quando se observa que o fungo possui sinais de resistência
- ✓ Fazer teste de sensibilidade aos antifúngicos, quando necessário

Como saber se o fungo é resistente ou sensível??



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 sensibilidade aos antifúngicos “in vitro”
 - Método de difusão em ágar
 - **Método de diluição em caldo** (padrão ouro)
 - Macrodiluição
 - Microdiluição
 - Metodologia do E-teste
 - Métodos automatizados

E teste[®] - [bioMérieux](#)

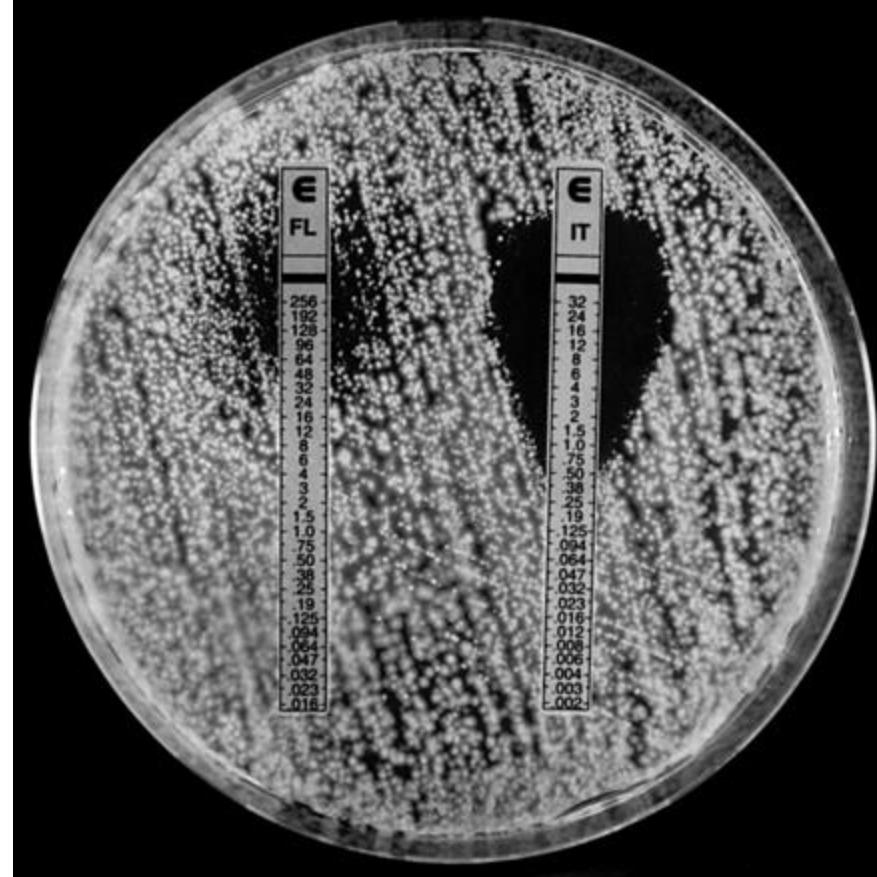
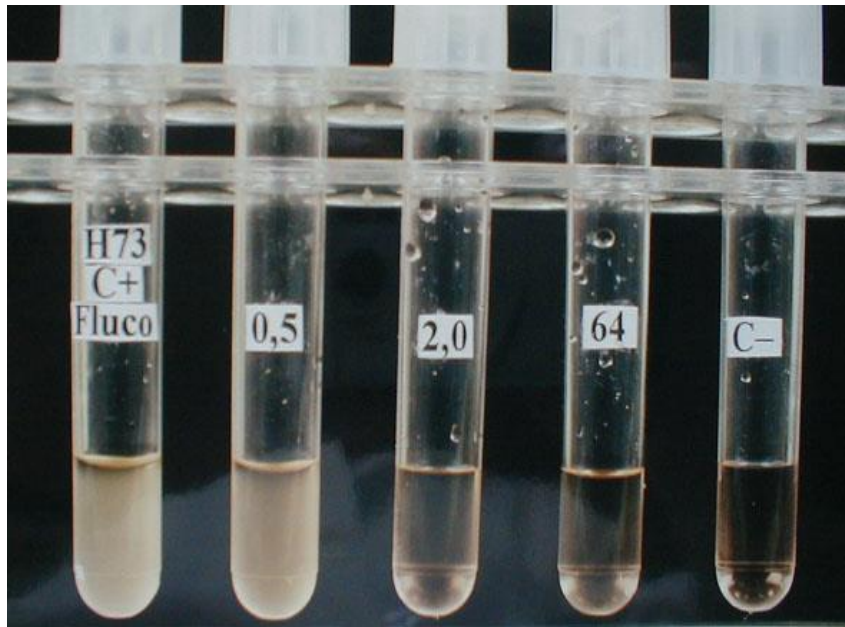


Figure 1
Fluconazole (FL): change of morphology at endpoint. MIC, 48 mg/litre;
itraconazole (IT): sharp end point. MIC, 0.5 mg/litre.

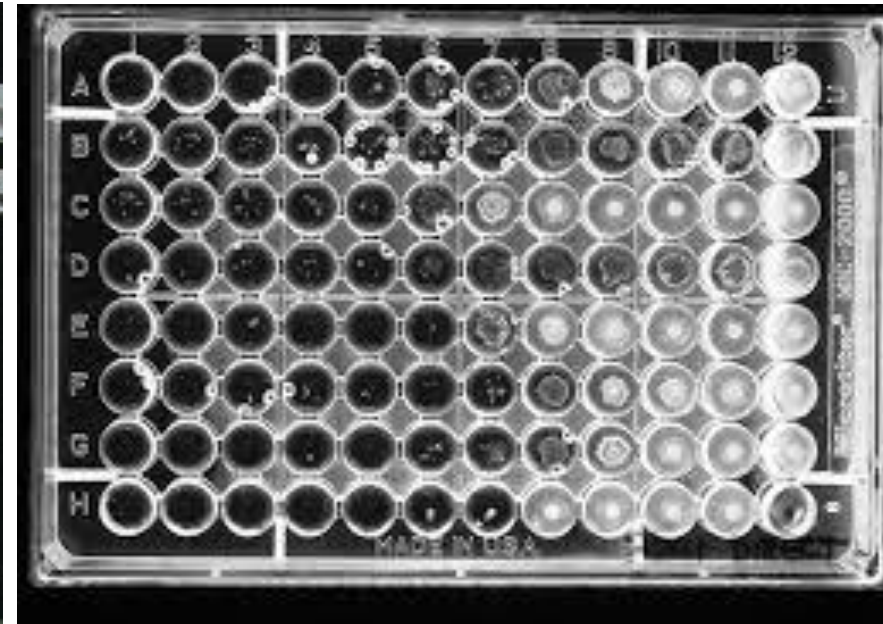
Diluição em caldo de antifúngicos



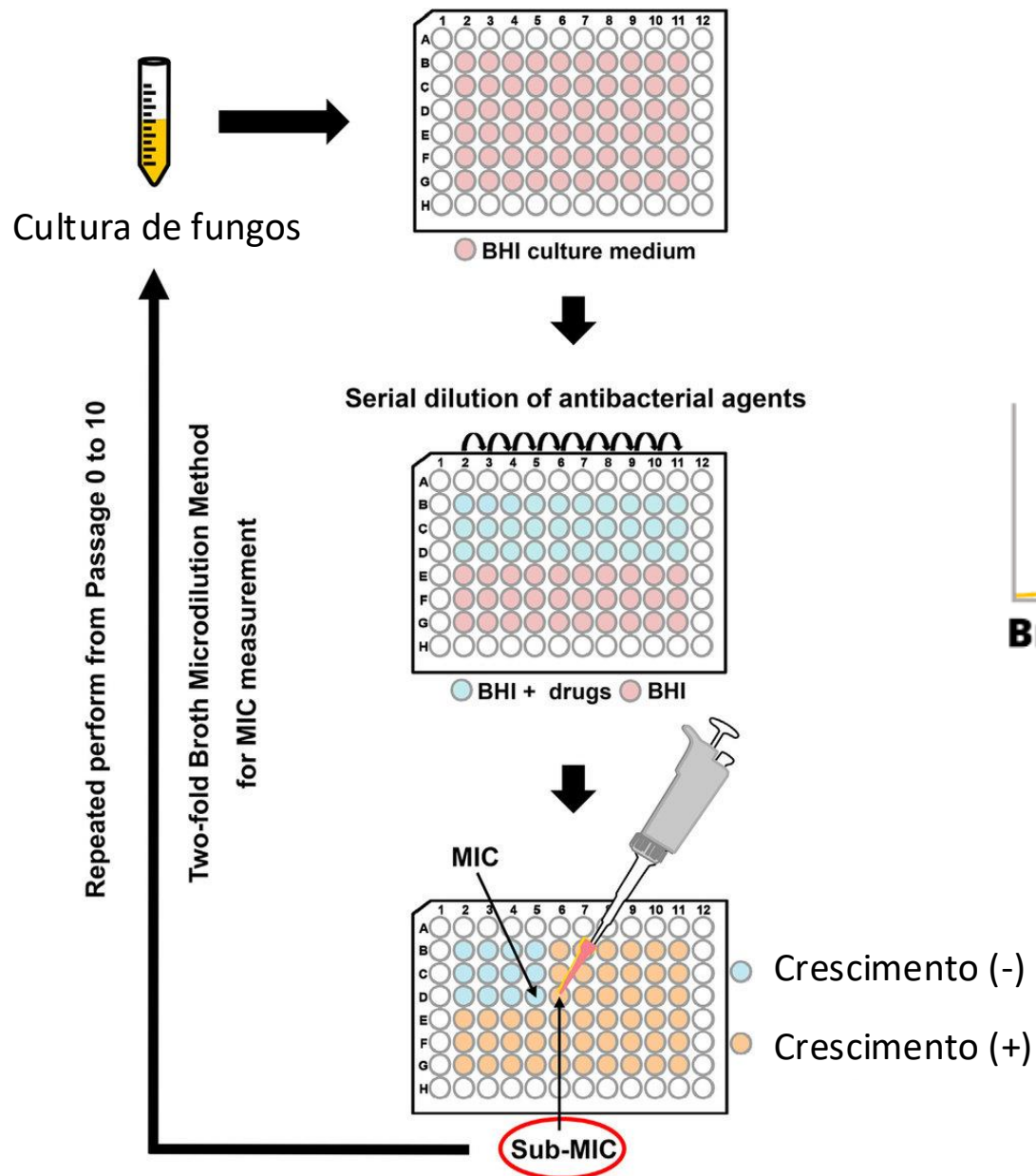
- Técnica de diluição em caldo
 - Leveduras
 - Filamentoso
 - CIM (ou MIC) – inibição de 50% e 90% do crescimento fúngico



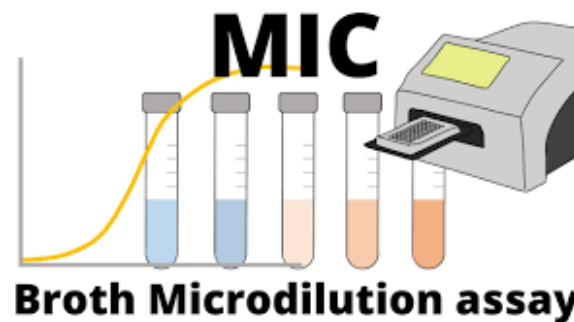
Macrodiluição



Microdiluição



Teste de Sensibilidade aos antifúngicos (TSA)



Interpretação Documentos BrCAST

<https://brcast.org.br>

Estudo Dirigido

1. Complete a tabela abaixo:

Classe de Antifúngicos	Antifúngico (insira um exemplo)	Mecanismo de ação	Mecanismos de resistência	Espectro de Ação (do exemplo)	Toxicidade
Equinocandinas					
Poliênicos					
Imidazóis					
Triazóis					
Análogos de Pirimidina					

Estudo Dirigido

2. O Fluconazol é ativo para todas as espécies de leveduras de *Candida* e *Cryptococcus*? Discuta.
3. Todos os antifúngicos azóis tem atividade contra *Aspergillus*? Justifique a sua resposta.
4. Explique brevemente sobre as vantagens e desvantagens farmacológicas do voriconazol com o seu análogo estrutural fluconazol.
5. Quais as vantagens das formulações lipídicas da Anfotericina B?
6. As equinocandinas são fármacos de escolha tratar fungos dimórficos (*Paracoccidioides* e *Histoplasma*)? Explique a sua resposta.
6. Qual a importância de se realizar a identificação da espécie de fungos?
7. Qual a importância de se realizar o teste de sensibilidade aos antifúngicos?
8. Na prática clínica, o que significa Resistência a um antimicrobiano?
9. Explique resumidamente o conceito da técnica de microdiluição em caldo.



ICR'



• Q • A
IA ANTIFÚNGICA

e-mail:
ishidakelly@usp.br