

Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos

Leonardo Neves de Andrade & Ana Lúcia da Costa Darini

Introdução:

Dentre as possíveis causas de falha no tratamento das infecções, a resistência bacteriana aos antibióticos é, sem dúvida, uma das mais importante.

A resistência bacteriana aos antibióticos é determinada pela expressão de genes de resistência, que individualmente ou em conjunto, determinam o funcionamento dos mecanismos de resistência, maquinarias bioquímicas e/ou estruturais que promovem falha no mecanismo de ação do antibiótico. Neste capítulo serão apresentados alguns dos principais mecanismos que estão presentes em bactérias gram-positivas e gram-negativas.

As bactérias podem expressar resistência intrínseca (inerente), ou seja, mecanismos de resistência naturais de um gênero ou espécie bacteriana, ou podem expressar resistência adquirida, ou seja, aquela originada a partir de mutações nos próprios genes ou pela aquisição dos genes de resistência de outras bactérias (conjugação: plasmídeo, transposon), via bacteriófago (transdução) ou via ambiente (transformação).

Didaticamente, os principais mecanismos de resistência foram divididos de acordo com a forma de inativação do antibiótico:

1. produção de enzimas que degradam ou modificam antibióticos;
2. redução da permeabilidade da membrana externa;
3. sistemas de efluxo hiperexpressos;
4. alteração do sítio alvo (de ligação) do antibiótico;
5. bloqueio ou proteção do sítio alvo do antibiótico

Para cada mecanismo de resistência serão apresentados conceitos-chave e alguns dos exemplos mais representativos.

1. PRODUÇÃO DE ENZIMAS QUE DEGRADAM OU MODIFICAM ANTIBIÓTICOS

1.1. Enzimas que degradam antibióticos

Enzimas que degradam antibióticos inativam esses antimicrobianos pela catálise hidrolítica das moléculas dessas drogas.

As principais enzimas que degradam antibióticos são denominadas **beta-lactamases**, e como o próprio nome diz, atuam catalisando a hidrólise do anel beta-lactâmico, levando à perda da ação do antimicrobiano sobre a bactéria que continua fazendo a biossíntese de sua parede celular.

Desde a descoberta e introdução clínica das penicilinas e das sucessivas classes e subclasses de beta-lactâmicos, várias beta-lactamases têm sido descritas. Resumidamente, é importante saber que as beta-lactamases são divididas em dois grandes grupos, as **serina beta-lactamases** (com um aminoácido serina no sítio catalítico das enzimas) e as **metalo-beta-lactamases** ou **MBL** (que necessitam de um metal como co-fator para a atividade catalítica).

Clinicamente, o espectro/potencial de degradação das beta-lactamases talvez seja o critério mais ilustrativo para classificar essas enzimas:

Penicilinases, cefalosporinases, cefamicinases, beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases são as principais representantes e, também, como os próprios nomes dizem, têm espectro/potencial de degradação crescente e associado a cada classe ou subclasse de beta-lactâmico.

ATENÇÃO

Geralmente as beta-lactamases com maior espectro/potencial de degradação (ex.: carbapenemases) têm também potencial para degradar beta-lactâmicos de menor espectro/potencial de atividade (ex.: penicilinas naturais).

As **penicilinases** são produzidas por uma variedade de bactérias como *Staphylococcus aureus* (cocos gram-positivos), *Haemophilus influenzae* (coco-bacilo gram-negativo) e bacilos gram-negativos em geral. Essas beta-lactamases tem atividade restrita de degradação, geralmente, direcionada para as **penicilinas lábeis** (ex.: penicilina, amoxicilina).

Existem **penicilinas estáveis** (ex.: oxacilina) à ação das penicilinases, ou seja, não são degradadas. Por isto a oxacilina é a droga de escolha na suspeita de infecções causadas por *S. aureus* originadas na comunidade.

Associações de beta-lactâmicos (penicilinas) com inibidores de beta-lactamases clássicos (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam), principalmente amoxicilina-ácido clavulânico, têm sido utilizadas no tratamento de infecções não complicadas e não invasivas causadas por bactérias produtoras de penicilinases, principalmente por *S. aureus* e *H. influenzae*.

ATENÇÃO

A associação de um inibidor de beta-lactamase a uma droga que habitualmente é degradada por estas enzimas pode restaurar o efeito antimicrobiano e ampliá-lo.

De modo geral, os inibidores de beta-lactamases não têm efeito antimicrobiano relevante para serem usados isoladamente como drogas para uso clínico.

Cefalosporinas, cefamicinas, ESBLs e carbapenemases são produzidas por bacilos gram-negativos tais como enterobactérias (*Klebsiella*, *E. coli*, *Enterobacter*, etc) e bactérias não-fermentadoras (principalmente *Pseudomona aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*).

As ESBLs (do inglês *Extended Spectrum Beta-Lactamases*) são enzimas que possuem potencial para degradar todas as penicilinas, todas as cefalosporinas e monobactâmico (aztreonam), porém a sensibilidade às cefamicinas (ex.: cefoxitina) e carbapenêmicos geralmente é preservada. De certa forma essas enzimas são “cefalosporinas”, no entanto, elas têm um “espectro estendido” de degradação. Assim o termo ESBL está relacionado a capacidade que estas beta-lactamases têm de degradação de cefalosporinas de 3ª e 4ª geração (drogas de amplo espectro de ação antimicrobiana), e que também conhecidas como cefalosporinas de “espectro estendido” ou “amplo espectro”. A característica primária de degradar cefamicinas (ex.: cefoxitina) pertence às cefamicinases (ex.: AmpC).

ATENÇÃO

As ESBL são enzimas inibidas, *in vitro*, pelos inibidores de beta-lactamases, entretanto em infecções por bactérias produtoras de ESBL o tratamento com associações de beta-lactâmicos com inibidores de beta-lactamases deve ser evitada.

O uso dos carbapenêmicos (*i.e.* Meropenem) nestes casos é o mais indicado.

Carbapenemases são as beta-lactamases com o maior espectro/potencial de degradação, e o termo deve-se à capacidade de degradar carbapenêmicos. São enzimas codificadas por genes cromossômicos ou plasmideais. As carbapenemases adquiridas por plasmídeos possuem destaque na disseminação da resistência aos carbapenêmicos e são divididas em dois grupos:

- Metalo-carbapenemases (MBL): tem potencial para degradar todos os beta-lactâmicos, exceto monobactâmico (aztreonam). Exemplos:
 - IMP (Impenemase)
 - VIM (Verona impenemase)
 - NDM (New Delhi Metallo-beta-lactamase)
 - SPM (São Paulo Metallo-beta-lactamase) - endêmica e restrita ao território brasileiro
- Serina-carbapenemases: tem potencial para degradar todos os beta-lactâmicos, cujo principal exemplo é a:
 - KPC (Klebsiella pneumoniae carbapenemase): detectada em diversos gêneros ou espécies de bacilos gram-negativos, não sendo exclusiva, como pode sugerir o nome, de *K. pneumoniae*

Atualmente, as carbapenemases NDM e KPC são os principais problemas relacionados às infecções hospitalares por bacilos gram-negativos, pois quase sempre essas bactérias também expressam outros mecanismos de resistência.

1.2 Enzimas que alteram antibióticos

Existem enzimas que modificam antibióticos por transferência de grupo(s) químico(s) (acil, fosfato, nucleotidil ou ribitoil) para a molécula da droga, inativando

aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina), fenicóis (cloranfenicol) e macrolídeos (eritromicina, azitromicina e claritromicina).

As principais enzimas que modificam antibióticos são as **enzimas modificadoras de aminoglicosídeos** (AME, do inglês *aminoglycoside modifying enzymes*), que alteram a estrutura química destes antibióticos, inativando a sua ligação com as subunidades do ribossomo, que são o alvo deste antimicrobiano na bactéria. Existem diferentes AMEs que conferem resistência aos principais aminoglicosídeos: amicacina, gentamicina, tobramicina e kanamicina.

ATENÇÃO

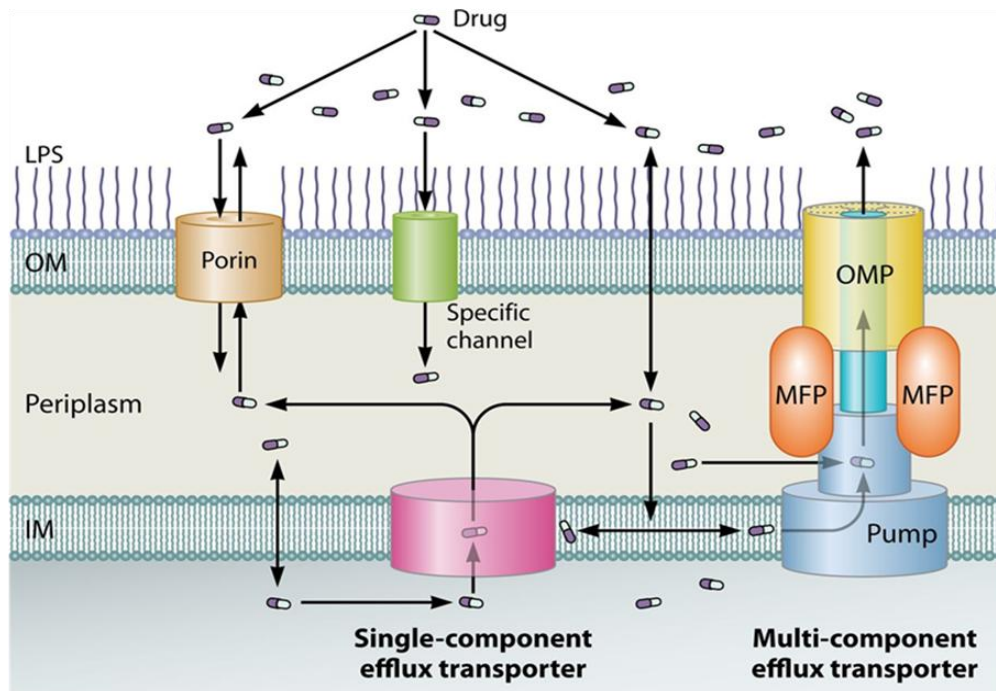
Uma variação no gene que codifica uma AME tornou possível a modificação de fluoroquinolonas (principalmente ciprofloxacina), diminuindo também a sensibilidade a essas drogas.

2. REDUÇÃO DA PERMEABILIDADE DA MEMBRANA EXTERNA

As bactérias gram-negativas são intrinsecamente menos permeáveis a muitos antibióticos por possuírem membrana externa na constituição de sua parede celular, o que não existe na parede celular de bactérias gram-positivas. Dessa forma, a redução da permeabilidade da membrana externa é um mecanismo de resistência exclusivo de bactérias gram-negativas.

Para atingir o alvo e agir no meio intracelular (periplasma ou citoplasma), os antibióticos devem ultrapassar a membrana externa ou toda a parede celular. Antibióticos hidrofílicos (geralmente moléculas pequenas) devem atravessar a membrana externa por difusão passiva através de proteínas de membrana externa denominadas **porinas** ou **Omps** (do inglês *Outer membrane proteins*).

A redução da permeabilidade da membrana externa pode ocorrer por alterações na estrutura das porinas ou mesmo pela perda da porina, respectivamente, resultando em permeabilidade mais seletiva ou até mesmo impermeabilidade às drogas (Figura 1). Este mecanismo pode afetar principalmente a entrada de antibióticos beta-lactâmicos e de fluoroquinolonas.



Xian-Zhi Li et al. Clin. Microbiol. Rev. 2015;28:337-418

Figura 1 - Vias de influxo e de efluxo de drogas em bactérias gram-negativas. LPS:lipopolissacarídeo; OM:membrana externa; IM:membrana interna; A direita está o sistema de efluxo tripartido ou multicomponente, composto por Pump:bomba de efluxo; MFP:proteína acessória (de ligação); OMP: porina.

Estes mecanismos ocorrem em bactérias como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter* e *P. aeruginosa*. A perda de algumas porinas pode diminuir de 4 a 8 vezes a sensibilidade à cefotaxima e ao cefepime, no entanto, costuma afetar pouco a sensibilidade aos carbapenêmicos.

ATENÇÃO

Durante a antibioticoterapia com cefalosporinas pode ocorrer diminuição da expressão da porina OmpK36 pela presença dos próprios antibióticos (efeito adverso), assim, bactérias inicialmente sensíveis expressam resistência ou diminuição da sensibilidade a essas drogas durante o tratamento. Este processo é reversível após a retirada do antibiótico.

3. SISTEMAS DE EFLUXO HIPEREXPRESSOS

Os sistemas de efluxo são mecanismos naturais de excreção de substâncias tóxicas resultantes do metabolismo bacteriano, que se localizam na parede celular das bactérias e, geralmente, são codificados por genes no cromossomo.

Clinicamente o problema ocorre quando estes sistemas têm sua expressão aumentada (hiperexpressão), seja pela maior quantidade destes sistemas na bactéria e/ou atividade maior de excreção (sistemas hiperativos).

Nas bactérias gram-negativas, por conta da presença de membrana externa, o sistema de efluxo é geralmente composto por uma proteína **transmembrana interna** (que é uma bomba de efluxo), uma **proteína transmembrana externa** (que é uma porina) e uma proteína que faz a ligação dessas duas proteínas transmembrana e que compõe o sistema de efluxo da bactéria gram-negativa, geralmente chamado sistema tripartido ou multicomponente (Figura 1).

Em bactérias gram-positivas, que não têm a membrana externa, o sistema de efluxo é a própria bomba de efluxo, sistema de componente simples.

A atividade dos sistemas de efluxo pode ser inespecífica e excretar diferentes antibióticos, de diferentes classes ou subclasses, ou pode ser uma atividade específica para uma droga, classe e subclasse de antibiótico. Existem também mecanismos de efluxo adquiridos por plasmídeos, que geralmente não dependem de hiperexpressão.

4. ALTERAÇÃO DO SÍTIO ALVO (de ligação) DO ANTIBIÓTICO

A maioria dos antibióticos liga-se especificamente a um ou mais alvos na célula bacteriana. Alterações na estrutura do alvo do antibiótico impedem a eficiente ligação ou diminuem a afinidade dessa interação, desse modo o antibiótico não reconhece mais o alvo na célula bacteriana. Geralmente, alterações do sítio alvo têm origem em mutações em genes da própria bactéria. Essas alterações impedem a ligação dos antimicrobianos, mas não interferem na função do alvo (ex.: proteína) alterado. Assim, a bactéria mantém suas funções e escapa da ação dos antibióticos.

Um dos principais exemplos são as mutações cromossômicas em regiões determinantes de resistência às quinolonas. Mutações nos genes *gyrA* e/ou *parC* (mais comuns) alteram as enzimas topoisomerase IV e/ou DNA gyrase que atuam na

duplicação do DNA bacteriano e são os alvos das quinolonas. Com estas alterações as bactérias escapam da ação das quinolonas, já que a duplicação do DNA ocorre normalmente.

Outro exemplo é a alteração nas proteínas ligadoras de penicilina (PBPs, do inglês *Penicillin-Binding Proteins*), enzimas bacterianas que atuam no processo de biossíntese da parede celular bacteriana. Essas alterações podem ter origem em mutações em genes cromossômicos em *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. mitis* e *N. gonorrhoeae* e conferem resistência variada aos antibióticos beta-lactâmicos.

Alterações de sítio alvo podem também ter origem na aquisição de um elemento genético denominado *SCCmec* (do inglês *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*), que carrega o gene *mecA* que codifica uma PBP alterada (PBP 2A), que está presente no *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA). No Brasil, a penicilina anti-estafilocócica utilizada clinicamente é a oxacilina, assim o termo similar a MRSA seria *S. aureus* resistente à oxacilina (ORSA).

Na presença de resistência induzida por uma PBP alterada, a síntese da parede celular bacteriana ocorrerá normalmente na presença de qualquer antibiótico beta-lactâmico. Desse modo, se a resistência à oxacilina for detectada, isto significa que haverá resistência a todos os antibióticos beta-lactâmicos disponíveis e o tratamento deverá ser feito com drogas como glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina) ou outras opções de antibióticos em que a bactéria demonstrar sensibilidade no resultado do antibiograma.

Finalmente, merece menção as alterações no terminal D-alanina-D-alanina (D-Ala D-Ala), que é precursor do peptidoglicano da parede celular bacteriana e sítio alvo de antibióticos glicopeptídeos, como a vancomicina. Os glicopeptídeos, assim como os beta-lactâmicos, atuam na inibição da síntese da parede celular bacteriana, no entanto, em alvos diferentes. Essa alteração de sítio alvo pode ter origem na aquisição de um elemento genético denominado transposon *Tn1546*, que pode carregar os genes *vanA*, *vanB* ou *vanC* que codificam um terminal alterado, D-alanina-D-lactato (D-Ala D-Lac), que está presente geralmente nos *Enterococcus* resistente à vacomicina (VRE).

ATENÇÃO

A alteração do sítio alvo dos antibióticos é um importante mecanismo de resistência de bactérias gram-positivas e gram-negativas, sendo bastante relevante para drogas como as **quinolonas** (altera as topoisomerases), **penicilinas** (altera PBP e resulta na resistência à oxacilina) e **vancomicina** (altera sítio de ligação da vancomicina na resistência dos *Enterococcus*).

Se a resistência à oxacilina for detectada, isto significa que haverá resistência a todos os antibióticos beta-lactâmicos disponíveis (outras penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos).

5. PROTEÇÃO OU BLOQUEIO DO SÍTIO ALVO (de ligação) DO ANTIBIÓTICO

A proteção ou bloqueio pode funcionar pela produção de enzimas ou presença de estruturas celulares bacterianas que impedem a ligação do antibiótico ao sítio alvo.

Um exemplo de proteção é a produção de enzimas denominadas Qnr, mediada por genes adquiridos (PMQR, do inglês *Plasmid-Mediated Quinolone Resistance*), que se ligam e protegem a DNA topoisomerase tipo II contra a ação das quinolonas, o que diminui a sensibilidade destas bactérias aos antibióticos dessa classe.

Um exemplo de bloqueio às drogas é o espessamento da parede celular em *S. aureus*, mediado pela expressão de um conjunto de genes cromossômicos, que funciona como uma barreira e bloqueia o acesso de glicopeptídeos (vacomicina e teicoplanina) ao sítio alvo, conferindo resistência intermediária para essas drogas nos denominados *S. aureus* intermediário à vancomicina ou glicopeptídeos (VISA/GISA) ou resistência total nos *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA/GRSA).

S. aureus resistente à vancomicina é um fenótipo raro e pode também ser determinado por alteração no terminal D-Ala-**D-Ala** para D-Ala-**D-Lac**, citado anteriormente para *Enterococcus* resistente à vacomicina (VRE). Felizmente este genótipo/fenótipo é ainda mais raro, com pouquíssimos relatos no mundo, incluindo o Brasil.

ATENÇÃO

A proteção ou bloqueio do alvo de ligação do antibiótico é um mecanismo de resistência que ocorre em bactérias gram-positivas tais como o *S. aureus* que tem resistência intermediária (VISA/GISA) ou total (VRSA/GRSA) à vancomicina. Este mecanismo também pode interferir na capacidade antimicrobiana de quinolonas.

Nota: Revisão e adaptação do texto feita pelos organizadores: VRB, CSF, RCS.

REFERÊNCIAS

1. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews Microbiology*. 2015;13(1):42-51. Epub 2014/12/02.
2. Rice LB. Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to beta-lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones. *Mayo Clinic proceedings Mayo Clinic*. 2012;87(2):198-208. Epub 2012/02/07.
3. Pages JM, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature reviews Microbiology*. 2008;6(12):893-903. Epub 2008/11/11.
4. Piddock LJ. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nature reviews Microbiology*. 2006;4(8):629-36. Epub 2006/07/18.
5. Li XZ, Plesiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical microbiology reviews*. 2015;28(2):337-418. Epub 2015/03/20.
6. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2010;300(6):371-9. Epub 2010/06/12.

7. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Therapeutic advances in infectious disease*. 2016;3(1):15-21. Epub 2016/02/11.
8. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *The Lancet Infectious diseases*. 2013;13(9):785-96. Epub 2013/08/24.
9. Johnson AP, Woodford N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *Journal of medical microbiology*. 2013;62(Pt 4):499-513. Epub 2013/01/19.
10. Fisher JF, Mobashery S. beta-Lactam Resistance Mechanisms: Gram-Positive Bacteria and *Mycobacterium tuberculosis*. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2016;6(5). Epub 2016/04/20.
11. Gardete S, Tomasz A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(7):2836-40. Epub 2014/07/02.
12. Miller WR, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert review of anti-infective therapy*. 2014;12(10):1221-36. Epub 2014/09/10.
13. Leclercq R, Canton R, Brown DF, Giske CG, Heisig P, MacGowan AP, et al. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2013;19(2):141-60. Epub 2011/11/29.
14. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2012;18(3):268-81. Epub 2011/07/29.
15. Canton R, Ruiz-Garbajosa P. Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Current opinion in pharmacology*. 2011;11(5):477-85. Epub 2011/08/16.