

ASPECTOS ATUAIS DA RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS AZÓLICOS E POLIÊNICOS

SYDNEY HARTZ ALVES¹

JOSIANE GRIEBELER²

LETÍCIA DA SILVEIRA GOULART³

1. Professor adjunto de Microbiologia; Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas; Universidade Federal de Santa Maria (RS). E-mail <hartzsa@fatecnet.ufsm.br>

2. Bolsista do PBIC/CNPq; UFSM

3. Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia Farmacêutica; UFSM

INTRODUÇÃO

Contrastando com o grande número de agentes antibacterianos, os agentes antifúngicos são em número bastante reduzido. As principais famílias de antifúngicos compreendem os poliênicos, os azólicos, tiocarbamatos, alilaminas, derivados morfolínicos e uma miscelânea de outros agentes que incluem a 5-fluorocitosina e a griseofulvina. Inibidores da síntese de glucana e da síntese de quitina estão em acelerado desenvolvimento, mas ainda não disponíveis. Assim, a maior importância recai sobre os poliênicos, a 5-fluorocitosina e os azólicos (Alves et al, 1997; Ghanoum & Rice, 1999).

O fenômeno da resistência primária de alguns fungos a determinados antifúngicos é bastante conhecida, como a natural resistência de *Pseudallescheria boydii*, *Cladosporium carrionii*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Scopulariopsis*, *Trichosporon* e *Fusarium* a anfotericina B e a resistência primária de *Mucor* aos azólicos. Todavia, a resistência secundária, manifestada após o início de um tratamento, constitui-se num fenômeno recente (Richardson & Warnock, 1993).

O aspecto epidêmico da SIDA e os avanços farmacológicos na terapêutica anticancerígena têm contribuído para que um contingente maior de pacientes sobreviva por mais tempo no estado imunocomprometido. Nestes grupos, as micoses oportunistas são comuns, o que requer a maciça participação dos antifúngicos. Coincidindo com a maior demanda por antifúngicos é que resistência tem se manifestado.

Embora fosse rara, há dez anos, a resistência aos antifúngicos está rapidamente se tornando um problema emergente em determinadas populações, especialmente, nas candidíases dos pacientes infectados pelo HIV (White et al, 1998). Segundo Law et al (1994), 33% dos pacientes nos estágios terminais da SIDA evidenciam infecções por *Candida*, resistentes aos azólicos.

A RESISTÊNCIA AOS POLIÊNICOS

Disponível comercialmente, desde 1956, a anfotericina B constitui-se num recurso terapêutico extremo, devendo, por isto, ser utilizada, com cautela, (Graybill, 1996). A emergência de cepas de *Candida spp* resistentes a anfotericina B são preocupantes, conforme alguns relatos: Dick et al (1980) verificaram que 7% dos isolados de *Candida* de uma unidade oncológica evidenciavam resistência aos poliênicos; Powderly et al (1988) observaram que as cepas de *Candida* isoladas de episódios de candidemias evidenciavam concentrações inibitórias mínimas mais elevadas do que as CIMs de cepas isoladas de outros pacientes; Macura, 1991, relatou que 2% de todas as cepas de *Candida* isoladas de materiais biológicos provenientes de pacientes hospitalizados evidenciavam resistência a nistatina. Law et al (1994) constataram que 4% das cepas de *Candida* isoladas de pacientes imunocomprometidos evidenciavam resistência aos poliênicos.

Em cepas de *Cryptococcus neoformans* isoladas de meningoencefalites, já se observou, com pouca frequência, o desenvolvimento de resistência a este poliênico (Kelly et al, 1994).

Os estudos bioquímicos com isolados resistentes buscam elucidar os mecanismos de resistência, dos quais são conhecidos:

- Redução no conteúdo de ergosterol da membrana plasmática do fungo, com conseqüente diminuição dos sítios de ligação com as drogas (Vanden Bossche et al, 1994);
- Aumento da atividade da catalase intracelular do fungo, impedindo a formação de radicais livres responsáveis pela formação do "poro" (Kerridge & Nicholas, 1986);
- A ausência da citocromo P 450-a-demetilase, responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol, promove a resistência aos poliênicos pela redução ou ausência do ergosterol na membrana plasmática (Kerridge & Nicholas, 1986);

- Alterações nas enzimas D-5-6-dessaturase e D-8-7-isomerase determinam acúmulo de 14-metil-fecosterol na membrana plasmática do fungo, que, como não se constituem em alvos para poliênicos, a resistência se manifesta (Vanden Bossche et al, 1994).

Além destes mecanismos, há especulações de que outras drogas possam alterar a fisiologia dos fungos, selecionando cepas resistentes: Brajtburg et al (1988) verificaram que as nitrosouréias CCNU e BCNU interferiam na ação antifúngica da anfotericina B, uma vez que seus isocianatos promoviam o aumento da catalase intracelular em *Candida*, tornando-a resistente ao dano oxidativo causado pelos poliênicos.

A RESISTÊNCIA AOS AZÓLICOS

Os azólicos são atualmente considerados como a principal classe de antifúngicos, sobretudo, após a disponibilização dos triazólicos como o fluconazol e o itraconazol com amplo espectro de ação e efeitos tóxicos bastante reduzidos (Ghannoum & Rice, 1999). O principal mecanismo de ação dos azólicos é a inibição da biossíntese do ergosterol, trazendo como consequência alterações na fluidez da membrana citoplasmática do fungo (Richardson & Warnock, 1993).

Outros sítios de ação dos azólicos envolvem: as alterações nas enzimas glucana sintetase, adenilciclase e ATPases; o descontrole na síntese de quitina, devido à desordenada ativação da quitina sintetase; alterações nas enzimas citocromo c oxidase, peroxidase e catalase (Vanden Bossche et al, 1994;). Mecanismos adicionais incluem, no gênero *Candida*, a inibição da transformação da fase leveduriforme em miceliana, favorecendo a ação dos macrófagos e leucócitos e a redução da aderência desta levedura aos tecidos do hospedeiro (White et al, 1998).

Os relatos de leveduras resistentes aos azólicos eram achados raros, até 1990. A partir deste ano, com o significativo aumento de leveduras oportunistas nos pacientes com SIDA e o maior uso do fluconazol, emergiu, em dimensões ainda não observadas, o fenômeno da resistência de *Candida* a este antifúngico (Warnock, 1992; Rex et al, 1995; Johnson et al, 1995). *Candida krusei* e *Candida glabrata*, espécies naturalmente resistentes a este triazólico, foram as primeiras selecionadas. Posteriormente, observou-se que a resistência ao fluconazol também se manifestava em outras espécies (Tumbarello et al, 1996), consequente ao continuado tratamento com este triazólico.

Os pacientes com SIDA desenvolvem candidíase de orofaringe com muita frequência. *Candida* coloniza a boca de 64-84% destes pacientes, dos quais 46% evidenciam sintomas. A prevalência de cepas de *Candida* resistentes a azólicos tem sido estimada entre 21-32% dos pacientes sintomáticos e em 14% dos pacientes assintomáticos (White et al, 1998). Em relação ao itraconazol, o desenvolvimento da resistência é menos intenso, mas não inexistente (Wingard, 1994).

Os fatores predisponentes ao desenvolvimento da resistência aos azólicos, especialmente ao fluconazol, incluem as infecções pelo HIV e o avançado estágio de imunossupressão com linfócitos CD4 inferiores a 50/mm³ (Warnock, 1992). O principal fator de risco para a aquisição de *Candida* resistente a azólicos é o longo uso destes agentes, que resulta em grande pressão seletiva sobre as populações destes fungos, promovendo uma seleção que substitui cepas sensíveis por espécies mais resistentes, como ocorre com *C.krusei* e *C. glabrata*, após o tratamento com fluconazol.

Todavia, a aquisição de cepas resistentes por transmissão hospitalar ou entre parceiros sexuais, também já foi confirmada (Bart-Delabese et al, 1995). A emergência de *Candida dubliniensis*, como uma nova espécie, frequente em pacientes com SIDA

e com potencial tendência ao desenvolvimento de resistência, é outro fator preocupante (Alves et al, 2000).

Menos frequentes, mas não menos importantes, são as observações do desenvolvimento da resistência em *Cryptococcus neoformans*, sobretudo frente ao fluconazol (Kelly et al, 1994; Joseph-Horne et al, 1996). A utilização deste triazólico na terapêutica de manutenção dos pacientes com SIDA e nas meningoencefalites criptocócicas traz a possibilidade do desenvolvimento de resistência a este agente. Por outro lado, a resistência cruzada entre azólicos e poliênicos também já foi constatada, com consideráveis implicações clínicas (Joseph-Horne et al, 1996).

Os principais mecanismos de resistência aos antifúngicos azólicos estão sendo estudados e manifestam-se com características de (Sanglard et al, 1995; Vanden Bossche et al, 1994):

- Redução da suscetibilidade da enzima 14-a-demetilase;
- Amplificação do gene 14DM, codificando a superprodução da enzima 14-a-demetilase e, consequentemente, requerendo maiores doses do azólico para a inibição do fungo;
- Redução da atividade da enzima D-5-6-dessaturase;
- Alterações na relação fosfolípido/esterol não esterificado. O aumento dos esteróis não esterificados reduzem a permeabilidade da membrana fúngica, conduzindo a menor captação do antifúngico. Hitchcock et al (1986) evidenciaram que os azóis, em baixas concentrações, determinam a saturação dos ácidos graxos, concorrendo para a redução da sensibilidade. Assim, a profilaxia antifúngica nos pacientes imunocomprometidos pode determinar a ocorrência deste fenômeno;
- Aumento da squaleno-epoxidase que é acompanhada do aumento da 14-a-demetilase com consequente aumento na biossíntese do ergosterol;
- Modificações estruturais na proteína citocromo P 450 do fungo;
- Efluxo da droga, o que consiste na saída do antifúngico do interior das células fúngicas, através de transporte ativo. Proteínas transportadoras, como as MFS (*major facilitator superfamily*) e a glicoproteína P, são especializadas no bombeamento de algumas drogas do interior celular para o meio externo. Os genes que codificam tais enzimas estão sob investigação e são chamados PDR (*pleiotropic drug resistance*), porque determinam a resistência a várias drogas. Ocorre efluxo em *Candida krusei*, *Candida glabrata* e *Candida albicans* resistentes ao fluconazol (Parkinson et al, 1995).

Além destes mecanismos, há constatações sobre o desenvolvimento de um tipo de resistência transitória. A célula fúngica pode alterar seu fenótipo, provavelmente através de uma expressão gênica transitória e, assim, tornar-se resistente em presença de uma droga. Entretanto, tal fenótipo de resistência poderá ser rapidamente revertido a um fenótipo sensível, caso a droga seja retirada, por algum tempo. Esta resistência transitória é também chamada de resistência epigenética e ainda há poucos estudos a seu respeito (White et al, 1998).

A DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA

As falhas da terapêutica antifúngica precisam ser minuciosamente esclarecidas, para que a resistência possa ser corretamente identificada. Nos insucessos terapêuticos, é de importância conhecer alguns pontos importantes (Graybill, 1996; Working Party British Society for Antimicrobial Chemotherapy, 1995): a) o estado imunológico do paciente, porque agentes, como os azólicos não têm atividade fungicida e, nesta situações, tal efeito pode ser necessário; b) se os níveis séricos do antifúngico foram atingi-

dos para se descartar problemas de má absorção; c) se não estão ocorrendo interações medicamentosas antagonônicas com os antifúngicos em uso; d) se houve a correta identificação do fungo, pois *C. krusei* e *C. glabrata* são naturalmente resistentes ao fluconazol. Caso nenhum destes fatores esteja ocorrendo, a resistência deverá ser investigada.

A realização de testes de suscetibilidade (determinação da CIM e CFM) frente a antifúngicos requer profissional treinado, uma vez que envolve procedimentos bem mais complexos do que os antibiogramas realizados com bactérias. A técnica recomendada pelo NCCLS (M27-A) deverá ser rigorosamente seguida para que os resultados possam ser confiáveis, reprodutíveis e possam ter o impacto clínico esperado (NCCLS).

É possível que, na presente década, face ao sucesso dos tratamentos HAART (*highly active antiretroviral therapy*), as micoses oportunistas dos pacientes com SIDA se reduzam drasticamente. Todavia, as consequências destes novos agentes na microbiota humana são, ainda, pouco conhecidas. Somente a rigorosa vigilância da suscetibilidade dos fungos oportunistas é recomendável, pois, desta forma, estaremos contribuindo para a menor morbidade e maior sobrevida de nossos pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S.H.; LOPES, J.O.; CURY, A.E. – Teste de suscetibilidade aos antifúngicos: por que, quando e como realizar. *NewsLab*, v. 25, p. 140-148, 1997.
- ALVES, S.H.; OLIVEIRA, L.T.O.; SANTÚRIO, J.M. – A importância de *C. dubliniensis* no diagnóstico laboratorial das micoses oportunistas. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, v.32, n.2, p.65-68, 2000.
- BART-DELABESSE, E.; VAN DEVENTER, H.; GOESSENS, W.; POIROT, J.L.; LIORÉ, N.; VAN BELKUM, A.; DROMER, F. – Contribution a molecular typing methods and antifungal susceptibility testing to the study of a candidemia cluster in a burn care unit. *J Clin. Microbiol.*, v.33, p. 3278-3283, 1995.
- BRAJTBURG, J.; ELBERG, S.; KOBAYASHI, G.S.; MEDOFF, G. – Interference with effects of amphotericin B on *C. albicans* cells by 2-chloroethyl-1-nitrosoureas. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 32, n.3, p. 327-330, 1988.
- DICK, J.D.; MERZ, W.G.; SARAL, R. – Incidence of polyene resistant yeasts recovered from clinical specimens. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.18, n.1, p. 158-163, 1980.
- GHANNOUM, M.A.; RICE, L.B. – Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.12, n.4, p.501-517, 1999.
- GRAYBILL, J.R. – The future of antifungal therapy. *Clin. Infect. Dis.*, v. 22, n.suppl 2, p. 166-178, 1996.
- HITCHCOCK, C.A.; BARRET-BEE, K.J.; RUSSEL, N.J. – The lipid composition of azole-sensitive and azole-resistant strains of *C. albicans*. *J. Gen. Microbiol.*, v. 132, n.9, p. 2421-2431, 1986.
- JOHNSON, E.M.; WARNOCK, D.W.; LUCKER, J.; POTER, S.R.; SCULLY, C. – Emergence of azole drug resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 35, p. 103-114, 1995.
- JOSEPH-HORNE, T.; LOEFFLER, S.T.; HOLLOWAY, D.W.; KELLY, S.L. – Amphotericin B resistant isolates of *Cryptococcus neoformans* without alteration in sterol biosynthesis. *J. Med. Vet. Mycol.*, v. 34, p. 223-225, 1996.
- KELLY, S.L.; LAMB, D.C.; TAYLOR, M.; CORRAN, A.J.; BALDWIN, B.C.; POWDERLY, W.G. – Resistance to amphotericin B associate with defective sterol D-8-7-isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strain from an AIDS patient. *FEMS Microbiol. Letters*, v. 122, p. 39-42, 1994.
- KERRIDGE, D.; NICHOLAS, R.D. – Drug resistance in the opportunistic pathogens *Candida albicans* and *C. glabrata*. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 18, n.suppl. B, p. 39-49, 1986.
- LAW, D.; MORE, C.B.; WARDLE, H.M.; GANGUKLI, L.A.; KEANEY, M.G.L.; DENNING, D.W. – High prevalence of antifungal resistance in *Candida spp* from patients with AIDS. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 34, p. 659-668, 1994.
- MACURA, A.B. – Fungal resistance to antimycotic drug: a growing problem. *Int. J. Dermatol.*, v. 30, n.3, p. 181-183, 1991.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. 1997. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard M27^a*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
- PARKINSON, T.; FALCONER, D.J.; HITCHCOCK, C.A. – Fluconazole resistance due to energy-dependent drug efflux in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 39, n.8, p. 1696-1699, 1995.
- POWDERLY, W.G.; KOBAYASHI, G.S.; HERZIG, G.P.; MEDOFF, G. – Amphotericin B-resistant yeasts infection in severely immunocompromised patients. *Am. J. Med.*, v. 84, p. 826-832, 1988.
- REX, J.H.; RINALDI, M.G.; PFALLER, M.A. – Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 39, n.1, p. 1-8, 1995.
- RICHARDSON, M.D.; WARNOCK, D.W. – *Fungal infections diagnosis and management*. Blackwell, London, 1993. p. 207
- SANGLARD, D.; KUCHLER, K.; ISCHER, F.; PAGANI, J.L.; MONOD, M.; BILLE, J. – Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 39, n.11, p. 2378-2386, 1995.
- TUMBARELLO, M.; BEVILACQUA, N.; FEDERICO, G.; MORACE, G.; CAUDA, R.; TACONELLI, E. – Fluconazole-resistant *Candida parapsilosis* fungemia in a patient with AIDS. *Clin. Infect. Dis.*, v. 22, p. 179-180, 1996.
- VANDEN BOSCHE, H.; MARICHAL, P.; ODDS, F.C. – Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. *Trends in Microbiology*, v.2, n.10. p. 393-400, 1994.
- WARNOCK, D.W. – Azole drug resistance in *Candida* species. *J. Med. Mycol.*, v. 37, p. 225-226, 1992.
- WHITE, T.C.; MARR, K.A.; BOWDEN, R.A. – Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.11, n.2, p.382-402, 1998.
- WINGARD, J.R. – Infections due to resistant candida species in patients with cancer who are receiving chemotherapy. *Clin. Infect. Dis.*, v.19, n.suppl 1, p. S49-S53, 1994.
- WORKING PARTY OF BRITISH SOCIETY FOR ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY. Antifungal drug susceptibility testing. *J. Antimicrob Chemother.*, v. 36, p. 899-909, 1995.

Correspondência:

Prof. Sydney Hartz Alves
Rua Venâncio Aires 2766/403 - Santa Maria (RS). 97010.004