

MEDICAMENTELE ANTIFUNGICE ȘI DEZVOLTAREA MECANISMELOR DE REZISTENȚĂ LA UNELE SPECII DE DROJDII

Antifungal drugs and development of resistance mechanisms on some yeasts species

Șef Lucr. Dr. Elena Rusu, Conf. Dr. Manole Cojocaru,
Conf. Dr. Minerva Ghinescu, Asist. Univ. Dr. Ane Mary Anghelina
Facultatea de Medicină, Universitatea „Titu Maiorescu“, București

REZUMAT

Candidozele sunt cele mai întâlnite infecții cauzate de fungi, reprezentând aproximativ jumătate din totalul infecțiilor micotice. Patologia fungică a înregistrat în ultimii ani o frecvență foarte crescută. Factorii care contribuie la această oportunitate a infecțiilor sunt: slăbirea sistemului imunitar, greutate scăzută la naștere, creșterea numărului de pacienți infectați cu HIV, chimioterapia pe termen lung, creșterea utilizării dispozitivelor protetice și a cateterelor vasculare, tratamentele cu corticoizi și antibiotice cu spectru larg. Al doilea motiv pentru creșterea infecțiilor cauzate de *Candida albicans* este existența multor compuși cu activitate antifungică. Aceștia se administrează cu precauție din cauza toxicității lor și a efectelor secundare. Datorită necesității de a combate infecțiile cauzate de fungi, studiul substanțelor antifungice este în plină dezvoltare. Cele mai cunoscute și utilizate substanțe cu activitate antifungică au ca țintă ergosterolul (principalul sterol al membranelor fungice), biosinteza ergosterolului, biosinteza β -1,3-D-glucanului și biosinteza ADN.

Cuvinte cheie: *Candida*, antifungice, rezistență

ABSTRACT

Candidiasis are the most encountered infections caused by fungi, representing almost a half of the overall mycotic infections. Fungal pathology has recorded for the last years an increased incidence. Factors contributing to this infectious opportunity are: weakness of the immune system, decreased weight at birth, larger number of HIV patients, long term chemotherapy, higher use of prosthetic devices and vascular catheters, broad spectrum corticosteroids and antibiotics treatments. The second reason for a higher incidence of infections caused by *Candida albicans* is the occurrence of more antifungal activity. They are administered with caution due to their toxicity and side effects. As the need of counteracting infections caused by fungi is increasing, antifungal substances study is still developing. The most known and used antifungal substances have as target the ergosterol (the main sterol of fungi membranes), ergosterol biosynthesis, β -1,3-D-glucan biosynthesis and DNA biosynthesis.

Key words: *Candida*, antifungal drugs, resistance

INTRODUCERE

Prezența speciei *Candida albicans* este cauza majoră a candidozelor invazive și este cel mai frecvent patogen izolat din sângele pacienților care au suferit tratamente postoperatorii. Septicemiile cauzate de speciile genului *Candida* ocupă locul 4 în topul infecțiilor postoperatorii, cu o rată a mortalității de aproximativ 50%.

Antifungicele sunt medicamente care au acțiune fungicidă sau fungistatică, fiind folosite în administrare sistemică, în micozele sistemice sau în aplicare locală, în micozele localizate, inclusiv la nivelul cavității bucale. Datorită necesității de a combate infecțiile cauzate de fungi, studiul substanțelor antifungice este în plină dezvoltare. După modul și locul lor de acțiune, aceste substanțe pot fi împărțite în fungicide care acționează local și fungicide care

Adresă de corespondență:

Șef Lucr. Dr. Elena Rusu, Facultatea de Medicină, Departamentul Disciplinelor Preclinice, Universitatea „Titu Maiorescu“, Str. Gheorghe Petrașcu, nr. 67A, sector 3, București, Cod 031593
e-mail: elenarusu98@yahoo.com

pot acționa și sistemic. Antifungicele sunt substanțe active față de diferiți fungi patogeni cu spectru de activitate mai larg sau mai îngust. Cele mai cunoscute și utilizate substanțe cu activitate antifungică au ca țintă ergosterolul (principalul sterol al membranelor fungice), biosinteza ergosterolului, biosinteza β -1,3-D-glucanului și biosinteza ADN. Cele mai importante clase de compuși antifunfici sunt: polienele, derivații azolici, echinocandinele și 5-fluorocitozina (5-FC).

POLIENELE

Polienele (amfotericina B și nistatina) sunt substanțe antifungice care au ca țintă ergosterolul, principalul sterol al membranelor fungice. Ele au efect fungicid.

Mecanism de acțiune

Polienele (amfotericina B, nistatin) se intercalează în membranele care conțin ergosterol. Amfotericina B este o macrolidă polienică care se leagă ireversibil de ergosterol și de alți steroli specifici din membrana celulelor fungice (1). Ca urmare, se formează o serie de canale membranare care duc la distrugerea legăturilor chimice, urmată de ieșirea diferitelor molecule cu masă moleculară mică din interiorul celulei și în final la moartea acesteia. De regulă se administrează intravenos, ca tratament de elecție al infecțiilor micotice sistemice rapid progresive la bolnavii imunodeprimați (SIDA).

Nistatina (stamicin) este mai toxică decât amfotericina B, de aceea nu se folosește sistemic, ci numai pentru tratamentul candidozelor locale (cutanate, vaginale, orale). În cazul administrării interne, nistatina este folosită pentru a diminua colonizarea intestinului cu specii ale genului *Candida*, astfel încât să se protejeze pacienții imunodeprimați de apariția candidozei gastrointestinale. Medicamentul este bine tolerat, rar apărând fenomene de intoleranță digestivă (greață).

Polienele sunt utilizate în terapia antifungică de peste 50 de ani, dar utilitatea lor este limitată din cauza toxicității lor crescute asupra organismului uman (datorită asemănărilor între ergosterol și colesterolul membranelor celulare umane). În timpul perfuzării amfotericinei B se produc deseori reacții adverse: stări de greață, febră (precedată eventual de hipotensiune, tahicardie, dispnee, frisoane), vomă, diaree, mialgii etc. Principala problemă în utilizarea ei este nefrotoxicitatea extrem de crescută. Azotemia apare la 80% dintre pacienți, este tranzitorie, mai severă la pacienții cu funcție renală compromisă și este dependentă de doza administrată.

Rezistența la poliene

Dezvoltarea rezistenței la amfotericină B a fost raportată doar în câteva cazuri la pacienți infectați cu specia *Candida albicans*, dar și la alte specii ale acestui gen (pentru cazuri în care s-a utilizat amfotericină B). Rezistența a fost asociată cu reducerea ergosterolului în membrana celulară, reducere atribuită în unele cazuri funcției deficitare a enzimei Erg 3 (2).

INHIBITORII BIOSINTEZEI ERGOSTEROLULUI

Inhibitorii biosintezei ergosterolului includ trei grupe de agenți antifungici:

- Alilamine – terbinafina și naftifina;
- Tiocarbamații – tolnaftat și tolciolat;
- Azolii: imidazoli – ketoconazol (nizoral) și miconazol; triazolii – fluconazol, itraconazol și voriconazol.

Mecanism de acțiune

Ergosterolul este un bioreglator al fluidității membranare și, totodată, un component al membranei fungice. Aceste clase de compuși antifungici interacționează cu enzime care catalizează sinteza ergosterolului din scualen. Alilaminele și tiocarbamații sunt inhibitorii ai unor reacții de la începutul sintezei ergosterolului. Ținta acestor antifungice este scualen epoxidaza codificată de gena *ERG1*. Compușii azolici inhibă enzima citocrom P_{450} (lanosterol 14- α demetilaza) codificată de gena *ERG11*, enzimă care catalizează transformarea lanosterolului în ergosterol. Triazolii (fluconazol, itraconazol, voriconazol și posaconazol) se leagă la gruparea hem a enzimei țintă și blochează demetilarea lanosterolului la C-14, care are ca efect depleția ergosterolului și acumularea de steroli intermediari toxici (3).

Când celulele speciei *C. albicans* au fost tratate cu voriconazol, s-a observat, o acumulare de zimosterol și are loc sinteza scualenului (4). Dintre acești steroli intermediari fac parte 4,14-dimetilzimossterol și 24-metilendihidro-lanosterol care intră în compoziția membranei plasmatică și, ca urmare, are loc alterarea structurii și funcției acesteia.

Acțiunea antifungică a triazolilor este în general fungistatică împotriva speciilor de drojdii, ca de exemplu speciile genului *Candida*, dar fungicidă împotriva infecțiilor cauzate de diferite specii de mușci (de ex. *Aspergillus*).

Derivații de imidazol (miconazol, econazol, ketoconazol) au un mecanism de acțiune mai complex, care inhibă mai multe enzime membranare impli-

cate în biosinteza lipidelor, enzime care intră în constituția membranelor celulare.

Rezistența la triazoli

Cei mai mulți pacienți imunocompromiși urmează tratament profilactic cu triazoli din cauza posibilelor infecții invazive fungice, creându-se astfel condițiile favorabile pentru dezvoltarea rezistenței.

Triazolii inhibă gena *Erg11*, blocând biosinteza ergosterolului. Această acțiune are ca rezultat acumularea de steroli intermediari toxici care distrug integritatea membranelor, culminând cu stresul membranelor. Specia *C. albicans* poate răspunde la stresul celular prin tolerarea expunerii la triazoli și poate dezvolta rezistență la nivel molecular prin mecanisme multiple, dar care nu implică modificări în compoziția sterolului (5). Aceste mecanisme sunt:

- Alterarea enzimei țintă *Erg11* – cel puțin 12 mutații punctiforme ale genei *Erg11* au fost asociate cu rezistența la triazoli, marea majoritate având ca efect compromiterea legării triazolilor la enzima țintă.
- Reglarea în amonte a transportorilor de medicamente (upregulation of multidrug transporters).

Al doilea mecanism prin care poate fi diminuată acțiunea antifungicului este reglarea expresiei în amonte a două clase de transportori de medicamente care se realizează prin efluxul substanței antifungice cu ajutorul unor pompe de eflux. Acest mecanism de rezistență implică existența unor gene care codifică pentru proteinele care au rol în eliminarea substanței antifungice din celulă, proteine numite și pompe de eflux (6). La speciile genului *Candida* aceste gene fac parte din superfamilia de gene transportoare ce leagă ATP-ul, ABC (ATP-binding cassette). Din această familie fac parte genele *CDR1*, *CDR2* (*Candida* drug resistance), *MDR1* (multidrug resistance), gene implicate în rezistența la substanțele azolice (7). De exemplu, genele *CDR1* și *CDR2* sunt supraexprimate la mai multe izolate rezistente la azoli. Prin deleția acestor gene a fost înregistrată o hipersensibilitate la compușii azolici (8). Deși există un număr ridicat de proteine de eflux în membrana celulară, numărul celor care sunt capabile de fluxul substanțelor antifungice este scăzut. Aceste proteine au localizare transmembranară și prezintă domenii specifice de legare a ATP. În cazul unei acumulări excesive de substanță antifungică în celulă, genele implicate în codificarea pompelor de eflux sunt supraexprimate și în acest mod reușesc să elimine substanța toxică din celulă. Cea mai importantă genă este *MDR1*, care codifică o proteină

ce utilizează o pompă de protoni din membrana plasmatică pentru a transporta atât medicamente, cât și alți compuși (9). Supreexpresia acestei gene este asociată cu dezvoltarea rezistenței, iar deleția ei are ca rezultat o sensibilitate crescută la azoli (10).

Răspunsul la stresul celular

Cu excepția celor două mecanisme descrise anterior, există și mecanisme de inducere a stresului celular care permit celulei să facă față acțiunii triazolilor. Un astfel de mecanism implică pierderea funcției enzimei *Erg3* în cadrul biosintezei ergosterolului, inhibând astfel acumularea de steroli toxici, în momentul în care enzima *Erg11* este inhibată de compușii azolici (11). În organismul uman triazolii sunt mai bine tolerați decât imidazolii. De exemplu, printre efectele adverse ale ketoconazolului se întâlnesc frecvent tulburări digestive, reacții alergice cutanate, tulburări endocrine, creșterea reversibilă a transaminazelor hepatice în ser, rar hepatită gravă.

ECHINOCANDINELE

Echinocandinele (caspofungin, micafungin, anidulafungin) sunt o clasă de hexapeptide ciclice care inhibă sinteza peretelui celular prin inhibiția necompetitivă a β -1,3-glucan sintazei. Această enzimă care catalizează sinteza β -1,3-glucanului este o proteină heterodimeră (M=210 kDa) prezentă în celulele fungice, dar absentă în celulele umane.

Principalii compuși ai peretelui celular fungic sunt mananul, chitina, α - și β -glucanul. β -glucanul este o structură celulară specifică regnului *Fungi*. Deoarece acești polimeri ai D-glucozei nu se mai găsesc la speciile altor regnuri, s-a încercat identificarea unor medicamente antifungice care au ca țintă sinteza β -glucanului. Peretele celular al drojdiei *C. albicans* are o structură multistratificată care conține manoproteine și β -glucan în proporție de aproximativ 80%. Straturile externe au în compoziție manoproteine și β -1,6-glucan în timp ce în straturile interne ale peretelui celular predomină β -1,3-glucanul, chitina și un procent mai mic de manoproteine.

Mecanism de acțiune

β -1,3-glucanul este un polizaharid esențial care formează un polimer liniar ce asigură integritatea structurală a peretelui celular fungic. Tratamentul speciilor fungice cu echinocandine duce la blocarea sintezei glucanului fără să influențeze sinteza

acizilor nucleici sau a manoproteinelor. Distrugerea peretelui celular duce la pierderea integrității celulare și la inducerea stresului chimic la nivelul peretelui celular (12,13). Ca efecte secundare al inhibiției β -1,3-glucanului se înregistrează reducerea conținutului în ergosterol și lanosterol precum și creșterea conținutului în chitină al peretelui celular.

În comparație cu activitatea antifungică a triazolilor, echinocandinele au în general activitate fungică asupra drojdiilor (în special a genului *Candida*) și fungistatică asupra mucegaiurilor. Ele prezintă activitate antifungică inclusiv asupra speciilor rezistente la azoli.

Rezistența la echinocandine

Echinocandinele inhibă β -1,3-D-glucan sintaza, enzimă implicată în biosinteza β -1,3-glucanului din compoziția peretelui celular. Această enzimă este formată dintr-un complex enzimatic compus din cel puțin două subunități: Fks1 și Rho1. Fks1 reprezintă subunitatea catalitică și este ținta echinocandinelor. Rho1 este o proteină din subfamilia Rho/Rac și este un reglator pozitiv al activității glucan sintazei. Natura interacțiunilor dintre echinocandine și glucan sintază nu este încă elucidată.

Rezistența clinică la echinocandine este destul de rară, dar s-a întâlnit la pacienți care urmau tratament cu acești agenți antifungici.

Ca și la azoli, mutația enzimei țintă reprezintă un mecanism de rezistență.

Mutațiile la nivelul subunității Fks1 sunt cel mai întâlnit mecanism de rezistență la echinocandine. Aceste mutații duc la micșorarea sensibilității glucan sintazei la echinocandine de aproximativ 1.000 de ori. Polimorfismele întâlnite la nivelul acestei subunități catalitice reduc sensibilitatea la echinocandine și pentru speciile *C. parapsilosis* și *C. guilliermondii*.

Reglarea în amonte a genei *MDR* nu ocupă un loc important în rezistența la echinocandine.

Răspunsul la stresul celular

Capacitatea de supraviețuire a speciei *C. albicans* la stresul celular indus de aceste medicamente antifungice este datorată relației care există între căile de semnal ce mediază răspunsul acestei specii la stresul celular. Prin inhibiția sintezei β -1,3-D-glucanului antifungicele pot cauza pierderea integrității celulare și inducerea stresului la nivelul peretelui celular. Rho1 reglează pozitiv activitatea enzimatică a β -1,3-D-glucan sintazei și este responsabilă de controlul integrității proteinkinazei C

(PKC) din structura peretelui celular fungic. PKC controlează remodelarea periodică a peretelui celular prin ciclul celular ca răspuns la factorii care duc la stresul celular (14).

5-FLUOROCITIZINA

5-Fluorocitizina (5-FC) a fost sintetizată în 1957 și utilizată inițial ca medicament în terapia anticancerosă. Spre deosebire de 5-FU (fluorouracil) care este înrudit cu pirimidinele fluorurate, nu are activitate antineoplazică, dar s-a constatat că prezintă activitate antifungică. Din 1968 este utilizată în tratamentul candidozelor și criptocozelor umane.

Mecanism de acțiune

5-FC este o pirimidină fluorinată și are un mecanism de acțiune diferit de celelalte clase de agenți antifungici. După ce este activată 5-FC, transportul ei în celulă se realizează la nivelul membranei celulare și este convertită la 5-FU (sub acțiunea enzimei citozindeaminaza). În prezența enzimei uracilfosforibozil transferaza 5-FU este convertit la 5-FdUMP (5-fluoro-2'-deoxiuridin-5'-monofosfat), care este fosforilat de două kinaze specifice la 5-FdUTP care sunt încorporate apoi în ADN, respectiv în ARN (15). Concomitent, are loc reducerea 5-FdUMP la 5-fluoro-2'-deoxiuridilat care inhibă enzima timidilat sintază, inhibând astfel sinteza ADN.

Ea nu se administrează singură, deoarece apare repede rezistența; de aceea este administrată împreună cu amfotericina B, această asociere fiind tratamentul de elecție în meningita cauzată de speciile genului *Candida* (16). Efectele toxice ale 5-FC nu sunt directe deoarece celulele umane (și ale mamiferelor) sunt deficitare în enzima citozindeaminaza. Reacții adverse care pot apărea: deprimă funcția măduvei osoase, provocând leucopenie și trombocitopenie; poate provoca enterocolita severă (rar); crește nivelul seric al transaminazelor (efect reversibil).

CONCLUZIE

Substanțele care au efecte antifungice se administrează cu precauție din cauza toxicității lor crescute și a efectelor secundare. Datorită necesității de a combate infecțiile cauzate de diferite specii de drojzii cu potențial patogen, cum ar fi specia *Candida albicans*, studiul acestora este în plină dezvoltare.

BIBLIOGRAFIE

1. **Mukhopadhyay K., Kholi A., Prasad R.** – Drug susceptibilities of yeast cell are affected by membrana lipid composition. *Antimicrob. Agents and Chemother* 2002; 46:3695-3705
2. **Nolte F.S., Parkinson T., Falconer D.J., et al.** – Isolation and characterization of fluconazole- and amfotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob. Agents and Chemother* 1997; 41:196-199
3. **Cowen L.E.** – The evolution of fungal drug resistance modulating the trajectory from genotype to phenotype. *Nat. Rev. Microbiol* 2008; 6:187-198
4. **Sanati H., Belanger P., Fratti R., et al.** – A new triazole, voriconazole (UK-109, 496), block sterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41:2492-2496
5. **Ghannoum M.A., L.B. Rice** – Antifungal agents mode of action, mechanism of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinic. Microbiol. Reviews* 1999; 12: 501-517
6. **Cernika J., Subik J.** – Resistance mechanisms in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates from vaginal candidiasis. *Internat J. Antimicrob. Agents* 2006; 27:403-408
7. **Cheng S., Clancy C.J., Nguyen K.T.A** – *Candida albicans* petite mutant strain with uncoupled oxidative phosphorylation overexpresses MDR1 and has diminished susceptibility to fluconazole and voriconazole. *Antimicrob. Agents and Chemother* 2007; 51:1855-1858
8. **Sanglard D., Ischer F., Monod M., et al.** – Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiol* 1997; 143:405-416
9. **White T.C., Holleman S., Dy F., et al.** – Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents and Chemother* 2002; 46:1704-1713
10. **Perea S., J.L. Lopez-Ribot, W.R. Kirkpatrick, et al.** – Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strain displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob. Agents Chemother* 2001; 45: 2676-2684
11. **Anderson J.B.** – Evolution of antifungal –drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nat. Rev. Microbiol* 2005; 3:547-556
12. **Denning D.W.** – Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* 2003; 362: 1142-1151
13. **Turner M.S., Drew R.H., Perfect J.R.** – Emerging echinocandins for treatment of invasive fungal infection. *Expert Opin. Emerg. Drugs* 2006; 11:231-250
14. **Cowen L.E., and W.J. Steinbach** – Stress, drugs and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. *Eukaryotic Cell* 2008; 7:747-764
15. **Hope W.W., Taberner L., Denning D.W., et al.** – Molecular mechanisms of primary resistance to fucytosine in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents and Chemother* 2004; 48:4377-4386
16. **Corciovei-Constantinescu I.** – Farmacologie. Ediția a II-a. Editura InfoMedica. 2002