

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia

***Antibióticos do Século XX - Ascensão e
Declínio***

André Lourenço Fernandes

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação da Professora Doutora Maria de Lurdes dos
Santos Cristiano

2017

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia

***Antibióticos do Século XX - Ascensão e
Declínio***

André Lourenço Fernandes

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação da Professora Doutora Maria de Lurdes dos
Santos Cristiano

2017

Antibióticos do Século XX - Ascensão e Declínio

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Faro, 29 de Setembro de 2017

Copyright© 2017 André Fernandes

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho, através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Começo por agradecer à minha orientadora, a Professora Doutora Maria de Lurdes Cristiano, pelo tempo e apoio disponibilizado, bem como todas as suas intervenções no decorrer da elaboração da minha tese. Foi a professora que me pegou o gosto pela área da Química Farmacêutica.

À minha família, que mais que ninguém me ajudou e apoiou toda a minha vida e o continuam a fazer, que sempre me incentivaram e cujo esforço passa muitas vezes sem ser reconhecido. Obrigado por tudo!

Aos meus colegas de curso, tanto de uma turma como de outra, e um especial obrigado aos meus grupos de amigos mais chegados de cada ano. Aqueles que há mais tempo me aturam, e que encheram o meu percurso académico de momentos únicos. O curso não se faz sozinho, e o meu foi feito convosco.

E por fim, às minhas colegas de casa, que me têm aturado estes últimos anos. São elas quem mais sofrem logo a seguir à minha família. Às duas raparigas que estiveram ao meu lado durante os melhores e piores momentos, um obrigado muito especial!

Resumo

A evolução da humanidade tem sido acompanhada por um desenvolvimento paralelo de doenças infecciosas provocadas por agentes bacterianos. A quantidade de vidas perdidas devido a infeções causadas por estes microrganismos é incalculável, tendo sido apenas no século XIX que as primeiras respostas terapêuticas para estas infeções começaram a surgir. Neste século foi sintetizado o primeiro de muitos agentes antibacterianos, dando início à era dos antibióticos, que representaram uma evolução exponencial na área da química medicinal. Os antibióticos são moléculas desenvolvidas para combater bactérias, que podem atuar de diversos modos, consoante o organismo alvo e a própria estrutura química do fármaco. Diversas classes de agentes antibacterianos foram colocadas no mercado e, durante algum tempo, acreditou-se que doenças mortíferas resultantes de infeções bacterianas, como por exemplo a tuberculose, não voltariam a matar. No entanto, com o aumento do número de agentes antibacterianos no mercado veio também o seu uso indiscriminado, de forma excessiva e por vezes injustificada. Esta falta de controlo sobre o uso racional de antibióticos estimulou o desenvolvimento de estirpes resistentes, um processo que alastra desde a segunda metade do século XX e que caracteriza a área da antibioterapia atual.

Enquanto os antibióticos mais antigos e tradicionais vão perdendo eficácia devido à seleção para resistências, o recurso a antibióticos mais recentes e de última linha começa a enfrentar o mesmo problema. Com isto, a procura de soluções eficazes e inovadoras para combater infeções bacterianas afirma-se cada vez mais como prioritária para a saúde pública a nível mundial.

A presente dissertação centra-se na temática da ascensão e do declínio dos agentes antibacterianos, desde a sua emergência até à atualidade, abordando também novas perspetivas para o combate a infeções de origem bacteriana. A abordagem é feita com particular incidência nos diferentes alvos para terapia antibacteriana e nos mecanismos de ação de algumas classes de antibióticos, discutindo também os mecanismos de seleção para resistência das bactérias.

Palavras-chave: Antibióticos, bactérias, infeções, resistências, saúde pública.

Abstract

The evolution of Mankind has been accompanied by a parallel development of infectious diseases caused by bacterial agents. The amount of lives lost due to infections caused by these microorganisms is huge, and the first therapeutic answers to these infections only began to emerge in the 19th century, with the birth of antibiotics. The first of many antibacterial agents was synthesized by the end of this century, starting an exponential evolution in the area of medicinal chemistry. Antibiotics are molecules developed to fight bacteria that can act in several ways, according to the bacterial biomolecular target and to the chemical structure of the attacking molecule. Several classes of antibacterial agents were placed on the market, and for a while, it was thought that deadly diseases resulting from bacterial infections, such as tuberculosis, would not kill again. However, the increasing number of antibacterial agents on the market led to their indiscriminate use, in an excessive and sometimes unjustified way. This lack of control over the rational use of antibiotics led to the development of resistance that has become increasingly aggravated, specifically since the second half of the 20th century.

While older and more traditional antibiotics are becoming less and less effective due to the emergence of resistances, the use of newer antibiotics began to face the same problem. As a result, the search for new and innovative solutions to this problem, which is being increasingly recognized as a global public health issue, is a matter of utmost urgency.

The present dissertation deals with the rise and fall of the antibacterial agents, from their emergence to our days, while also exploring new perspectives for the future of anti-infective agents. A particular emphasis is made on the different biological targets and mechanisms of action of major antibiotic classes, as well as on some mechanisms of resistance.

Keywords: Antibiotics, bacteria, infections, resistance, public health.

Índice Remissivo

Índice de Figuras	V
Lista de abreviaturas	VII
1. Introdução	1
2. Metodologia	8
3. Bactérias	9
4. Antibióticos.....	11
4.1. Sulfonamidas	17
4.2. β -lactamas	19
4.2.1. Penicilinas.....	20
4.2.2. Cefalosporinas.....	23
4.2.3. Carbapenemas.....	25
4.2.4. Inibidores de beta-lactamases	26
4.3. Quinolonas e fluoroquinolonas	27
4.4. Tetraciclinas	30
4.5. Macrólidos.....	31
4.6. Aminoglicosídeos.....	34
5. Seleção para resistências a antibióticos	37
5.1. Mutações	38
5.2. Transferência genética	39
6. Futuro.....	41
7. Conclusão.....	45
8. Referências bibliográficas	46

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Representação da estrutura química do Salvarsan	2
Figura 1.2 - Representação da estrutura química do Neosalvarsan	2
Figura 1.3 - Representação da estrutura química do Prontosil	3
Figura 1.4 - Representação da estrutura química da benzilpenicilina.....	3
Figura 1.5 - Representação da estrutura química da estreptomicina	3
Figura 1.6 - Representação da estrutura química da bacitracina	3
Figura 1.7 - Representação da estrutura química da clorotetraciclina.....	4
Figura 1.8 - Representação da estrutura química da eritromicina.....	4
Figura 1.9 - Representação da estrutura química da valinomicina.....	4
Figura 1.10 - Representação da estrutura química da Cefalosporina C.....	4
Figura 1.11 - Representação da estrutura química da Isoniazida.....	4
Figura 1.12 - Representação da estrutura química do ácido nalidíxico.....	4
Figura 1.13 - Representação da estrutura química da ciprofloxacina.....	5
Figura 1.14 - Representação da estrutura química da colistina	6
Figura 1.15 - Representação da estrutura química da amoxicilina	7
Figura 1.16 - Representação da estrutura química do ácido clavulânico	7
Figura 3.1 - Representação da estrutura celular procariota (Adaptado de ²²)	10
Figura 3.2 - Representação da estrutura celular eucariota (Adaptado de ²²)	10
Figura 4.1 - Representação da estrutura química da vancomicina	12
Figura 4.2 - Representação da estrutura da polimixina.....	13
Figura 4.3 - Representação da estrutura química da rifampicina.....	15
Figura 4.4 - Representação da estrutura da nitrofurantoína.....	16
Figura 4.5 - Representação da estrutura química do metronidazol.....	16
Figura 4.6 - Representação da estrutura química do sulfametoxazol	16
Figura 4.7 - Representação da estrutura química do trimetoprim.....	16
Figura 4.8 - Representação da estrutura química da sulfadoxina.....	18
Figura 4.9 - Mecanismo normal de catálise da enzima transpeptidase (Adaptado de ⁴) .	21
Figura 4.10 - Mecanismo de inibição da penicilina (Adaptado de ⁴).....	22
Figura 4.11 - Representação da estrutura química da cefazolina	24
Figura 4.12 - Representação da estrutura química da cefamicina.....	24

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
Antibióticos do Século XX - Ascensão e Declínio

Figura 4.13 - Representação da estrutura química da ceftriaxona.....	24
Figura 4.14 - Representação da estrutura química da cefepima	24
Figura 4.15 - Representação da estrutura química da tienamicina.....	25
Figura 4.16 - Representação da estrutura química do imipenem.....	26
Figura 4.17 - Representação da estrutura química do meropenem.....	26
Figura 4.18 - Representação da estrutura química do doripenem.....	26
Figura 4.19 - Representação da estrutura química do sulbactam	27
Figura 4.20 - Representação da estrutura química da tazobactama.....	27
Figura 4.21 - Representação da estrutura química da norfloxacin.....	28
Figura 4.22 - Representação da estrutura química da levofloxacin.....	28
Figura 4.23 - Representação da estrutura química da moxifloxacin	28
Figura 4.24 - Representação da estrutura química da gemifloxacin	29
Figura 4.25 - Representação da estrutura química da clortetraciclina.....	30
Figura 4.26 - Representação da estrutura química da doxiciclina.....	30
Figura 4.27 - Representação da estrutura química da claritromicina.....	32
Figura 4.28 - Representação da estrutura química da azitromicina.....	32
Figura 4.29 - Representação da estrutura química gentamicina.....	35
Figura 5.1 - Representação da estrutura química da rifamicina	37
Figura 5.2 - Representação da estrutura química da daptomicina.....	38
Figura 6.1 - Representação da estrutura química da mupirocina.....	41
Figura 6.2 - Representação da estrutura química do auranofin	44

Lista de abreviaturas

Cas – Proteína associada ao CRISPR, de *CRISPR-associated proteins*

CRISPR – Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas, de *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*

DNA – Ácido desoxirribonucleico, de *deoxyribonucleic acid*

FDA – *Food and Drug Administration*

MDRTB – Tuberculose multirresistente, de *multi-drug-resistant-tuberculosis*

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro, de *messenger RNA*

PABA – Ácido para-aminobenzóico, de *para-aminobenzoic acid*

PLP – Proteína de ligação da penicilina

RNA – Ácido ribonucleico, de *ribonucleic acid*

rRNA – Ácido ribonucleico ribossômico, de *ribosomal RNA*

SIDA – Síndrome da imunodeficiência adquirida

tRNA – Ácido ribonucleico de transferência, de *transfer RNA*

XDRTB – Tuberculose extensivamente resistente, de *extensively-drug-resistant-tuberculosis*

1. Introdução

As doenças infecciosas são a maior causa de morbidade e mortalidade humana durante a maior parte da sua existência, e os agentes antibacterianos são provavelmente uma das mais úteis e bem-sucedidas formas de quimioterapia na história da medicina. Desde o início da era antibacteriana inúmeras vidas humanas foram poupadas, graças à possibilidade de tratamento de diversas doenças resultantes de infecções por bactérias através da utilização de agentes químicos com atividade antibacteriana, designados por antibióticos. Todavia, as infecções bacterianas permanecem como uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo. ¹

A palavra “Antibiótico” provem da mistura de duas palavras do grego antigo, anti (contra) e bios (vida) sendo, conforme o nome indica, essencialmente um composto desenhado para combater a vida, mais especificamente contra a vida bacteriana. ²

Assim, os antibióticos são moléculas desenvolvidas para combater bactérias. Podem ter atividade bacteriostática, como é o caso das sulfonamidas, inibindo o metabolismo celular e impedindo o crescimento, desenvolvimento e proliferação das colónias bacterianas, ou bactericida, como é o caso das penicilinas, que inibem a síntese da parede celular, levando à lise e morte das células bacterianas diminuindo assim a sua população. ²⁻⁴

Os agentes antibacterianos são usados há vários séculos. Na Grécia Antiga era comum a utilização de vinho, mirra e sais inorgânicos no tratamento de certas infecções, e na Idade Média certos tipos de mel eram usados profilaticamente em feridas de guerra, não sendo porém conhecidos, nessa altura, os microrganismos responsáveis pelas infecções. ⁴

Foi na segunda metade do século XVII que Antonie van Leeuwenhoek, um cientista holandês, identificou os microrganismos causadores das infecções, que ele descreveu como *animalcules* (do latim *animalculum*, pequeno animal), através de observações efetuadas pelo primeiro microscópio, uma invenção da sua autoria. Leeuwenhoek descobriu protozoários e bactérias, sendo um dos grandes pioneiros da área da microbiologia. ^{3,4} Contudo, estes organismos só foram associados a doenças dois séculos depois, na sequência dos estudos elaborados pelo cientista francês Louis Pasteur, impulsionando o início de uma era de descoberta de agentes patogénicos que

acabaria por conduzir ao desenvolvimento de vacinas.^{4,5} No seguimento destas descobertas, Paul Ehrlich propôs o conceito de quimioterapia. Ehrlich defendia que um composto químico poderia interferir diretamente com a proliferação de microrganismos adversos, a concentrações toleradas pelo hospedeiro, sendo o químico a “bala mágica” que iria eliminar o microrganismo invasor sem afetar o hospedeiro. Em 1907 sintetizou o primeiro agente antibacteriano, o composto 606 ou Salvarsan (**figura 1.1**), obtendo assim a sua “bala mágica”. Embora o Salvarsan não fosse eficaz contra uma larga gama de infeções bacterianas, foi o primeiro fármaco eficaz para o tratamento da sífilis.^{4,6} Entrou no mercado em 1910 e permaneceu como a medicação mais frequentemente prescrita, em conjunto com o seu derivado Neosalvarsan (**figura 1.2**), uma alternativa eficaz e menos tóxica, até ser substituído pela penicilina, descoberta em 1928 por Alexander Fleming e colocada no mercado em 1940, na sequência do desenvolvimento de um método para a sua produção em larga escala.^{1,7,8}

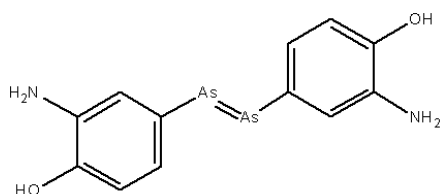


Figura 1.1 – Representação da estrutura química do Salvarsan

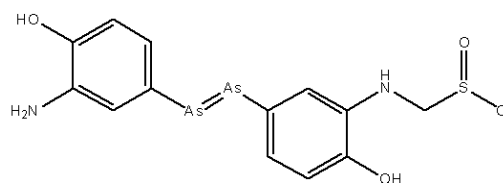


Figura 1.2 - Representação da estrutura química do Neosalvarsan

O Prontosil (**figura 1.3**), um corante sintético de cor vermelha, foi identificado como um agente antibacteriano eficaz contra infeções bacterianas sistémicas e comercializado em 1935. Este pró-fármaco, precursor da primeira sulfonamida usada na terapêutica de infeções bacterianas, resultou num declínio acentuado da mortalidade associada a meningites e pneumonias.^{4,9,10}

Alguns anos depois, em 1940, com o começo da produção industrial de penicilina G (benzilpenicilina) (**figura 1.4**) deu-se início à “era dourada dos agentes antibacterianos”. Todavia, embora esta penicilina tenha obtido grande sucesso no seio da comunidade médica, apresentava um espectro de ação moderado, não sendo eficaz contra todo o tipo de infeção bacteriana. Foi assim necessário desenvolver novos e melhores agentes antibacterianos. Uma vez que a penicilina provinha de um metabolito tóxico derivado de um fungo, os cientistas mudaram o seu foco de atenção para o estudo de espécies de fungos originárias de todos os cantos do mundo, à procura de novos agentes antibacterianos, com espectros de ação mais alargados.^{7,8,10}

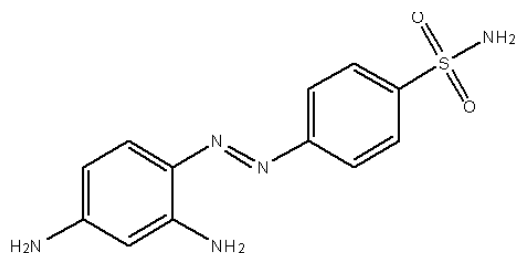


Figura 1.3 - Representação da estrutura química do Prontosil

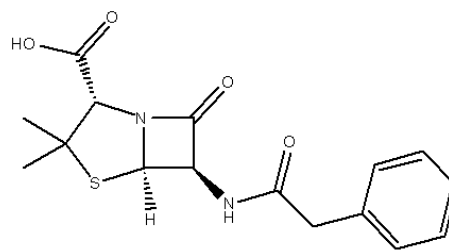


Figura 1.4 - Representação da estrutura química da benzilpenicilina

Em 1944 surgiu a estreptomicina (**figura 1.5**), um antibiótico aminoglicosídico descoberto na sequência de uma pesquisa sistemática de organismos do solo. A Estreptomicina foi o primeiro antibiótico ativo no tratamento da Tuberculose, e rapidamente reduziu a mortalidade associada a esta doença, tendo também sido fundamental no tratamento de outras doenças causadas por uma variedade de bactérias Gram-negativas. Contudo, foi sendo descoberto que os seus efeitos adversos associados a este fármaco eram severos, levando a casos de perda permanente de audição e outros efeitos secundários graves. ^{4,8,11}

Após a Segunda Guerra Mundial a pesquisa na área dos antibióticos continuou a gerar resultados, levando à descoberta de novos compostos da classe das β -lactamas (penicilinas de 2^o e 3^o geração) e de compostos de diversas outras classes, como os antibióticos peptídicos (bacitracina; 1945) (**figura 1.6**), tetracíclicos (clorotetraciclina; 1948) (**figura 1.7**), macrolídeos (eritromicina; 1952) (**figura 1.8**), peptídicos cíclicos (valinomicina) (**figura 1.9**) e, em 1955, foi descoberto o primeiro exemplo do segundo maior grupo de antibióticos β -lactâmicos, a Cefalosporina C (**figura 1.10**).^{10,12}

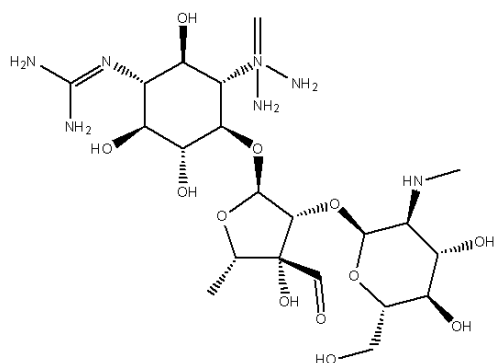


Figura 1.5 - Representação da estrutura química da estreptomicina

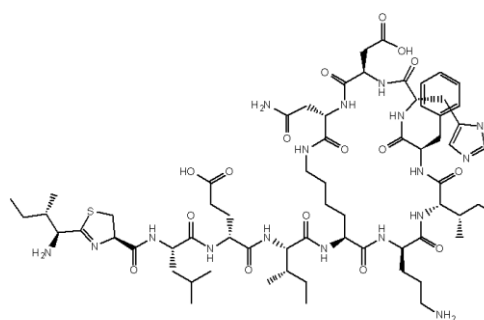


Figura 1.6 - Representação da estrutura química da bacitracina

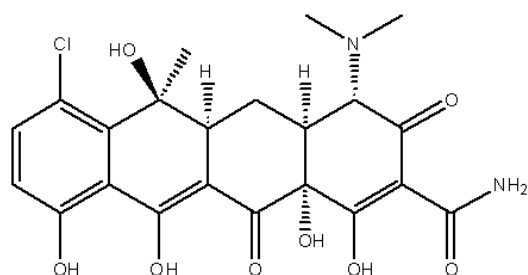


Figura 1.7 - Representação da estrutura química da clorotetraciclina

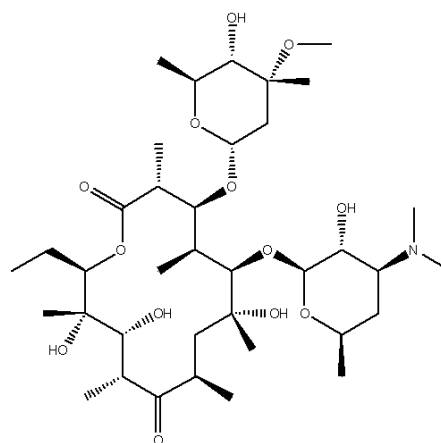


Figura 1.8 - Representação da estrutura química da eritromicina

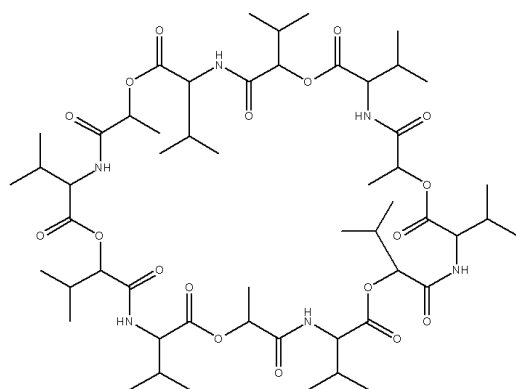


Figura 1.9 - Representação da estrutura química da valinomicina

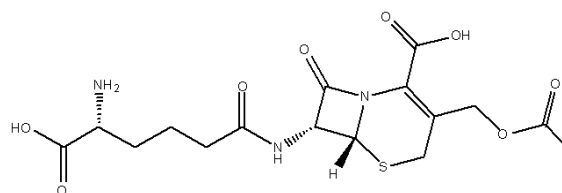


Figura 1.10 - Representação da estrutura química da Cefalosporina C

Relativamente a agentes antibacterianos sintéticos, em 1952 foi comercializada a Isoniazida (**figura 1.11**), que ainda é utilizado como terapêutica de primeira linha no tratamento de Tuberculose. Dez anos mais tarde, em 1962, foi descoberto o primeiro agente antibacteriano da família das quinolonas, o ácido nalidíxico (**figura 1.12**), sendo em 1987 introduzida uma segunda geração desta classe de antibióticos com o surgimento da ciprofloxacina (**figura 1.13**).^{4,8,12}

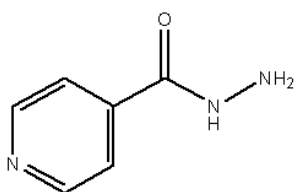


Figura 1.11 - Representação da estrutura química da Isoniazida

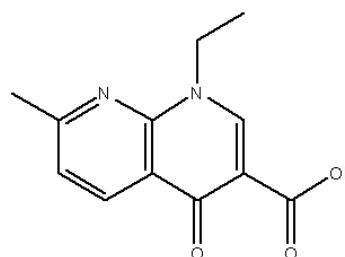


Figura 1.12 - Representação da estrutura química do ácido nalidíxico

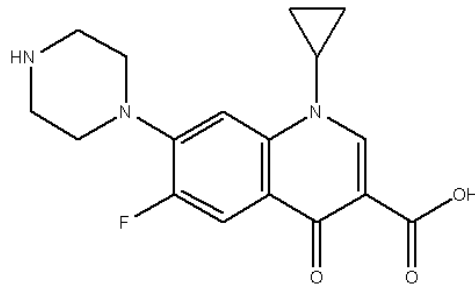


Figura 1.13 - Representação da estrutura química da ciprofloxacina

No entanto, apenas alguns anos após o advento da “era dourada”, surgiram sinais de resistências aos agentes antibacterianos descobertos. Estas resistências a antibióticos ocorrem quando uma bactéria desenvolve mecanismos de defesa específicos contra dado fármaco, deixando de ser destruída por esse fármaco, que perde assim a sua eficácia. A emergência destas resistências resultou do processo de evolução inerente à bactéria. As bactérias resistentes sobrevivem ao tratamento com antibióticos, multiplicam-se, e a sua descendência perde gradualmente a sensibilidade à medicação em uso.¹³

O uso excessivo e desregulado de antibióticos tem sido um problema recorrente, especificamente na segunda metade do século vinte. Os antibióticos passaram a ser usados na agricultura e na pecuária, de forma profilática, para evitar doenças e promover um crescimento acelerado, particularmente de animais destinados à indústria alimentar. Tudo isto resultou numa evolução bacteriana acelerada, que tem originado o aparecimento de mutantes resistentes a antibióticos, num grau alarmante, em todo o mundo.^{7,10,14}

Enquanto os antibióticos tradicionais vão ficando cada vez menos eficazes, os antibióticos de último recurso são utilizados mais frequentemente, e assim as bactérias começam a desenvolver mutantes também resistentes a estes antibióticos. Certas bactérias Gram-negativas são particularmente difíceis de tratar, havendo apenas duas classes de antibióticos que permanecem amplamente eficazes contra ditas bactérias: as carbapenemas e a colistina (**figura 1.14**).^{8,15} Todavia, foi descoberto em 2008 um novo gene responsável pela resistência a carbapenemas na Índia, e mais recentemente, em 2016, foi identificado outro gene responsável pela resistência à colistina na China. Uma vez que não existe mais nenhuma opção de tratamento para bactérias resistentes a

estes antibióticos de última linha, e que os seus genes estão já propagados por todo o mundo, é imperativo que sejam estudadas novas soluções para este problema.^{16,17}

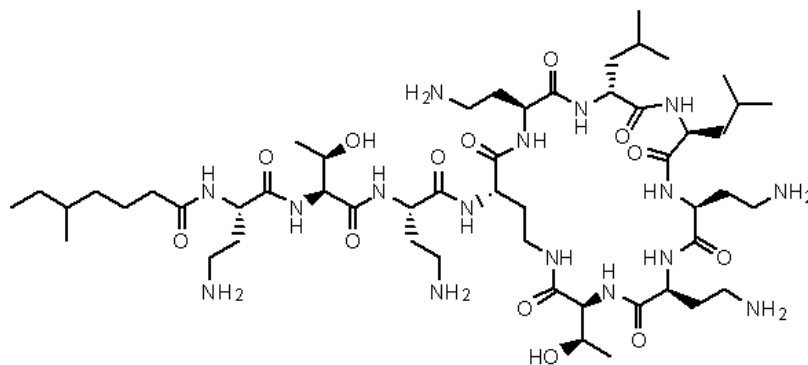


Figura 1.14 - Representação da estrutura química da colistina

Entre 1940 e 1962 foram descobertas vinte novas classes de antibióticos, em parte devido à emergência de bactérias resistentes, possibilitando o tratamento de infeções provocadas por estas bactérias. No entanto, nos cinquenta anos que se seguiram apenas duas novas classes foram comercializadas. Devido à pressão económica sobre a investigação e desenvolvimento na área farmacêutica, a maioria das grandes empresas prefere investir em medicação usada cronicamente, como por exemplo fármacos com atividade anti-hipertensiva, em que o investimento será mais rentável, pois é direcionado a uma população fixa, permanente e geralmente com poder de compra, que requer tratamento contínuo durante anos. Assim, a medicação antibacteriana é um campo de pesquisa cada vez mais complexo.¹⁸

Se as tendências atuais continuarem neste rumo, as infeções resistentes causarão mais mortes, e terão uma enorme repercussão em todo o campo médico, pois quase todos os procedimentos médicos acarretam o risco de infeção bacteriana, incluindo cirurgias (que lesam a pele) e quimioterapia (que suprime o sistema imunitário), que muitas vezes são acompanhadas de tratamento antibiótico profilático. Deste modo, se deixar de existir tratamento antibiótico eficaz, os riscos de adquirir uma infeção que não poderá ser tratada vão ser claramente superiores aos benefícios de muitos procedimentos médicos, que atualmente são tidos como garantidos.¹⁵

Contudo têm sido observados alguns progressos no campo do desenvolvimento de medicação que converte as bactérias resistentes a certos antibióticos em bactérias sensíveis a esses antibióticos (Antibiotic Resistance Breakers), o que permite a reutilização de medicação antiga, como é o exemplo da associação da amoxicilina (**figura 1.15**) com o ácido clavulânico (**figura 1.16**).¹⁹

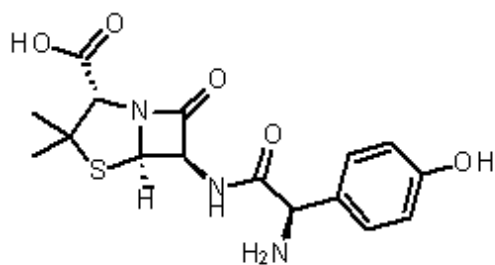


Figura 1.15 - Representação da estrutura química da amoxicilina

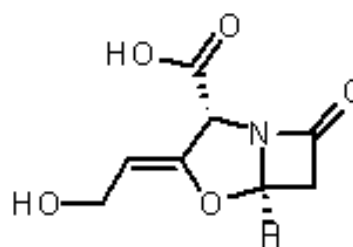


Figura 1.16 - Representação da estrutura química do ácido clavulânico

Face à perda de eficácia dos antibióticos, as medidas mais importantes a tomar a longo prazo envolvem o investimento na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, mas também o incentivo a um uso responsável e moderado dos antibióticos, de forma a reduzir a propagação de resistências.

Muitos dos agentes antibacterianos desenvolvidos no século XX estão ainda disponíveis, e grande parte das doenças bacterianas outrora responsáveis por elevados índices de mortalidade e morbidade estão controladas, como é o exemplo da sífilis, tuberculose, febre tifoide, lepra, tétano. É importante ponderar sobre estes factos e ter em consideração a importância da química farmacêutica na promoção da saúde humana e no bem-estar social. Por exemplo, antes da era dos agentes antibacterianos subsistia um risco elevado de septicémia durante os partos, a pneumonia era uma frequente causa de morte em alas hospitalares e os surtos de tuberculose obrigavam à construção de sanatórios para isolar os doentes, de modo a evitar a propagação da doença.^{4,20}

2. Metodologia

Esta dissertação para obtenção do grau de mestre envolveu uma pesquisa bibliográfica e uma revisão sistemática de várias fontes sobre a evolução e uso de antibióticos e o posterior desenvolvimento de resistências, bem como sobre os mecanismos de ação e propriedades dos mesmos.

Foi feita uma recolha de informação científica sobre o tema em questão através de bases de dados *online* como a PubMed, B-On, NCBI e ResearchGate, entre outras, e ainda recorrendo a livros sobre o uso de antibióticos e funcionamento das células. A pesquisa e recolha de informação *online* foram efetuadas em inglês, usando os termos “*antibiotic resistance*”, “*classes of antibiotics*”, “*mechanism of action*”, “*antibacterial agents*”, “*resistance mechanism*” entre outras.

A importância do objeto de estudo deve-se ao facto de ser um tópico com uma relevância cada vez maior no foro da Saúde Pública, a nível mundial. Deste modo, a dissertação pretende resumir e explicar as informações mais pertinentes sobre o assunto, tentando incentivar à pesquisa de novos meios de combate a doenças provocadas por bactérias.

3. Bactérias

O sucesso dos agentes antibacterianos deve-se ao facto de estes serem capazes de interagir seletivamente com células bacterianas, ignorando as células animais, uma vez que os dois tipos de células, procariotas (**figura 3.1**) e eucariotas (**figura 3.2**), diferem na sua estrutura e na biossíntese.^{12,14}

Tendo em consideração que a célula bacteriana é uma célula procariota e a célula animal é eucariota, existem diferenças entre as duas que podem ser aproveitadas no desenvolvimento de fármacos seletivos. Enquanto a célula animal tem um núcleo definido e contém uma variedade de estruturas chamadas organelos, que incluem a mitocôndria, retículo endoplasmático e o complexo de Golgi, entre outras, a célula bacteriana não contém um núcleo definido e é relativamente mais simples que a célula animal. Além disso, enquanto a célula bacteriana tem uma membrana celular e uma parede celular, a célula animal apenas contém uma membrana celular. A parede celular é crucial para a sobrevivência da célula bacteriana, pois esta precisa de sobreviver num vasto espectro de ambientes e a diferentes pressões osmóticas, condições pelas quais a célula animal não tem de passar. Se a célula bacteriana se encontrar num ambiente aquoso com uma baixa concentração de sais, esta não sofre lise devido à presença da referida parede celular, que embora não impeça a água de entrar na célula diretamente, devido à sua rigidez impede a célula de expandir e inchar até ao ponto de rutura. Contudo, a parede celular não tem a mesma espessura em todas as estirpes bacterianas, sendo diferente para estirpes Gram-positivas e Gram-negativas.^{12,14,21}

As bactérias podem ser classificadas como Gram-positivas ou Gram-negativas através da técnica de coloração de Gram, que envolve a adição de um corante roxo seguida de uma lavagem com acetona. As bactérias com uma parede celular mais espessa (20 a 40 nm) absorvem o corante e são designadas por bactérias Gram-positivas. As bactérias com uma parede celular mais fina (2 a 7 nm) absorvem uma quantidade menor de corante, que é posteriormente removida e descolorada com acetona. Estas bactérias são depois tingidas de rosa com um segundo corante e são designadas por bactérias Gram-negativas.¹²

Embora as bactérias Gram-negativas tenham uma parede celular consideravelmente mais fina, estas possuem uma membrana externa adicional,

constituída por lipopolissacarídeos, que não está presente nas bactérias Gram-positivas. Estas diferenças na estrutura das células, que podem apresentar paredes e membranas celulares diferentes são importantes, pois as células vão ter diferentes vulnerabilidades a diferentes tipos de medicação antibacteriana.^{12,21}

A bioquímica das células bacterianas também difere consideravelmente da bioquímica das células animais. Enquanto algumas bactérias precisam sintetizar vitaminas essenciais, as células animais adquirem-nas a partir da alimentação. As bactérias necessitam assim de certas enzimas que não estão presentes nas células animais, para que possam catalisar estas reações. Estas enzimas podem assim ser alvos terapêuticos preferenciais para o desenvolvimento de agentes antibacterianos seguros.²¹

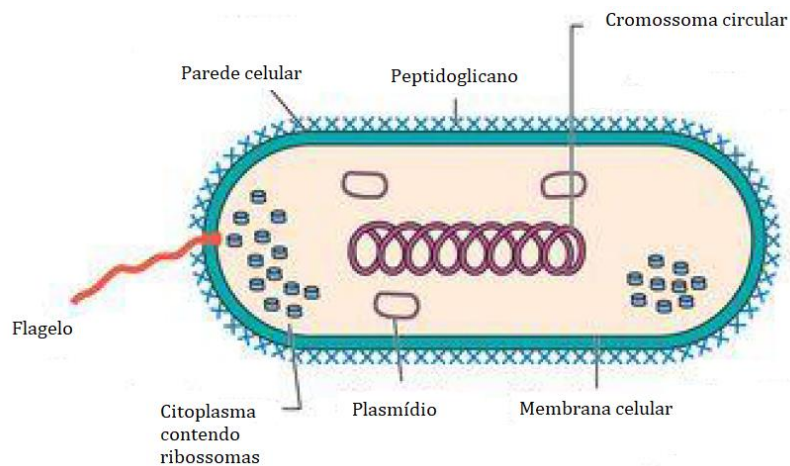


Figura 3.1 - Representação da estrutura celular procariota (Adaptado de ²²)

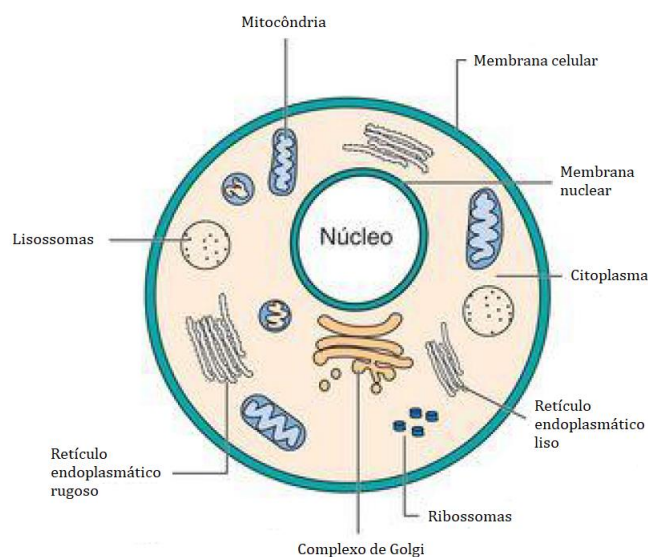


Figura 3.2 - Representação da estrutura celular eucariota (Adaptado de ²²)

4. Antibióticos

Os antibióticos têm sido classificados e categorizados de diversos modos, ao longo dos anos. Dependendo da variedade e diversidade de espécies de bactérias suscetíveis, os agentes antibacterianos podem ser classificados como antibióticos de largo espectro, de espectro intermédio e de estreito espectro de ação. Os antibióticos com um espectro de ação estreito têm uma aplicabilidade limitada, pois são eficazes apenas numa pequena gama de bactérias, podendo apresentar atividade apenas contra bactérias Gram-positivas ou apenas contra Gram-negativas. Pelo contrário, antibióticos de largo espectro de ação são aqueles que são eficazes contra uma grande variedade de bactérias, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.²³

Na terapêutica, sempre que possível é dada preferência ao uso de antibióticos de espectro de ação estreito, pois estes não vão interferir com microrganismos benéficos presentes no corpo humano, como acontece com os antibióticos de largo espectro, não facilitando tanto o aparecimento de resistências e desregulações no organismo, pois são mais específicos no tipo de bactéria com que vão interagir.

Outra forma de classificação dos antibióticos baseia-se no tipo de ação que o agente antibacteriano exerce sobre a bactéria. Assim, os antibióticos podem ser classificados como bactericidas quando destroem as bactérias, por exemplo através da inibição da síntese da parede celular, ou através da inibição de enzimas bacterianas ou de interferência na tradução proteica. Por outro lado, antibióticos que atrasam ou inibem o crescimento e propagação das bactérias são classificados como bacteriostáticos. Estes limitam o crescimento da colónia bacteriana, ao interferir por exemplo com a sua produção de proteínas, a replicação de DNA ou outros aspetos do metabolismo celular da bactéria. Ao inibirem o crescimento bacteriano, os antibióticos bacteriostáticos criam condições para que o organismo do hospedeiro possa combater a infeção, sem que esta se propague de forma descontrolada. Esta classe de antibióticos não deve ser administrada em doentes imunocomprometidos.^{10,23-25}

Os antibióticos podem também ser classificados de acordo com os seus mecanismos de ação antibacteriana. Estão identificados cinco principais grupos de antibióticos, os quais se podem agrupar nas seguintes categorias:

- Inibidores da síntese da parede celular bacteriana. Os antibióticos desta classe conduzem à lise, e consequente morte da célula bacteriana. Uma vez que as células animais não possuem parede celular, estas não são afetadas por estes agentes, que são assim seletivos para as bactérias. Estruturalmente, a célula bacteriana é diferente do resto dos organismos devido à presença de uma rede de peptidoglicanos. É esta estrutura que confere a rigidez à parede celular das bactérias, determinando a sua forma e protegendo-as da lise osmótica. Assim, o processo mais eficaz para evitar o crescimento bacteriano é impedir a síntese da parede celular, inibindo a formação da rede de peptidoglicanos. Os agentes antibacterianos usados para este efeito são denominados inibidores da síntese da parede celular.

Entre as classes de antibióticos que interferem com estes passos específicos da biossíntese da parede celular estão as β -lactamas (incluindo penicilinas, carbapenemas e cefalosporinas) e os glicopeptídeos (como a vancomicina) (figura 4.1).

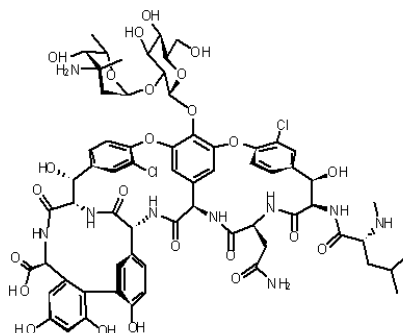


Figura 4.1 - Representação da estrutura química da vancomicina

O último passo na síntese da rede de peptidoglicanos é facilitado pelas proteínas de ligação das penicilinas (PLP), assim chamadas devido à afinidade que têm com a penicilina, que se liga irreversivelmente a estas e inibe a atividade da enzima transpeptidase. Assim, as β -lactamas vão ligar-se a estas proteínas, inibindo a síntese da rede de peptidoglicano.

Por outro lado, os glicopeptídeos inibem a síntese do peptidoglicano em fases mais iniciais, ligando-se diretamente ao mesmo.^{2,12,14,23,26}

- Interação com a membrana plasmática. Alguns agentes antibacterianos interagem com a membrana plasmática, que serve como uma barreira seletiva

derivados da toxicidade e do possível desenvolvimento de resistências aos agentes antibacterianos desta classe.

O processo de tradução de mRNA envolve três fases (iniciação, alongação e terminação). Os fármacos que inibem a síntese proteica fazem parte das classes mais amplas de antibióticos, podendo estas ser divididas em duas subclasses: inibidores de 50S e inibidores de 30S.

Os inibidores de ribossoma 50S incluem macrolídeos (como a eritromicina) entre outros. Estes inibidores atuam bloqueando fisicamente o processo de iniciação da síntese proteica ou interferindo no processo de alongação. Os inibidores de ribossoma 30S incluem as tetraciclinas. Estes interferem também no processo de alongação.

Entre os inibidores de ribossoma, os aminoglicosídeos são os únicos que apresentam ação bactericida. Os macrolídeos e as tetraciclinas são tipicamente agentes bacteriostáticos, embora possam apresentar atividade bactericida em certas espécies de bactérias.

A ligação dos aminoglicosídeos ao ribossoma não termina imediatamente o processo de tradução, promovendo no entanto erros de tradução na síntese proteica através da incorporação de aminoácidos inapropriados em cadeias de péptidos em alongação, que vão posteriormente ser integrados na membrana plasmática, aumentando assim a sua permeabilidade e aumentando o acesso da medicação à célula, o que resulta na inibição ribossômica e/ou lise celular^{2,12,14,23,26}

- Inibição da transcrição e replicação de ácidos nucleicos. Alguns antibióticos atuam através da interferência na divisão celular e/ou na síntese de proteínas essenciais à bactéria. Os ácidos nucleicos DNA e RNA são os elementos chave da replicação em todas as formas de vida conhecidas, incluindo nas bactérias. Uma vez que nas células eucariotas e procariotas as enzimas que estão envolvidas nos processos de síntese de DNA e RNA são significativamente diferentes, é possível através do desenho racional de fármacos conseguir toxicidade seletiva, favorecendo o desenvolvimento deste tipo de agentes antibacterianos.

Os compostos desta classe ligam-se a componentes envolvidos no processo de síntese de DNA e/ou RNA, interferindo com o processo celular normal e

comprometendo a multiplicação e sobrevivência da bactéria, e podem ser subdivididos em inibidores de DNA e inibidores de RNA.

Os inibidores de RNA interferem com o processo de transcrição bacteriana, no qual a informação genética do RNA mensageiro codifica a síntese de proteínas. Um exemplo deste tipo de agentes antibacterianos é a rifampicina (**figura 4.3**), que se liga à RNA polimerase DNA-dependente (enzima que catalisa as reações de iniciação, alongação e terminação da síntese de moléculas de RNA, utilizando o DNA como molde), inibindo a alongação do RNA e comprometendo assim a transcrição genética necessária ao normal funcionamento da bactéria, levando à morte desta.

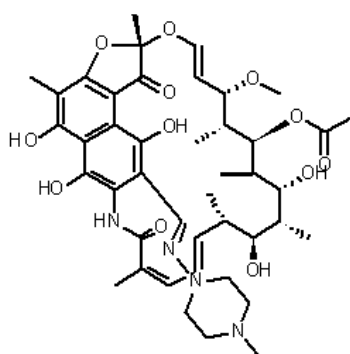


Figura 4.3 - Representação da estrutura química da rifampicina

Os inibidores de DNA incluem o ácido nalidíxico (**figura 1.12**) e a ciprofloxacina (**figura 1.13**), antibióticos da família química das quinolonas. A DNA-girase (uma topoisomerase) é responsável por clivar certas partes do DNA no início do superenrolamento, que são mais tarde conectadas novamente. As quinolonas ligam-se a estas DNA-girases, inibindo a sua função e interrompendo a replicação de DNA, ao impedir que as cadeias de DNA se conectem novamente, dando origem a deterioramento e eventual morte celular. Outra medicação antibacteriana desta classe como a nitrofurantoína (**figura 4.4**) ou metronidazol (**figura 4.5**) atua sobre bactérias anaeróbias, criando metabolitos que se vão ligar às cadeias de DNA, que ficam então mais propensas a ruptura.^{2,12,14,23,26}

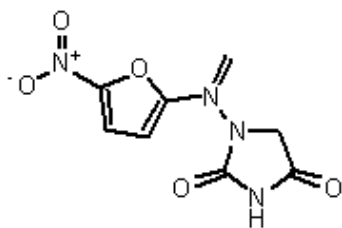


Figura 4.4 - Representação da estrutura da nitrofurantoína

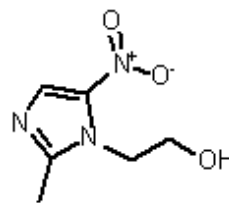


Figura 4.5 - Representação da estrutura química do metronidazol

- **Inibição do metabolismo celular.** Os agentes antibacterianos que atuam através da inibição do metabolismo celular são designados por antimetabolitos. Inibem geralmente o metabolismo do microrganismo sem interferirem com o metabolismo do hospedeiro, uma vez que interferem com reações catalisadas por enzimas que estão presentes na célula bacteriana, mas não na animal. É também possível que estes agentes antibacterianos tenham seletividade contra enzimas que estão presentes em ambas células bacterianas e animais, desde que estas tenham diferenças estruturais significativas. Dois exemplos deste tipo de agentes antibacterianos são as sulfonamidas (sendo o sulfametoxazol um destes fármacos) (**figura 4.6**) e o trimetoprim (**figura 4.7**), que interrompem a síntese de ácido fólico, um passo necessário para a produção de importantes precursores da síntese de DNA e/ou RNA bacteriano. Estes antimetabolitos, também conhecidos como antifolatos, atuam como agentes bacteriostáticos inibindo o desenvolvimento e multiplicação celular da bactéria e dando tempo ao sistema imunitário para combater a infeção.

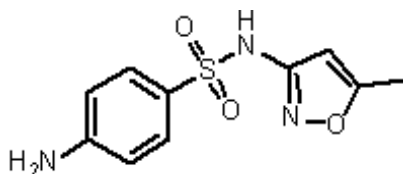


Figura 4.6 - Representação da estrutura química do sulfametoxazol

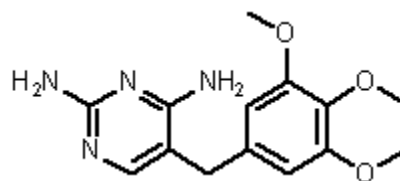


Figura 4.7 - Representação da estrutura química do trimetoprim

As sulfonamidas interagem com o local ativo da enzima bacteriana dihidropteroato sintetase (pois são análogas ao seu substrato, o ácido para-aminobenzóico ou PABA), que catalisa a reação necessária à síntese de ácido fólico. São inibidores competitivos da enzima. As bactérias não possuem estruturas que lhes permitam absorver ácido fólico, necessitando de o produzir,

ao contrário das células animais que não possuem esta enzima pois incorporam o ácido fólico proveniente da dieta, dando origem a que esta classe de fármacos seja seletiva para células bacterianas.

O trimetoprim é um agente antibacteriano altamente seletivo, atuando como inibidor competitivo da diidrofolato redutase, uma enzima que está também envolvida no processo da síntese do ácido fólico, resultado na inibição do crescimento celular bacteriano. Embora a diidrofolato redutase esteja também presente em células animais, esta tem uma estrutura significativamente diferente da que existe nas células bacterianas. O trimetoprim mostrou uma afinidade 100 000 vezes superior para a diidrofolato redutase bacteriana.

Os inibidores de dihidropteroato sintetase e de diidrofolato redutase são por vezes administrados em conjunto (por exemplo a combinação de sulfametoxazol e trimetoprim), para inibição sequencial, pois a sulfonamida inibe a incorporação do PABA na dihidropteroato sintetase e o trimetoprim inibe a diidrofolato redutase. Esta estratégia permite que os fármacos possam ser administrados em doses consideravelmente menores devido à sinergia da conjunção e retardam a seleção para resistências.^{2,10,12,14}

Por fim, é possível também classificar as diferentes classes de antibióticos de acordo com a sua estrutura química. Esta classificação é a preferida na área de química terapêutica e medicinal, uma vez que destaca a relação da estrutura química com a função terapêutica.

4.1. Sulfonamidas

As sulfonamidas foram primeiro testadas nos anos trinta como agentes antibacterianos, na sequência da elucidação da sulfonamida como forma ativa do pró-fármaco Prontosil (**figura 1.3**), um corante metabolizado pelas bactérias presentes no intestino delgado dos animais em estudo e que evidenciou ação antibacteriana. A sulfonamida foi posteriormente sintetizada, tornando-se no primeiro agente antibacteriano sintético ativo contra uma grande variedade de infeções. No entanto, são

frequentemente obtidos produtos tóxicos devidos à sua metabolização, o que levou ao declínio do uso de sulfonamidas em detrimento das penicilinas, alguns anos mais tarde. Mais recentemente, esta classe de compostos foi revisitada, conduzindo à descoberta de fármacos mais recentes, com tempos de semivida superiores e outras características farmacológicas otimizadas. Um exemplo desta nova geração de sulfonamidas é a sulfadoxina (**figura 4.8**), cuja estabilidade metabólica permite a administração apenas uma vez por semana. A geração atual inclui também o sulfametoxazol que é usado constantemente em conjugação com outro antimetabolito, o trimetoprim, no tratamento de infecções do trato urinário, devido à sua forte sinergia. Cada uma destas duas moléculas bloqueia um passo no metabolismo do ácido fólico, que é essencial na produção e desenvolvimento celular.^{2,10,11}

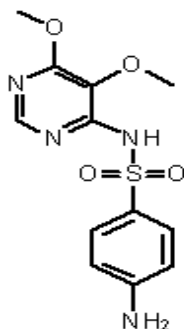


Figura 4.8 - Representação da estrutura química da sulfadoxina

A sulfonamida atua como inibidor competitivo da enzima bacteriana dihidroperato sintetase, devido à sua similaridade com o substrato normal da enzima, o ácido para-aminobenzóico (PABA), impedindo que este se ligue e ocorra a síntese do dihidroperato e bloqueando assim a biossíntese do tetrahydrofolato nas células da bactéria. Tetrahydrofolato é importante tanto para as células animais como para as bacterianas, pois é um cofator enzimático que fornece uma unidade de carbono para a síntese de bases de ácido nucleico de pirimidina, necessárias para a síntese de DNA. Assim, a síntese de pirimidina e DNA é bloqueada, evitando que a célula cresça e se multiplique, sendo por isso classificado como um agente antibacteriano bacteriostático. Uma vez que esta medicação depende de um sistema imunitário saudável para combater a bactéria, não está recomendada a doentes com sistemas imunitários enfraquecidos, como é o caso de doentes com SIDA, em quimioterapia ou até doentes com transplantes que estejam em medicação imunossupressora.^{2,10,12,27}

Uma vez que as sulfonamidas são inibidores competitivos da enzima, esta inibição é reversível, conseguindo as bactérias adquirir resistência a estes fármacos, por exemplo sintetizando mais PABA. Quanto maior a quantidade de PABA presente na célula mais efetivamente este compete com a sulfonamida de modo a ligar-se ao centro ativo da enzima. As bactérias também podem criar resistências através de mutações que alteram a enzima, diminuindo a sua afinidade ou permeabilidade da membrana celular às sulfonamidas.^{2,10,12,27}

Este tipo de agentes antibacterianos não afeta as células animais, pois estas sintetizam o tetrahydrofolato de maneira diferente, não contendo a enzima dihydrofolato sintetase. Nas células animais, o tetrahydrofolato é sintetizado a partir de ácido fólico que é obtido através da alimentação e transferido para o interior das células por uma proteína de transporte, que não está presente na célula bacteriana.^{10,12,27}

Por outro lado, o trimetoprim é um agente antibacteriano altamente seletivo que vai interagir com a dihydrofolato redutase, a enzima que converte o dihydrofolato a tetrahydrofolato, levando também à inibição da síntese de DNA e crescimento celular.^{12,27}

Dihydrofolato redutase está também presente nas células animais, mas devido a mutações ao longo de milhões de anos, estas têm uma estrutura significativamente diferente das da enzima bacteriana, tendo o trimetoprim uma afinidade bastante maior para estas, e sendo muito mais ativo na enzima bacteriana.^{12,27}

Deste modo, as duas enzimas de uma única via metabólica são inibidas, tendo a vantagem de que as doses de ambos os fármacos podem ser mantidas num nível baixo e seguro. Este método terapêutico é descrito como “bloqueio sequencial”.⁴

4.2. β -lactamas

Os antibióticos beta-lactâmicos são uma classe que inclui penicilinas, cefalosporinas e carbapenemas entre outros, sendo que muitos destes fármacos, particularmente os mais recentes, exibem um largo espectro de ação, atuando tanto contra bactérias Gram-negativas como Gram-positivas. Estes agentes antibacterianos

atuam através da inibição da enzima transpeptidase, também conhecida como proteína de ligação da penicilina (PLP), que faz o *crosslinking* entre as cadeias de peptidoglicano de forma a proporcionar força e rigidez à parede celular da bactéria. Esta classe de antibióticos é denominada por beta-lactâmicos pois todos eles têm na sua estrutura um anel beta-lactâmico, que é essencial na estrutura do farmacóforo e confere a atividade antibacteriana.^{28,29}

4.2.1. Penicilinas

O primeiro agente antibacteriano desta classe, a penicilina G (**figura 1.4**), surgiu quando em 1877 Louis Pasteur e Jules Joubert descobriram que certas espécies de fungo produziam substâncias tóxicas contra as bactérias. Estas substâncias eram no entanto também tóxicas para os seres humanos, mas conseguiram assim demonstrar que certas espécies de fungos poderiam ser uma potencial fonte de agentes antibacterianos.⁴

Alguns anos mais tarde, em 1928, Alexander Fleming descobriu acidentalmente que uma das suas culturas bacterianas tinha sido infetada por uma colônia de fungos. Estes eram uma espécie relativamente rara de *Penicillium*. Fleming investigou durante anos o agente antibacteriano por estes produzidos, concluindo que tinha propriedades antibacterianas significantes, e mais importante que tudo, não era tóxico para as células animais. Porém, a substância era demasiado instável e Fleming foi incapaz de isolar e purificar o composto. Este problema foi eventualmente resolvido em 1938 por Howard Florey e Ernst Chain, dando assim, em 1941, origem aos primeiros ensaios clínicos da substância, e abrindo caminho para o seu subsequente uso. Em 1945, Fleming, Florey e Chain foram galardoados com o prémio Nobel de fisiologia ou medicina pela descoberta da penicilina e dos seus efeitos curativos em diversas doenças infecciosas.^{2,8,30}

Desde então as penicilinas têm sido amplamente utilizadas, o que resultou no desenvolvimento de resistências por parte das bactérias, um problema que tem vindo a aumentar. No entanto, em 1976 foi descoberto o ácido clavulânico (**figura 1.16**) que provou ser altamente eficaz na proteção das penicilinas contra as enzimas bacterianas que as atacam, as penicilinases.^{31,32}

A penicilina é um agente antibacteriano que atua inibindo a síntese da parede celular bacteriana, o que representa o cenário ideal em termos de seletividade, pois este fármaco vai interferir com a estrutura de um componente da célula procariota que não se encontra presente nas células animais.³³

Estão envolvidas várias enzimas na biossíntese da parede celular, mas a enzima responsável pela reação final de *crosslinking*, a enzima transpeptidase, é o alvo de inibição da penicilina. Esta enzima liga-se à superfície exterior da membrana celular, onde a penicilina por sua vez se vai ligar ao seu centro ativo, impedindo a formação da estrutura de peptidoglicano. Como resultado, a parede celular torna-se frágil, acabando por não conseguir evitar que a célula inche e rebente.³³

O normal mecanismo de catálise da enzima transpeptidase envolve uma serina no seu centro ativo que atua como nucleófilo de maneira a quebrar a ligação peptídica entre duas unidades de D-alanina de uma cadeia peptídica. A alanina terminal abandona depois o centro ativo, deixando a cadeia peptídica ligada ao centro ativo. De seguida, uma fração de penta-glicina de outra cadeia peptídica entra no centro ativo, e a glicina terminal forma uma ligação peptídica ao grupo de alanina, deslocando-a da serina e ligando as duas cadeias juntas, completando assim o *crosslinking* (figura 4.9). A replicação deste processo permite obter uma forte cobertura em torno de toda a célula bacteriana, a estrutura de peptidoglicano, que consiste em cadeias de polissacarídeos lineares ligados uns aos outros através de cadeias peptídicas curtas.^{2,4,10,12}

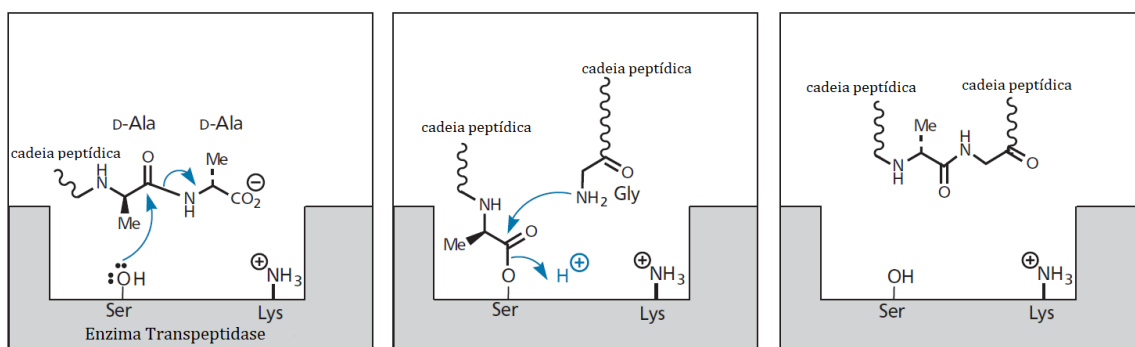


Figura 4.9 – Mecanismo normal de catálise da enzima transpeptidase (Adaptado de ⁴)

No entanto, na presença de penicilina, a enzima ataca o anel beta-lactâmico através de um ataque nucleófilico da serina presente no seu centro ativo. Uma vez que a penicilina é um composto cíclico, a ligação amida é clivada, como acontece com o

substrato natural da enzima, mas o produto não abandona o centro ativo, bloqueando-o e negando acesso a subseqüentes frações de penta-glicinas (**figura 4.10**).^{2,4,10,12}

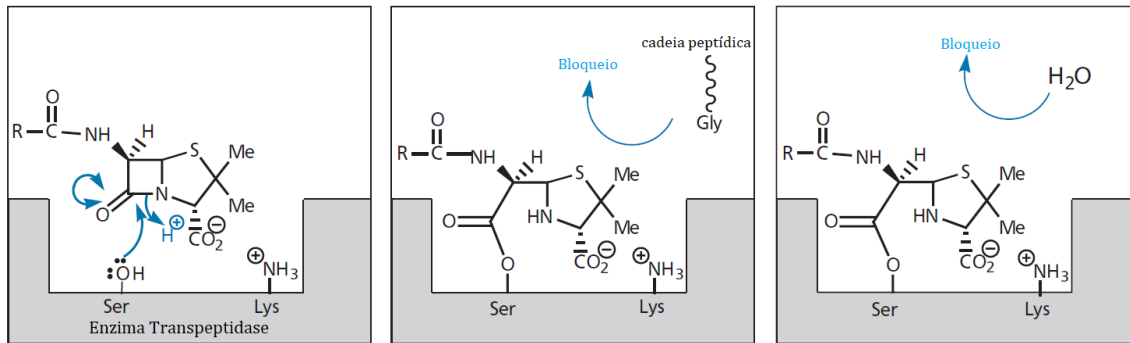


Figura 4.10 - Mecanismo de inibição da penicilina (Adaptado de 4)

A penicilina mimetiza a fração D-alanina, o que explica a falta de toxicidade do fármaco, pois não existem D-aminoácidos ou segmentos de D-alanina em qualquer proteína humana, uma vez que as células humanas usam os isômeros L dos aminoácidos, enquanto as bactérias usam os isômeros D. Assim, a penicilina é seletiva para a enzima bacteriana transpeptidase e é ignorada pelas proteases serínicas presentes no corpo humano.^{2,4,10,12}

Porém, para este agente antibacteriano poder inibir a enzima transpeptidase, tem de primeiro atingir a superfície exterior da membrana celular da bactéria, onde a enzima está localizada, o que quer dizer que tem de passar não só pela parede celular das bactérias Gram-positivas como também das Gram-negativas, e embora a parede celular das bactérias Gram-positivas seja bastante mais espessa que a das Gram-negativas, a penicilina é geralmente mais eficaz contra bactérias Gram-positivas do que contra Gram-negativas. Isto deve-se a que, embora a parede celular seja uma estrutura consideravelmente rígida, é também bastante porosa, deixando pequenas moléculas como a penicilina passar sem grande dificuldade. Por outro lado, as bactérias Gram-negativas possuem uma membrana de lipopolissacarídeos externa que é impermeável a água e a moléculas polares, como a penicilina. Existem no entanto determinadas estruturas proteicas, denominadas porinas, localizadas nesta membrana exterior, que agem como poros, por onde as penicilinas, dependendo das características da porina e da penicilina, podem passar. Regra geral, fármacos de grandes dimensões, de cargas negativas e que sejam hidrofóbicos têm uma maior dificuldade em passar.^{2,4,10,12,28}

As porinas são por isso essenciais no controlo da quantidade de penicilina que é capaz de alcançar o espaço periplásmico entre a membrana exterior e a membrana celular da bactéria. Se o acesso for lento, a concentração de agente antibacteriano em ligação à enzima transpeptidase poderá não ser suficiente para a inibir eficazmente.

Um outro mecanismo de defesa contra este tipo de agentes antibacterianos são as beta-lactamases, enzimas transpeptidase mutadas. Estas enzimas formam também ligações com a penicilina através da serina presente no seu centro ativo, abrindo o anel beta-lactâmico e formando uma ligação éster com a estrutura. No entanto, ao contrário das enzimas transpeptidase, as beta-lactamases estão aptas a hidrolisar esta ligação éster e a libertar posteriormente o composto agora inativo. Algumas bactérias Gram-positivas são resistentes a penicilina, pois libertam as beta-lactamases para o seu ambiente envolvente, de maneira a que a penicilina seja interceptada antes de chegar à membrana celular. No caso das bactérias Gram-negativas, as beta-lactamases libertadas ficam encapsuladas no espaço periplasmático entre a membrana celular e a membrana externa, pois esta última impede a sua passagem. Deste modo, na eventualidade da penicilina passar a membrana externa, esta vai encontrar uma concentração de beta-lactamases bastante superior à que encontraria no caso de ser uma bactéria Gram-positiva. ^{2,4,10,12,28}

4.2.2. Cefalosporinas

De entre os principais grupos de antibióticos beta-lactâmicos, o segundo a ser descoberto foi o das cefalosporinas, com a descoberta da Cefalosporina C (**figura 1.10**), isolada em 1948. Estruturalmente, as cefalosporinas têm algumas semelhanças com a penicilina, como a presença de um anel beta-lactâmico no sistema bicíclico, que no caso das cefalosporinas está ligado com um anel de dihidrotiazina. ²

Embora a Cefalosporina C tenha mostrado menor potência que as penicilinas, apresentou no entanto um espectro de ação mais alargado contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, uma maior resistência a hidrólise ácida e enzimas beta-lactâmicas e menor potencial para causar alergias. Foi por isso um bom composto modelo para o desenvolvimento de novos antibióticos de largo espectro de ação.³⁴

As cefalosporinas de primeira geração, como por exemplo a cefazolina (**figura 4.11**), têm em geral uma menor atividade antibacteriana que as penicilinas, mas um maior espectro de ação. São normalmente pouco absorvidas através do trato gastrointestinal, sendo por isso administradas através de injeções. Devido a uma maior resistência às beta-lactamases, as cefalosporinas de segunda geração, como é o caso da cefamicina (**figura 4.12**), têm um espectro de ação mais alargado que as de primeira geração. Com a terceira geração, foram melhoradas as características que favorecem a penetração do fármaco através da membrana exterior das bactérias Gram-negativas e a sua afinidade para com a enzima transpeptidase. Devido a estas alterações, fármacos como a ceftriaxona (**figura 4.13**), desempenham um papel bastante importante na terapia antibacteriana contra bactérias Gram-negativas, muitas das quais são já resistentes a outros beta-lactamas. Por fim, na quarta e última geração de cefalosporinas, temos fármacos como a cefepima (**figura 4.14**) que apresentam ainda mais facilidade em penetrar a membrana exterior, bem como uma maior afinidade para a enzima transpeptidase e uma afinidade reduzida para uma variedade de beta-lactamases.^{2,12,28,33,34}

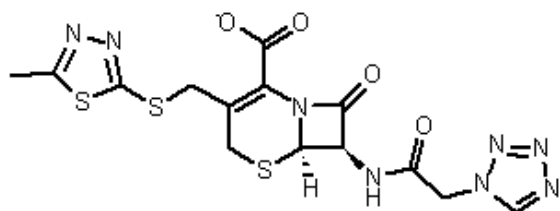


Figura 4.11 - Representação da estrutura química da cefazolina

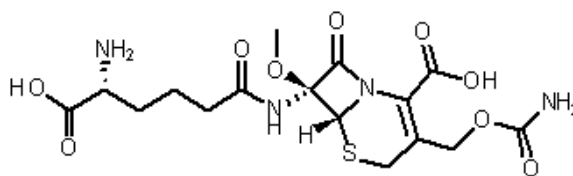


Figura 4.12 - Representação da estrutura química da cefamicina

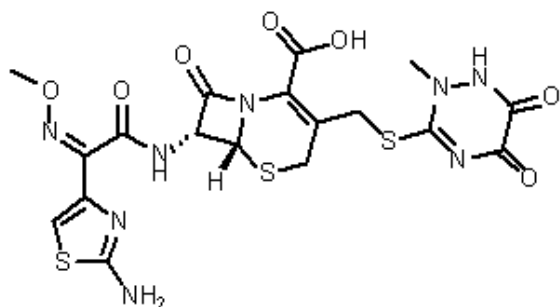


Figura 4.13 - Representação da estrutura química da ceftriaxona

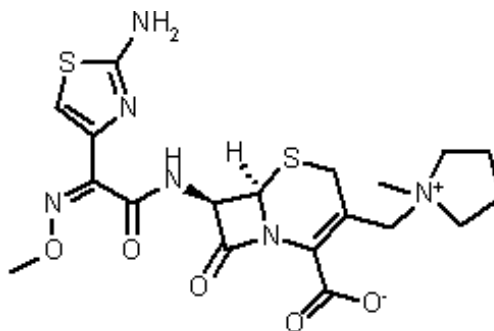


Figura 4.14 - Representação da estrutura química da cefepima

4.2.3. Carbapenemas

Com a emergência de resistências bacterianas à penicilina, especialmente através de produção de beta-lactamases, começaram a ser investigados mecanismos de inibição destas enzimas, descobrindo-se dois compostos: o ácido clavulânico (**figura 1.16**) e a tienamicina (**figura 4.15**).^{35,36}

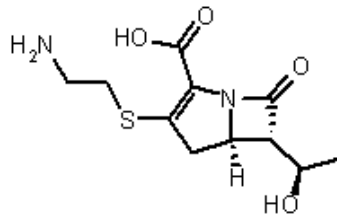


Figura 4.15 - Representação da estrutura química da tienamicina

A tienamicina foi o primeiro composto deste tipo a ser isolado, em 1976. É um agente antibacteriano de grande potência e com um largo espectro de atividade, contra bactérias Gram-positivas e também Gram-negativas, exibindo baixa toxicidade e elevada resistência às beta-lactamases. Porém, este composto mostra uma baixa estabilidade química e metabólica, não sendo absorvido pelo trato gastrointestinal e necessitando por isso ser administrado por via intravenosa.^{2,10,14,35,36}

Tal como os outros agentes beta-lactâmicos, a tienamicina exerce o seu efeito antibiótico através da reação com o sítio ativo da enzima transpeptidase, sendo que um dos fatores determinantes na eficácia destes compostos é a sua habilidade de se reagir com diferentes tipos de transpeptidase. Alguns exemplos desta classe de fármacos são o imipenem (**figura 4.16**), mais direcionado para o tratamento de infeções causadas por bactérias Gram-positivas, o meropenem (**figura 4.17**), mais usado contra infeções causadas por bactérias Gram-negativas e o doripenem (**figura 4.18**), o fármaco menos suscetível a carbapenemases (um tipo de beta-lactamase que é mais ativo contra carbapenemas) e com um espectro de ação mais largo, evidenciando eficácia no tratamento de infeções causadas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.³⁵

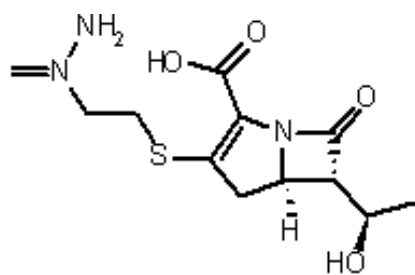


Figura 4.16 - Representação da estrutura química do imipenem

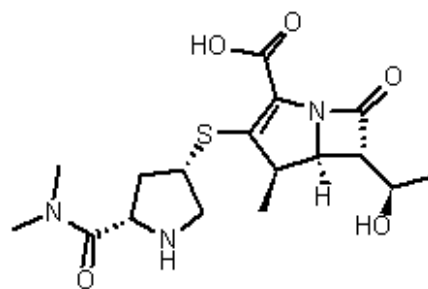


Figura 4.17 - Representação da estrutura química do meropenem

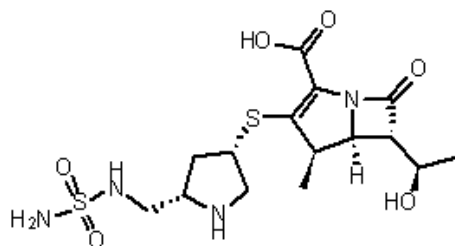


Figura 4.18 - Representação da estrutura química do doripenem

4.2.4. Inibidores de beta-lactamases

Os antibióticos beta-lactâmicos são dos agentes antibacterianos mais importantes, sendo utilizados no combate a infecções patogênicas graves, devido sobretudo à sua elevada eficácia e boa tolerância. Infelizmente o sucesso farmacológico da classe está em perigo devido à emergência e propagação de beta-lactamases, o mecanismo mais comum de resistência bacteriana aos antibióticos beta-lactâmicos.^{35,36}

De modo a tentar combater os efeitos das beta-lactamases foram desenvolvidos inibidores de beta-lactamases, como o ácido clavulânico (**figura 1.16**), o sulbactam (**figura 4.19**) ou a tazobactama (**figura 4.20**), que são usados em conjugação com antibióticos beta-lactâmicos. O ácido clavulânico, o primeiro inibidor de beta-lactamases, foi isolado em 1976. Embora seja um poderoso e irreversível inibidor da maior parte das beta-lactamases tem uma atividade antibiótica muito reduzida, sendo frequentemente utilizado em associação com penicilinas, como por exemplo a amoxicilina. Esta combinação permite reduzir a dose de amoxicilina administrada, aumentando ao mesmo tempo o seu espectro de atividade. O ácido clavulânico atua como um inibidor irreversível, pois reage no centro ativo da beta-lactamase, onde o seu anel beta-lactâmico vai ser quebrado pelo ataque nucleofílico do resíduo de serina,

através de um mecanismo semelhante ao observado na reação com a penicilina, no mesmo sítio ativo. No entanto, o composto reage novamente com outro grupo nucleófilico da enzima, ligando-se a esta irreversivelmente e atuando como um substrato suicida.^{8,14,28,29,32,33,36}

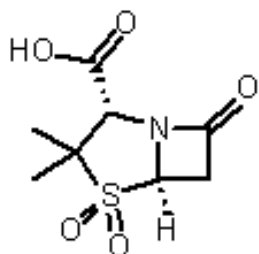


Figura 4.19 - Representação da estrutura química do sulbactam

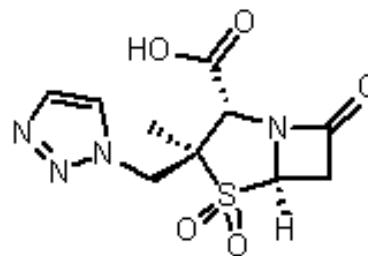


Figura 4.20 - Representação da estrutura química da tazobactama

Os inibidores de beta-lactamases referidos são bastante usados em associação com penicilinas e cefalosporinas. Todavia, há evidências de seleção para resistência. Assim, embora estes compostos ainda sejam eficazes em muitos casos, é necessário investir no desenvolvimento de novos inibidores de beta-lactamases de espectro mais alargado e que sejam eficazes contra todos os tipos de beta-lactamases.

4.3. Quinolonas e fluoroquinolonas

As quinolonas e fluoroquinolonas são uma importante classe de agentes antibacterianos de largo espectro de atividade. A primeira quinolona antibacteriana desenvolvida para utilização clínica foi o ácido nalidíxico (**figura 1.12**), colocado no mercado em 1962. Todavia este fármaco mostrou um espectro de atividade estreito. Subseqüentes modificações na estrutura deste composto de forma a melhorar as suas propriedades antibacterianas e perfil farmacocinético deram origem a uma segunda geração de quinolonas, uma fluoroquinolona, pela adição de um átomo de fluor ao carbono na posição 6 de uma quinolona, dando origem à norfloxacin (**figura 4.21**), colocada no mercado em 1978. Alguns anos mais tarde, em 1987, surgiu a ciprofloxacina (**figura 1.13**), uma das fluoroquinolonas mais ativas no combate a bactérias Gram-negativas.^{10,37}

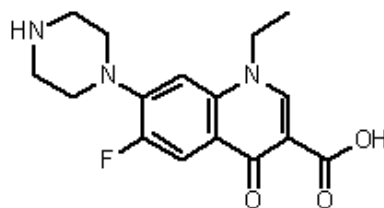


Figura 4.21 - Representação da estrutura química da norfloxacin

Dado o potencial farmacológico das fluoroquinolonas foram sintetizados outros membros desta classe, com o objetivo de identificar novos compostos para desenvolvimento. Estudos de relação estrutura-atividade demonstram que todos os compostos da classe com boa atividade antibacteriana exibem um anel bicíclico semelhante, que inclui um anel de piridona e uma função ácido carboxílico como substituinte na posição 3. Relativamente ao espectro de ação, verificou-se que a primeira e segunda geração de fluoroquinolonas mostravam apenas uma atividade moderada contra *Staphylococcus aureus*, e eram suscetíveis a rápido surgimento de resistências. As quinolonas de terceira geração, como a levofloxacin (figura 4.22) e a moxifloxacin (figura 4.23), foram desenvolvidas com o objetivo de contornar estes problemas. São compostos mais potentes, que demonstram maior atividade bactericida contra bactérias Gram-positivas. A quarta geração de quinolonas, que inclui fármacos como a gemifloxacin (figura 4.24), é uma geração mais potente que as anteriores e com um espectro de ação mais alargado, incluindo ação contra bactérias anaeróbias. A gemifloxacin é atualmente uma das fluoroquinolonas mais potentes, sendo usada no tratamento de pneumonia adquirida na comunidade e de bronquite aguda.^{10,37}



Figura 4.22 - Representação da estrutura química da levofloxacin

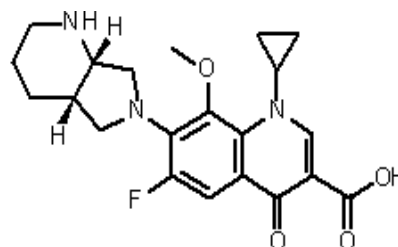


Figura 4.23 - Representação da estrutura química da moxifloxacin

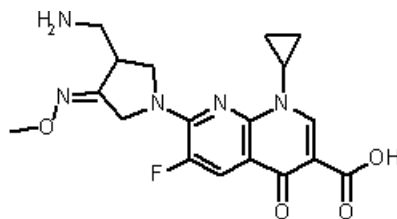


Figura 4.24 - Representação da estrutura química da gemifloxacina

As fluoroquinolonas são agentes antibacterianos ativos contra um largo espectro de bactérias, tanto Gram-positivas como Gram-negativas, têm uma boa absorção oral e distribuição sistêmica. As suas aplicações clínicas entendem-se ao tratamento de infeções do trato respiratório inferior, pele, tecidos moles e doenças sexualmente transmitidas, sendo também utilizadas no tratamento de infeções do trato urinário bem como de infeções que demonstrem mais resistência ao tratamento por outros agentes antibacterianos mais estabelecidos.^{8,37}

As fluoroquinolonas inibem a replicação e transcrição do DNA bacteriano, ao estabilizar o complexo formado entre o DNA e os dois tipos de topoisomerasas II (enzimas que participam no desenrolar do DNA, para a sua posterior transcrição e replicação), topoisomerase IV e DNA girase, que embora sejam bastante semelhantes nas suas estruturas desempenham funções diferentes durante o processo de replicação de DNA.^{37,38}

Em bactérias Gram-positivas, os complexos estabilizados são entre o DNA e a topoisomerase IV, sendo o fármaco 1000 vezes mais seletivo para a enzima bacteriana do que para a enzima animal correspondente. Em bactérias Gram-negativas, o principal alvo das fluoroquinolonas é o complexo entre o DNA e a enzima DNA girase, que está apenas presente em bactérias e é necessária para aliviar a tensão na dupla hélix de DNA, depois da sua replicação e transcrição. Uma vez que esta enzima está apenas presente em células bacterianas, sendo essencial para o crescimento das mesmas, é o alvo ideal para as quinolonas.^{37,38}

A topoisomerase IV é necessária nas fases terminais da replicação de DNA, para quebrar as ligações dos novos cromossomas recentemente replicados. Estas ligações necessitam ser quebradas para que os cromossomas possam ser segregados, de modo a que a divisão celular possa ser completada.^{21,37,38}

É contudo necessário um maior investimento na investigação do modo de ação destes fármacos, que ainda não está totalmente esclarecido. Deste modo, para que se possa perceber e melhor estudar a interação DNA-topoisomerasas, têm sido utilizadas

ferramentas computacionais, como o acoplamento molecular ou *docking*, que facilitam a previsão das estruturas dos complexos proteína-ligando e fornecem informação sobre os modos de interação entre os ligandos e os seus recetores.³⁷

Quanto ao desenvolvimento de resistências a quinolonas, estas podem ser adquiridas através de mutações cromossômicas em genes que codificam as proteínas alvo ou por mutações que causem uma acumulação reduzida do fármaco na célula (ou por uma captação reduzida do fármaco ou por um efluxo aumentado) ou então por aquisição de genes de resistência a quinolonas transferidos por plasmídeos.³⁷

4.4. Tetraciclinas

As tetraciclinas são agentes antimicrobianos bacteriostáticos que possuem um largo espectro de atividade, sendo atualmente o segundo grupo de antibióticos mais prescrito depois das penicilinas. Além das suas propriedades antibacterianas, estes compostos são também eficazes no tratamento de infeções não-bacterianas, como por exemplo no tratamento de doenças resultantes de infeções por protozoários, como a giardíase, e no tratamento de doenças resultantes de infeções virais, como a febre do Nilo Ocidental. As tetraciclinas evidenciaram também propriedades anti-maláricas, atacando estirpes do parasita protozoário *Plasmodium*.^{12,39,40}

O primeiro fármaco do grupo das tetraciclinas a ser descoberto foi a clortetraciclina (**figura 4.25**), isolada em 1948, tendo seguidamente surgido a doxiciclina (**figura 4.26**), o primeiro fármaco semissintético desta classe.^{12,40}

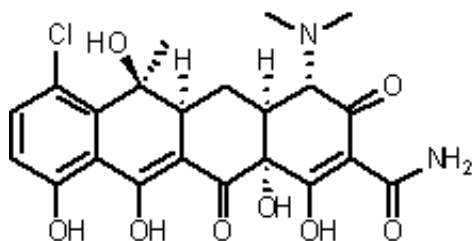


Figura 4.25 - Representação da estrutura química da clortetraciclina

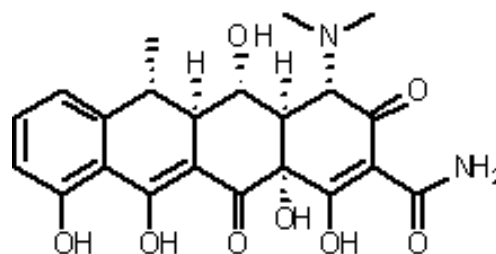


Figura 4.26 - Representação da estrutura química da doxiciclina

As bactérias têm ribossomas 70S, cada um contendo uma pequena subunidade (30S) e uma grande subunidade (50S), responsáveis pela sua síntese proteica. No seu

normal funcionamento, a subunidade 30S vai-se ligar ao RNA mensageiro (mRNA) e inicia a síntese proteica. A subunidade 50S combina então com o complexo subunidade 30S-mRNA, formando o ribossoma, que vai posteriormente ligar-se ao aminoacil-tRNA (RNA transportador ligado a um aminoácido) e catalisar a formação da cadeia proteica.^{21,39-41}

As tetraciclinas inibem a síntese proteica ao ligarem-se à subunidade 30S dos ribossomas, impedindo assim a ligação do aminoacil-tRNA ao complexo mRNA-ribossoma, o que compromete a subsequente adição de aminoácidos à crescente cadeia peptídica, inibindo a síntese proteica.³⁹⁻⁴¹

No caso de bactérias Gram-negativas, as tetraciclinas atravessam a membrana exterior por difusão passiva através das porinas, sendo que a subsequente passagem através da membrana interior é dependente do gradiente de pH. A seletividade deve-se ao facto de as células bacterianas acumularem uma concentração maior destes agentes antibacterianos que as células humanas, pois infelizmente as tetraciclinas são também capazes de inibir a síntese proteica em células animais, embora estas tenham a capacidade de acumularem muito pouco deste fármaco no seu interior.^{10,40}

A seleção para resistência a tetraciclinas tem sido prevalente e frequente, parcialmente devido ao uso destes agentes antibacterianos no tratamento de infeções veterinárias e também como aditivo alimentar, de forma a promover o crescimento saudável de animais recém-nascidos. Entre os mecanismos de resistência estão as bombas de efluxo, que expulsam o antibiótico do interior da célula bacteriana através de transporte ativo, as proteínas de proteção ribossomal, que forçam a libertação da tetraciclina presa ao ribossoma e mutações do rRNA bacteriano.^{12,40}

4.5. Macrólidos

Os macrólidos são agentes antibacterianos com propriedades bacteriostáticas, possuindo também algumas propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras. O primeiro agente antibacteriano desta classe colocado no mercado foi a eritromicina, um metabolito isolado em 1952 que deu origem a um dos fármacos mais seguros, de entre os que estão em uso clínico nos nossos dias.⁴²⁻⁴⁴

Embora a eritromicina seja instável no meio ácido do estômago, pode ser administrada oralmente através de uma fórmula farmacêutica de revestimento gastro-resistente, sendo posteriormente absorvida através do intestino. Com o objetivo de melhorar esta sensibilidade a meios ácidos, foi desenvolvida a claritromicina (**figura 4.27**), um macrólido de segunda geração e análogo da eritromicina que é mais resistente ao ácido gástrico e com uma melhor absorção oral. A azitromicina (**figura 4.28**), um dos fármacos mais vendidos em todo o mundo, é outro exemplo deste tipo de fármacos.^{44,45}

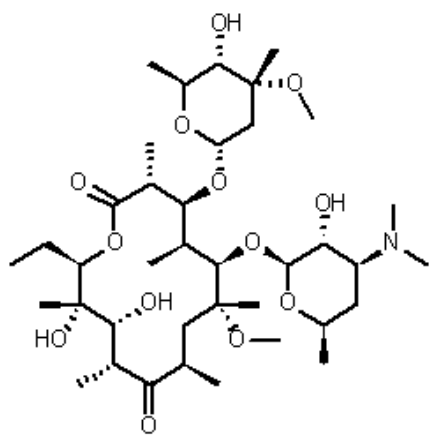


Figura 4.27 - Representação da estrutura química da claritromicina

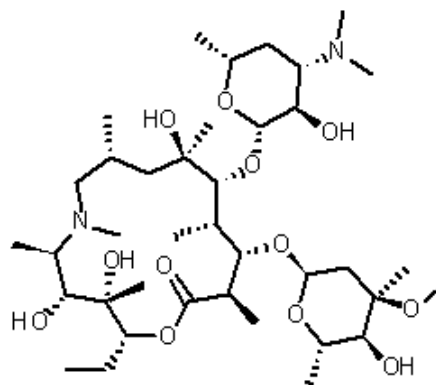


Figura 4.28 - Representação da estrutura química da azitromicina

Os macrólidos apresentam um espectro de ação semelhante ao das penicilinas, com uma reduzida eficácia contra bactérias Gram-negativas. A vantagem que têm sobre as penicilinas deve-se à sua atividade contra os micoplasmas, um tipo de bactéria sem parede celular, sendo por isso imune a antibióticos que inibam a síntese da parede celular, como é o caso das beta-lactamas. É também o tratamento de primeira linha em doentes com alergia a penicilinas.⁸

Quanto ao seu mecanismo de ação, os macrólidos atuam ligando-se à subunidade 23S, uma subunidade da subunidade 50S dos ribossomas bacterianos, inibindo o processo de tradução cromossômica e comprometendo consequentemente a síntese proteica. Alguns estudos indicam como possíveis outros mecanismos de ação desta classe de fármacos.^{8,46}

O ribossoma possui dois sítios de ligação importantes para as moléculas de tRNA entre as suas duas subunidades 30S e 50S: o sítio A (de aminoacil) e o Sítio P (de peptidil). O tRNA liga-se ao sítio A, trazendo consigo o aminoácido correspondente

(aminoacil-tRNA). Posteriormente ocorre um processo de transferência da cadeia peptídica ligada ao tRNA presente no sítio P (peptidil-tRNA), que se vai ligar ao aminoácido codificado pelo tRNA presente no sítio A, alongando assim a cadeia peptídica. De seguida o tRNA presente no sítio P sai, e ocorre o processo de translocação, onde o tRNA do sítio A passa para o sítio P, libertando assim o sítio A uma vez mais.^{21,46}

O mecanismo da inibição da síntese proteica por parte destes agentes antibacterianos depende particularmente da estrutura química específica do fármaco. A estrutura vai afetar a interação do composto com o ribossoma, bem como o seu modo de inibição. Alguns destes modos de inibição incluem a inibição do aumento da cadeia peptídica durante a fase inicial de tradução, a promoção da dissociação do peptidil-tRNA do ribossoma, inibição da formação da ligação peptídica e interferência com a formação da subunidade 50S. Todos estes mecanismos estão relacionados com o local de ligação do macrólido ao ribossoma.^{44,45}

O principal mecanismo de inibição da síntese proteica pelos macrólidos envolve o seu sítio de ligação no *nascent peptide exit tunnel*, que é formado maioritariamente pelo 23S rRNA. Os macrólidos ligam-se junto a uma constricção deste túnel, criando um bloqueio molecular no crescimento da cadeia peptídica. Este tipo de inibição resulta na eventual desassociação do peptidil-tRNA do ribossoma. No entanto, uma vez que tanto o fármaco como a cadeia peptídica estão a competir pelo mesmo espaço neste túnel de saída, é possível que certos péptidos mostrem alguma afinidade para os componentes da parede do túnel que interagem com o fármaco, podendo remover o macrólido do seu sítio de ligação. Assim, este tipo de inibição depende tanto da estrutura do fármaco como da cadeia peptídica e das suas interações com o ribossoma.⁴⁵

A interferência com a formação do ribossoma pode também contribuir para a atividade inibitória destes agentes antibacterianos, sendo que na presença destes fármacos os precursores de subunidades ribossomais 50S são acumulados. Uma das suas subunidades, a 23S, é particularmente mais acessível a modificações químicas antes da sua associação e formação da subunidade 50S. É por isso possível que a ligação do macrólido à unidade 23S, antes da formação da subunidade 50, possa inibir certos rearranjos conformacionais necessários à sua posterior formação.^{21,45}

A grande eficácia e segurança destes fármacos, conjugadas ao seu uso como terapêutica alternativa em doentes com alergia a penicilinas, tornou os macrólidos

numa classe de fármacos frequentemente prescritos, levando ao inevitável surgimento de espécies bacterianas resistentes. Os mecanismos de resistência mais comuns são a expulsão do fármaco da célula e modificações ao centro ativo através metilações ou outras mutações.^{42,44,45}

Estas mutações dos centros ativos são geralmente modificações no 23S ribossômico ou até nas proteínas ribossomais. Estas mutações impedem o fármaco de se ligar ao ribossoma ou tornam o túnel de saída do péptido mais largo, para que o péptido em processo de síntese consiga passar pelo macrólido ligado ao túnel. De forma a combater estes mecanismos, é necessário uma melhor compreensão do funcionamento do ribossoma e das suas estruturas, para que se possa desenhar novos derivados destes fármacos com propriedades farmacológicas melhoradas, exibindo uma ligação mais forte ao seu alvo, ou para que estes fármacos se liguem mais longe no túnel de saída, podendo o peptídio sintetizado ser mais longo e impedindo assim a dissociação do peptidil-tRNA, de forma a incapacitar irreversivelmente a subunidade ribossomal.^{42,44,45}

4.6. Aminoglicosídeos

O primeiro antibiótico aminoglicosídico, a estreptomicina, foi pela primeira vez isolado em 1944, a partir de uma espécie fúngica, *Streptomyces griseus*, por Selman Waksman na sua procura por um agente antibacteriano ativo contra a tuberculose. Este fármaco foi o segundo antibiótico mais importante a ser descoberto, ficando atrás apenas das penicilinas, e foi também o primeiro fármaco eficaz no tratamento da tuberculose. A gentamicina (**figura 4.29**) é outro dos fármacos deste grupo de agentes antibacterianos. Em pH's de 7.4 (valores normais do pH do sangue) estes agentes possuem uma carga positiva, necessária para a sua atividade, pois estes exercem melhor o seu efeito em condições ligeiramente alcalinas. A sua carga iónica é importante, pois regula como estes fármacos são absorvidos através da membrana exterior em bactérias Gram-negativas. Assim, os aminoglicosídeos são principalmente usados no tratamento de infeções causadas por bactérias Gram-negativas. Estes agentes antibacterianos são também usados no tratamento de infeções causadas por algumas bactérias Gram-

positivas, embora seja recomendado o uso de outros antibióticos, como beta-lactamas em terapia de combinação, devido ao efeito sinérgico que daí provém.^{8,10,47}

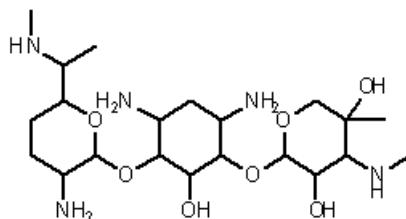


Figura 4.29 - Representação da estrutura química gentamicina

Devido aos baixos níveis de absorção destes fármacos, não é feita administração oral para o tratamento de infeções sistémicas, sendo estes administrados por via parentérica, por injeção intramuscular ou, para casos mais graves, por via intravenosa. Estes antibióticos têm também alguns efeitos adversos, como nefrotoxicidade e ototoxicidade, limitando assim as dosagens da medicação. Embora a nefrotoxicidade seja normalmente reversível, os efeitos de ototoxicidade incluem a perda permanente de algumas capacidades auditivas. A razão da sua ototoxicidade parece estar ligada ao facto de que os aminoglicosídeos terem a capacidade de sequestrar e quelar metais, formando complexos redox-ativos que geram espécies reativas de oxigénio que vão induzir danos celulares.^{30,47}

Os aminoglicosídeos interagem através de interações iónicas com vários grupos carregados negativamente presentes na membrana, como proteínas, lipopolissacarídeos e fosfolípidos que transportam iões de cálcio e magnésio. Estes iões normalmente atuam como conectores entre moléculas de lipopolissacarídeos adjacentes, e o seu deslocamento resulta em rearranjos destas moléculas, de forma a produzirem poros pelos quais o fármaco consegue passar e levando assim ao “*self-promoted uptake*”. De seguida o fármaco necessita passar através da membrana celular para entrar na célula, processo esse que é dependente de energia, necessitando por isso de um sistema de transporte de eletrões funcional, pelo que, bactérias anaeróbicas tendem a não ser suscetíveis a este tipo de fármacos.⁴⁷

Uma vez dentro da célula, estes fármacos vão se ligar aos ribossomas bacterianos para que possam inibir a síntese proteica. Estas ligações são específicas à subunidade ribossomal 30S, e vão prevenir o movimento do ribossoma ao longo do mRNA, impossibilitando a leitura do codão presente no mRNA. Em alguns casos, a síntese

proteica é terminada e as proteínas encurtadas acabam por ir para a membrana celular. Este processo leva a um aumento da permeabilidade da membrana, originando uma maior absorção do fármaco. Os aminoglicosídeos são por isso agentes bactericidas, sendo a sua atividade devida aos efeitos que exercem nos ribossomas e nas membranas celulares exteriores bacterianas.^{2,47}

A seletividade destes fármacos deve-se ao facto de que os ribossomas das células humanas possuem uma estrutura diferente da dos ribossomas bacterianos, tendo as primeiras muito menor afinidade pelo fármaco que as bacterianas.^{4,21}

A resistência a aminoglicosídeos ocorre através de vários mecanismos que coexistem em simultâneo na célula bacteriana. Estes mecanismos incluem a modificação do centro ativo através de mutações ou metilações no ribossoma, redução da permeabilidade membranar através de modificações à membrana celular exterior, diminuição do transporte membranar e bombas de efluxo e inativação enzimática do agente antimicrobiano.⁴⁷

Relativamente a este último mecanismo de inativação enzimática, existem três tipos de enzimas modificadoras dos aminoglicosídeos, que são as nucleotidiltransferases, as fosfotransferases e as acetiltransferases, cada uma delas catalisando uma modificação em diferentes grupos químicos da molécula. Devido ao grande número e capacidade dos genes que codificam para estas enzimas, bem como os numerosos elementos móveis onde estes estão localizados, o resultado é uma alta capacidade de adaptação destas enzimas para utilizar novos antibióticos como substratos e para se disseminarem eficientemente entre a população bacteriana. Assim, praticamente todas as bactérias de interesse medicinal poderão eventualmente adquirir resistência enzimática a aminoglicosídeos.^{2,47}

5. Seleção para resistências a antibióticos

O desenvolvimento de resistências por parte das bactérias é um processo natural e espontâneo, pois estas têm evoluído durante milhares de anos de maneira a resistir à ação de produtos antibacterianos presentes no meio ambiente. No entanto, devido a esta preocupante capacidade de desenvolverem resistências aos fármacos atualmente em uso, a pesquisa de novos compostos antibacterianos mais seguros, eficazes e com amplo espectro de ação não pode ser interrompida. É necessária a exploração de novos e inconventionais caminhos, como o desenvolvimento de compostos biodegradáveis ou compostos que interagem com vários alvos simultaneamente entre outros.⁴⁸⁻⁵⁰

Se a resistência a agentes antibacterianos continuar a alastrar e não surgirem soluções alternativas, a medicina como a conhecemos hoje deixará de existir, uma vez que certos procedimentos médicos, hoje comuns, se tornarão demasiado arriscados devido ao risco de contração de infeções. Algumas das antigas doenças estão a ressurgir, como é o caso da tuberculose multirresistente (MDRTB – multidrug resistant tuberculosis), resultante de uma estirpe multirresistente de *Mycobacterium tuberculosis*. Esta estirpe é resistente a dois dos mais potentes fármacos usados como tratamento de primeira linha na tuberculose, a isoniazida (**figura 1.11**) e a rifampicina (**figura 5.1**). No entanto existem já também estirpes, denominadas por tuberculose extensivamente resistente (XDRTB – extensively drug resistant tuberculosis), que além de resistentes a estes dois potentes compostos são também resistentes a fluoroquinolonas.^{49,51}

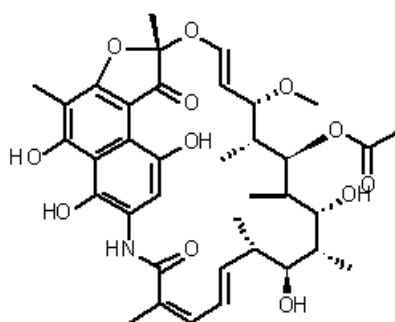


Figura 5.1 - Representação da estrutura química da rifamicina

As bactérias embora sejam intrinsecamente resistentes a alguns tipos de antibióticos podem também adquirir resistência através de mutações espontâneas nos

por mudanças no DNA causadas por fatores externos, e são muitas vezes apenas uma mudança de uma base que vai levar a uma alteração do aminoácido codificado na proteína. Esta proteína embora continue a exercer a sua função poderá proporcionar resistência a um certo agente antibacteriano. ^{2,11,48,50}

Deste modo, mutações espontâneas que confirmam uma menor suscetibilidade a um certo agente antibacteriano, na presença deste, vão ser rapidamente propagados, pois são as estirpes resistentes que não serão afetadas pelo fármaco e que irão proliferar, enquanto as outras serão afetadas pelo dito agente antibacteriano e não se irão multiplicar, não competindo com as bactérias resistentes. É devido a esta característica que os doentes em medicação antibiótica devem sempre cumprir o tratamento completo, mesmo que os seus sintomas desapareçam antes da conclusão do tratamento. Estas mutações são tão aleatórias que é possível que mesmo na ausência do composto antibacteriano, resistência a este seja desenvolvido mesmo antes de haver interação entre a bactéria e o fármaco. ^{11,48,50}

5.2. Transferência genética

Um outro mecanismo de aquisição de resistências por parte das bactérias é a partir de outra célula bacteriana. A transferência horizontal de informação genética pode ocorrer de uma bactéria para outra através de três mecanismos: transformação, transdução e conjugação. ^{2,10-12}

Bacteriófagos são vírus específicos que infetam bactérias e que transportam e transferem entre estes microrganismos pequenos segmentos de informação genética. Durante uma infeção, o bacteriófago insere o seu material genético no citoplasma bacteriano, onde este se vai apoderar da maquinaria celular, usando-a de forma a propagar o seu próprio material genético. Este processo faz com que a célula bacteriana sofra lise, libertando os bacteriófagos até aí produzidos na célula para que este ciclo de infeções se repita. Alguns bacteriófagos têm a capacidade de incorporar genes bacterianos no seu capsídeo e de os transferir de uma bactéria para outra através do processo de transdução. O DNA bacteriano pode então ser incorporado no cromossoma

da bactéria infetada o que irá conferir resistência a estirpes de bactérias até aí não resistentes.^{52,53}

O processo de conjugação é a maneira mais comum de transferência de DNA entre as bactérias. Este mecanismo de conjugação tem a capacidade de transferir vários genes resistentes simultaneamente, através de uma estrutura denominada *pilus* que liga duas bactérias para que a informação genética possa fluir de uma para outra. É através desta estrutura que o plasmídeo que contém a informação genética necessária ao desenvolvimento da resistência antibiótica, passa uma das suas duas cadeias circulares para a bactéria recipiente. Ambas são posteriormente replicadas para que cada uma das bactérias mantenha um plasmídeo com dupla cadeia circular.^{2,11,12}

A célula bacteriana pode também absorver DNA diretamente do meio envolvente e incorporá-lo no seu próprio cromossoma, um processo denominado por transformação. Esta fonte de DNA pode ser proveniente de células mortas ou até de DNA que tenha sido expelido de outras células bacterianas. Este DNA vai ser posteriormente integrado no cromossoma da célula que o absorveu.^{52,54}

Estes processos denominam-se transferência horizontal de genes, diferindo dos processos de transmissão vertical de genes pois a passagem de DNA não é feita através da divisão celular, onde os genes são passados para as subseqüentes gerações bacterianas. Esta transmissão horizontal permite às bactérias uma rápida adaptação ao seu meio envolvente, devido à rapidez com que este processo dissemina os genes bacterianos.⁵²

Uma grande fonte de infeções por bactérias resistentes são os hospitais, mostrando-se um terreno bastante fértil ao desenvolvimento destas uma vez que os fármacos utilizados em hospitais estão presentes em pequenas quantidades no ar, havendo por isso uma maior facilidade de estes entrarem em contacto com doentes que não necessitam de tratamento, indo estas pequenas quantidades de agentes antibacterianos matar as bactérias mais sensíveis do nariz, e criando assim, nas narinas, um ambiente fértil ao desenvolvimento de estirpes resistentes.^{55,56}

6. Futuro

É importante o desenvolvimento de compostos com atividade antibacteriana que atuem através de conceitos até agora ignorados, inovando a pesquisa nesta área e explorando caminhos não convencionais que conduzam à descoberta de novas ferramentas para o combate a infecções, envolvendo novos mecanismos de ação ou novas classes de compostos que irão interagir com centros ativos diferentes. Alguns destes novos conceitos de combate antibacteriano incluem ideias como compostos biodegradáveis.^{48,57}

É também importante no desenvolvimento de novos fármacos, considerar novos alvos terapêuticos. Um exemplo de um novo alvo de ação, ainda muito pouco explorado, são as enzimas aminoacil tRNA sintetase, responsáveis por ligarem os aminoácidos à molécula de tRNA. Estas enzimas têm uma divergência sequencial substancialmente diferente entre células animais e bacterianas, permitindo o desenvolvimento de compostos que possibilitem uma inibição seletiva destas últimas sem afetar o normal funcionamento da célula animal. A isoleucil tRNA sintetase é uma destas enzimas, que se sabe ser inibida pelo agente antibacteriano mupirocina (**figura 6.1**). Este composto é usado topicamente para o tratamento de infecções cutâneas e é também usado para combater a transmissão de *S. aureus* em meio hospitalar, sendo aplicado nas narinas dos doentes e dos profissionais de saúde. Porém, devido ao uso excessivo deste fármaco foram surgindo espécies resistentes de *S. aureus*.^{48,58-60}

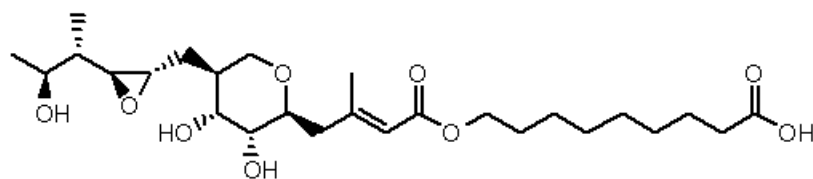


Figura 6.1 - Representação da estrutura química da mupirocina

A eficácia da terapêutica de combinação tem também vindo a ser cada vez mais demonstrada em estudos clínicos, devido à sua extraordinária sinergia. Existem vários exemplos de terapia antibiótica combinada, como é o caso da associação de beta-lactamas com aminoglicosídeos que abrange deste modo um largo espectro de ação, sendo este o principal meio de tratamento para infecções persistentes, como é o exemplo da tuberculose.⁶¹

Um dos principais problemas do uso de antibióticos na medicina humana ou veterinária é o facto de que muitos destes agentes antibacterianos serem excretados ainda na sua forma ativa, fornecendo às bactérias presentes nas fezes e nos meios envolventes um ambiente propenso ao desenvolvimento de resistências. É possível a redução deste problema através da incorporação de mecanismos de autodestruição que serão iniciados após o antibiótico ser eliminado do sistema.^{4,48}

As bactérias são regularmente sujeitas a danificações do seu DNA. Como mecanismo de defesa estas evoluíram, desenvolvendo complexas vias de reparação de DNA que ativam para manter a sua integridade genómica e que usam para combater a constante exposição que têm a vírus chamados bacteriófagos, vírus específicos que infetam apenas bactérias. Estes injetam os seus próprios genes nas células bacterianas, tirando proveito da maquinaria interna da célula de forma a produzir mais bacteriófagos. Como mecanismo de defesa, as bactérias desenvolveram um sistema que envolve o CRISPR e as suas proteínas associadas (Cas). As sequências CRISPR emparelham-se com secções de RNA do bacteriófago para que posteriormente as enzimas Cas se liguem aos CRISPRs de forma a reduzir a expressão do gene do bacteriófago, inativando-o e tornando-o incapaz de prosseguir com a produção de mais bactérias virais, parando a infeção.^{2,62}

É possível assim usar o sistema CRISPR-Cas, quando este é reprogramado para interagir com o DNA da bactéria e não com o RNA dos bacteriófagos, de forma a promover a destruição bacteriana ao degradar o DNA desta com a ajuda das proteínas Cas, levando à excisão de grandes porções do DNA. Existem então dois tipos de sistemas CRISPR-Cas que são atualmente empregues. Um deles leva à imediata lise celular e eficiente degradação do DNA bacteriano, no outro a proteína Cas9 introduz uma rutura de cadeia dupla em todas as cópias do cromossoma simultaneamente, impedindo assim a reparação deste através de recombinação com um cromossoma-irmão e levando assim também à morte celular.⁶²

Embora este sistema tenha sido desenvolvido pelas bactérias é também funcional em células animais e vegetais, levando à descoberta de um mecanismo que pode ser usado como uma ferramenta de edição genómica. Este apresenta algumas vantagens em relação a antibióticos já existentes, como a possibilidade de interagir apenas com os genes essenciais que distinguem uma única espécie bacteriana, conferindo um elevado grau de especificidade, de forma a reduzir o impacto no

microbioma humano que os antibióticos convencionais atualmente apresentam. A grande vantagem deste novo sistema é a sua capacidade para evitar o desenvolvimento de resistência antibiótica. Até agora, os genes anti-CRISPR (como genes que inativem as proteínas Cas), foram apenas identificados em bacteriófagos e não em células bacterianas, sendo extremamente difícil para as bactérias desenvolverem este tipo de resistência, pois implicaria destruir moléculas envolvidas no seu próprio sistema imunitário.^{2,62}

O uso de nanopartículas no combate a bactérias é também uma alternativa particularmente vantajosa, devido aos múltiplos mecanismos de ação simultâneos que estas empregam, pois para que seja desenvolvida alguma resistência a este tipo de fármacos seria necessárias múltiplas e simultâneas mutações genéticas na mesma célula bacteriana. Além disso a maior parte dos mecanismos de resistência são irrelevantes para as nanopartículas, pois o seu modo de ação envolve contacto direto com a parede celular sem necessitar de a penetrar, demonstrando um vasto espectro de ação contra bactérias Gram-positivas e também Gram-negativas. No entanto estes mecanismos de ação não são bem conhecidos, sabendo-se apenas que atuam através da indução de stresse oxidativo, libertação de iões metálicos e outros mecanismos não-oxidativos.^{63,64}

Um outro método alternativo para a descoberta de novos agentes antibacterianos, é através da reutilização de fármacos já aprovados para outras indicações terapêuticas que também são providos de uma potente atividade antibacteriana. Este método é muito mais rápido e bastante mais viável economicamente. Um exemplo deste tipo de compostos é o auranofin (**figura 6.2**), um complexo de ouro que foi inicialmente aprovado para o tratamento de artrite reumatoide, sendo-lhe posteriormente conferido o estatuto de “fármaco órfão” pela FDA, devido às suas propriedades antiparasitárias, de forma a ser usado no tratamento de amebíases humanas em 2012. Mostrou também atividade antibacteriana contra bactérias como *S. aureus*, *Clostridium difficile* e *Enterococcus faecalis*. O seu principal mecanismo de ação é através da inibição de enzimas envolvidas em processos de redução/oxidação, sendo que este fármaco atua também ao criar fortes ligações com selénio inorgânico presente na célula bacteriana, que vai ser necessário no ciclo de produção de energia da bactéria. Este composto mostrou também atividade contra *S. aureus*, incluindo em estirpes multirresistentes, embora o seu mecanismo de inibição de crescimento não seja ainda conhecido.⁶⁵⁻⁶⁷

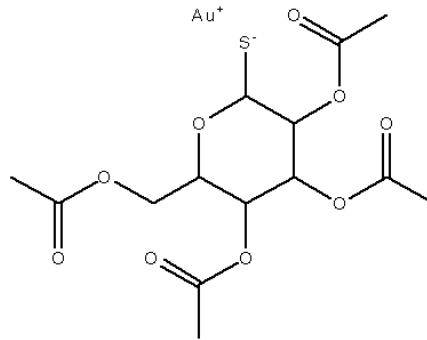


Figura 6.2 - Representação da estrutura química do auranofin

É assim importante enveredar por novas vias, como a reutilização de fármacos já presentes no mercado, que demonstrem potencial no combate a infeções onde a terapêutica corrente falha ou se mostra inadequada, pois a descoberta de novos fármacos é um processo dispendioso tanto a nível económico como a nível de tempo, e não recebe o apoio necessário do governo ou da indústria, particularmente na área dos agentes antibacterianos. Assim, ao reutilizar fármacos que já passaram pela fase de ensaios clínicos, estes podem ser testados para novas indicações terapêuticas mais rapidamente e com um menor custo que o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos de origem. ⁶⁵⁻⁶⁷

7. Conclusão

A descoberta de agentes antibacterianos foi um grande marco na história da saúde pública, salvando inúmeras vidas desde a sua introdução no mercado. Devido à importância destes fármacos, o seu uso foi geral e muitas vezes considerado a cura para todos os males. A utilização extensiva e muitas vezes inadequada desta classe farmacológica levou ao desenvolvimento por parte das bactérias de um elevado número de resistências. Assim, para que se possa combater estas novas ameaças que são os agentes patogénicos resistentes, é fundamental considerar mecanismos de ação inovadores na conceção de novos fármacos antibacterianos, que exerçam o seu efeito através de ligações a sítios alvo diferentes das outras classes de agentes antibacterianos.

Tecnologias agora em desenvolvimento, como as nanopartículas, apresentam uma grande vantagem no combate aos agentes bacterianos. O mesmo acontece com a aplicação do sistema CRISPR, que se tem desenvolvido através do estudo mais aprofundado da maquinaria celular bacteriana. É importante investir nestas novas abordagens, pois são inovadoras e atuam através de mecanismos diferentes dos usados até agora. Mais importante ainda e de forma contrária ao que se verifica atualmente, é crucial salientar também a dificuldade destes organismos desenvolverem resistências a estes novos métodos devido à forma como estes atuam.

Outra ferramenta importante no aumento do arsenal contra as bactérias prende-se com fármacos já aprovados e que se encontram no mercado com indicações terapêuticas variadas e distintas. A sua grande vantagem deve-se ao facto de já terem sido estudados e testados previamente, pelo que o investimento monetário dirigido a estudos que justifiquem o seu uso enquanto agentes antibacterianos será muito menor.

8. Referências bibliográficas

1. Yanling, J., Xin, L. & Zhiyuan, L. The Antibacterial Drug Discovery. *Intech* **6**, 111–133 (2016).
2. Walsh, C. & Wencemicz, T. *Antibiotics: Challenges, Mechanisms, Opportunities*. (2016). doi:10.1128/9781555819316
3. Gest, H. The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni van Leeuwenhoek, Fellows of The Royal Society. *Notes Rec. R. Soc.* **58**, 187–201 (2004).
4. Patrick, G. L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*. (2013).
5. Berche, P. Louis Pasteur, from crystals of life to vaccination. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**, 1–6 (2012).
6. Bosch, F. & Rosich, L. The contributions of paul ehrlich to pharmacology: A tribute on the occasion of the centenary of his nobel prize. *Pharmacology* **82**, 171–179 (2008).
7. Aminov, R. I. A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Front. Microbiol.* **1**, 1–7 (2010).
8. Aminov, R. History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. *Biochem. Pharmacol.* **133**, (2017).
9. Maddison, J. E., Page, S. W. & Church, D. B. Small Animal Clinical Pharmacology. *Vet. Med.* 2008 (2008). doi:10.1016/B978-0-7020-2858-8.50029-4
10. Bhattacharjee, M. K. *Chemistry of Antibiotics and Related Drugs*. (2016). doi:10.1007/978-3-319-40746-3
11. Skold, O. *Antibiotics and Antibiotic Resistance*. (2011).
12. Anderson, R. J., Groundwater, P. W., Todd, A. & Worsley, A. J. *Antibacterial agents : chemistry, mode of action, mechanisms of resistance and clinical applications*. (Wiley, 2012). doi:10.1002/9781118325421.ch8
13. Bérdy, J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **65**, (2012).
14. Walsh, C. *Antibiotics: Actions, origines, resistance*. (2003).
15. Laxminarayan, R. *et al.* Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect. Dis.* **13**, 1057–1098 (2013).

16. Hasman, H. *et al.* Detection of mcr-1 encoding plasmid-mediated colistin-resistant escherichia coli isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, denmark 2015. *Eurosurveillance* **20**, 1–5 (2015).
17. Johnson, A. P. & Woodford, N. Global spread of antibiotic resistance: The example of New Delhi metallo-β-lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *J. Med. Microbiol.* **62**, 499–513 (2013).
18. Coates, A. R., Halls, G. & Hu, Y. Novel classes of antibiotics or more of the same? *Br. J. Pharmacol.* **163**, 184–194 (2011).
19. Brown, D. Antibiotic resistance breakers: can repurposed drugs fill the antibiotic discovery void? *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 821–832 (2015).
20. Ventola, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis. *P T A peer-reviewed J. Formul. Manag.* **40**, (2015).
21. Cooper, G. M. & Hausman, R. E. The Cell: A Molecular Approach. *Igarss 2014* (2007). doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2
22. Murray, P. R., Rosenthal, K. S. & Pfaller, M. A. *Microbiologia Médica. Microbiologia médica* (2009). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
23. Ullah, H. & Ali, S. Classification of Anti-Bacterial Agents and Their Functions. *Des. Control Appl. Mechatron. Syst. Eng.* 135–152 (2012). doi:10.5772/67458
24. Shetty, N., Tang, J. . & Andrews, J. *Infectious Disease, Pathogenesis, Prevention, and Case Studies. Obstetrics and Gynecology* (2009).
25. Erik M. Scholor and William B. Pratt. *The antimicrobial drugs.* (OXFORD University Press, 2000).
26. Kohanski, M. A., Dwyer, D. J. & Collins, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 423–435 (2010).
27. Capasso, C. & Supuran, C. T. Sulfa and trimethoprim-like drugs - antimetabolites acting as carbonic anhydrase, dihydropteroate synthase and dihydrofolate reductase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **29**, 379–87 (2014).
28. Essack, S. Y. The development of beta-lactam antibiotics in response to the evolution of beta-lactamases. *Pharm. Res.* **18**, (2001).
29. Alaybeyoglu, B., Uluocak, B. G., Akbulut, B. S. & Ozkirimli, E. The effect of a beta-lactamase inhibitor peptide on bacterial membrane structure and integrity: a comparative study. *J. Pept. Sci.* **23**, 374–383 (2017).
30. Becker, D. E. Antimicrobial drugs. *Anesth. Prog.* **60**, (2013).

31. Song, J. Y., Jensen, S. E. & Lee, K. J. Clavulanic acid biosynthesis and genetic manipulation for its overproduction. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **88**, 659–669 (2010).
32. Olsen, I. New promising β -lactamase inhibitors for clinical use. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **34**, 1303–1308 (2015).
33. Nikolaidis, I., Favini-Stabile, S. & Dessen, A. Resistance to antibiotics targeted to the bacterial cell wall. *Protein Sci.* **23**, (2014).
34. Gröger, H., Pieper, M., König, B., Bayer, T. & Schleich, H. Industrial landmarks in the development of sustainable production processes for the β -lactam antibiotic key intermediate 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA). *Sustain. Chem. Pharm.* **5**, 72–79 (2017).
35. Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A. & Bonomo, R. A. Carbapenems: Past, present, and future. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 4943–4960 (2011).
36. El-Gamal, M. I. *et al.* Recent updates of carbapenem antibiotics. *Eur. J. Med. Chem.* **131**, 185–195 (2017).
37. Fàbrega, A., Madurga, S., Giralt, E. & Vila, J. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb. Biotechnol.* **2**, 40–61 (2009).
38. Cheng, G., Hao, H., Dai, M., Liu, Z. & Yuan, Z. Antibacterial action of quinolones: From target to network. *Eur. J. Med. Chem.* **66**, 555–562 (2013).
39. Chukwudi, C. U. & Good, L. Interaction of the tetracyclines with double-stranded RNAs of random base sequence: new perspectives on the target and mechanism of action. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **69**, 622–630 (2016).
40. Chopra, I. & Roberts, M. Tetracycline Antibiotics : Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance Tetracycline Antibiotics : Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 232–260 (2001).
41. Stepanek, J. J., Lukežič, T., Teichert, I., Petković, H. & Bandow, J. E. Dual mechanism of action of the atypical tetracycline chelocardin. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1864**, 645–654 (2016).
42. Kanoh, S. & Rubin, B. K. Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**, 590–615 (2010).
43. Shimizu, T. & Suzaki, H. Past, present and future of macrolide therapy for chronic

- rhinosinusitis in Japan. *Auris Nasus Larynx* **43**, 131–136 (2016).
44. Gaillard, T., Dormoi, J., Madamet, M. & Pradines, B. Macrolides and associated antibiotics based on similar mechanism of action like lincosamides in malaria. *Malar. J.* **15**, 85 (2016).
45. Gaynor, M. & Mankin, A. S. Macrolide antibiotics: Binding site, mechanism of action, resistance. *Curr. Top. Med. Chem.* **3**, 949–960 (2003).
46. Beringer, M. & Rodnina, M. V. The Ribosomal Peptidyl Transferase. *Mol. Cell* **26**, 311–321 (2007).
47. Toleman, M. A. *et al.* Aminoglycoside Modifying Enzymes. *Sci. York* **13**, 151–171 (2011).
48. Matzov, D., Bashan, A. & Yonath, A. A Bright Future for Antibiotics? *Annu. Rev. Biochem* **86**, 567–83 (2017).
49. Nasiri, M. J. *et al.* New insights in to the intrinsic and acquired drug resistance mechanisms in mycobacteria. *Front. Microbiol.* **8**, (2017).
50. Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O. & Piddock, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 42–51 (2014).
51. Seaworth, B. J. & Griffith, D. E. Therapy of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. *Am. Soc. Microbiol. Press* **79**, 25–32 (2004).
52. Gontier, N. *Reticulate Evolution: Symbiogenesis, Lateral Gene Transfer, Hybridization and Infectious Heredity.* (2015). doi:10.1007/978-3-319-16345-1
53. Gogarten, M. B., Gogarten, J. P. & Oldendzenski, L. *Horizontal Gene Transfer: Genomes in Flux. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (2009). doi:10.1007/978-1-60327-853-9_13
54. Hensel, M. & Schmidt, H. *Horizontal Gene Transfer in the Evolution of Pathogenesis.* (2012). doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2
55. Boncompain, C. A., Suárez, C. A. & Morbidoni, H. R. Staphylococcus aureus nasal carriage in health care workers: First report from a major public hospital in Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* (2017). doi:10.1016/j.ram.2016.12.007
56. Safaei, H. G. *et al.* Distribution of the Strains of Multidrug-resistant, Extensively Drug-resistant, and Pandrug-resistant Pseudomonas aeruginosa Isolates from Burn Patients. *Adv. Biomed. Res.* (2017). doi:10.4103/abr.abr
57. Singh, S. B. Confronting the challenges of discovery of novel antibacterial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24**, 3683–3689 (2014).

58. Hetem, D. J. & Bonten, M. J. M. Clinical relevance of mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Hosp. Infect.* **85**, 249–256 (2013).
59. Paulander, W., Andersson, D. I. & Maisnier-Patin, S. Amplification of the gene for isoleucyl-tRNA synthetase facilitates adaptation to the fitness cost of mupirocin resistance in *Salmonella enterica*. *Genetics* **185**, 305–312 (2010).
60. Sissler, M., González-Serrano, L. E. & Westhof, E. Mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases in human disease. *Mol. Genet. Metab.* **108**, 206–211 (2013).
61. Brown, E. D. & Wright, G. D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature* **529**, (2016).
62. Bikard, D. & Barrangou, R. Using CRISPR-Cas systems as antimicrobials. *Curr. Opin. Microbiol.* **37**, 155–160 (2017).
63. Wang, L., Hu, C. & Shao, L. The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future. *Int. J. Nanomedicine* **12**, 1227–1249 (2017).
64. Baker, S., Pasha, A. & Satish, S. Biogenic nanoparticles bearing antibacterial activity and their synergistic effect with broad spectrum antibiotics: Emerging strategy to combat drug resistant pathogens. *Saudi Pharm. J.* **25**, 44–51 (2017).
65. Roder, C. & Thomson, M. J. Auranofin: Repurposing an Old Drug for a Golden New Age. *Drugs R D* **15**, 13–20 (2015).
66. Thangamani, S. *et al.* Antibacterial activity and mechanism of action of auranofin against multi-drug resistant bacterial pathogens. *Sci. Rep.* **6**, 22571 (2016).
67. Falagas, M. E., Grammatikos, A. P. & Michalopoulos, A. Potential of old-generation antibiotics to address current need for new antibiotics. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **6**, 593–600 (2008).