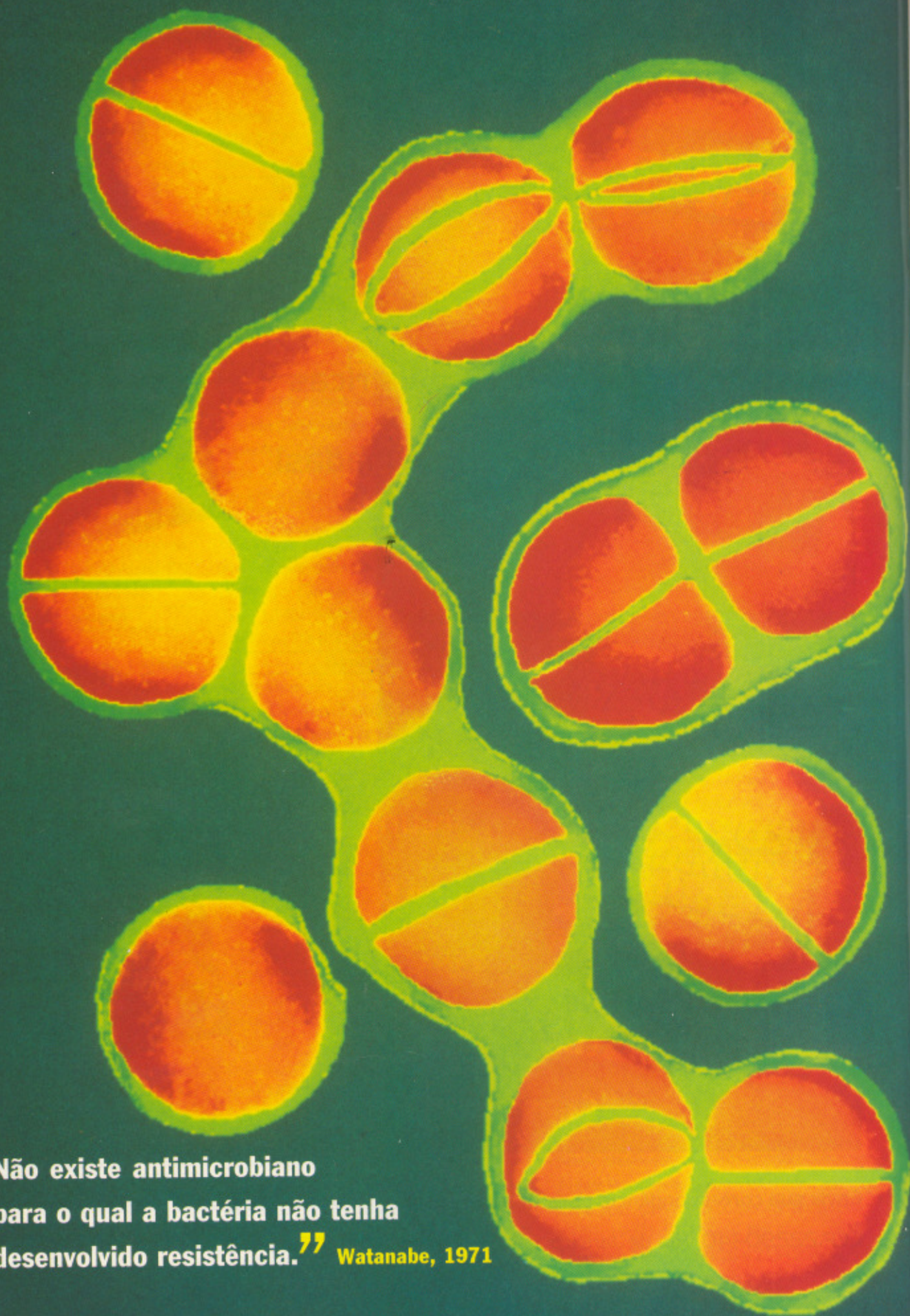


BACTÉRIAS ULTRA-RESISTENTES

“Não existe antimicrobiano para o qual a bactéria não tenha desenvolvido resistência.” Watanabe, 1971



UMA GUERRA QUASE PERDIDA

A descoberta da penicilina e de outras drogas, naturais ou sintéticas, fez a humanidade acreditar que tinha armas definitivas para vencer a 'guerra' contra as bactérias causadoras de doenças. Mas elas vêm reagindo de modo surpreendente. A cada momento surgem bactérias mais resistentes a drogas, algumas quase invulneráveis, tornando-se uma grave ameaça à saúde humana. Para enfrentar as superbactérias, é preciso conhecer a fundo as origens e os mecanismos envolvidos nessa poderosa resistência.

Edmar Chartone de Souza
Departamento de Biologia Geral,
Universidade Federal de Minas Gerais

O APARECIMENTO de resistência a antibióticos e outras drogas antimicrobianas foi, e é provavelmente continuará a ser um dos grandes problemas da medicina, porque é causada pelo que há de mais natural e essencial para a origem e evolução não só das bactérias, mas de todos os seres vivos: "Mutação espontânea e recombinação de genes (reprodução), que criam variabilidade genética sobre a qual atua a seleção natural, dando vantagem aos mais aptos." As drogas atuam como agentes seletivos, favorecendo as raras bactérias resistentes presentes na população de um determinado ambiente.

Entre os fatores que favorecem a seleção e a disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos, estão: o uso abusivo das drogas (em hospitais e consultórios), a venda livre, a exposição das bactérias a outros agentes seletivos (como o mercúrio), os pacientes imunodeprimidos (como os que têm Aids e os transplantados) e o uso de antibióticos em ração animal, além da facilidade e velocidade dos meios de transporte.

A situação é preocupante porque, apesar do esforço científico para descobrir drogas e modificar as já existentes, usando modernas tecnologias, chega-se ao fim do século e do milênio com dificuldades para encontrar novos antibióticos. As penicilinas já estão na sexta geração, as cefalosporinas na quarta e as quinolonas na terceira. Além disso, velhas e conhecidas bactérias causadoras de doenças, supostamente dominadas, estão se tornando resistentes às drogas mais indicadas para combatê-las.

A resistência aparece porque o genoma bacteriano é extremamente dinâmico, embora pequeno e econômico. Em geral, as atividades essenciais de uma bactéria são codificadas por um só cromossomo, e as não-essenciais, como a defesa contra drogas e a transferência gênica, que levam à recombinação, são codificadas por elementos móveis

(plasmídios, transposons e integrons), que não fazem parte do cromossomo. Codificar uma atividade significa conter – e expressar – a informação necessária para que esta se realize. Graças à biologia molecular, essas estruturas e suas atividades são hoje mais bem conhecidas.

Cromossomos bacterianos vêm sendo seqüenciados, com ênfase para os elementos móveis ou mobilizadores. Muitos genes de resistência, principalmente os situados em plasmídios e transposons, foram clonados e seqüenciados, entre eles os que codificam enzimas, como transferases e betalactamases, que alteram ou degradam drogas. Foram encontrados, por exemplo, cerca de 20 mutantes para um só gene que codifica uma certa betalactamase (tais enzimas degradam antibióticos betalactâmicos, como a penicilina). Isso indica que será muito difícil obter substâncias que inibam a atuação dessa enzima. Essa alta variabilidade é observada também em outras enzimas.

Em resumo, sabe-se que uma bactéria torna-se resistente, por mutação ao acaso de genes cromossômicos ou presença de genes extracromossômicos, quando passa a dificultar ou impedir o encontro da droga com seu 'alvo' dentro – ou no envoltório – da própria bactéria. Isso pode ocorrer por alteração, substituição ou superprodução do alvo, por modificação ou inativação da droga por enzimas e por inibição da permeabilidade e fluxo da droga (diversas são 'bombeadas' para fora logo após entrarem na bactéria).

Embora a maneira efetiva de combater a resistência seja evitar o uso excessivo das drogas, para reduzir a seleção de bactérias resistentes, a biologia molecular pode ser muito útil ao permitir a inversão dos métodos comuns de obtenção de antimicrobianos. Nessa inversão, seriam identificados de início os alvos do medicamento ou os fatores envolvidos em sua entrada na célula, e só depois sintetizadas as drogas adequadas.

A RESISTÊNCIA TEM A IDADE DAS DROGAS

A penicilina, descoberta em 1928 pelo médico inglês Alexander Fleming (1881-1955), e a sulfa, obtida em 1935 pelo químico alemão Gerhard Domagk (1895-1964), só passaram a ser largamente usadas no início dos anos 40, em plena Segunda Guerra. Essas drogas geraram um otimismo exagerado: pela primeira vez, a medicina tinha armas tão poderosas ('balas mágicas') para combater agentes infecciosos. Até então, o sistema imunológico defendia sozinho o organismo. Estima-se que, antes da era dos antibióticos, oito em cada 10 casos de infecção grave levavam à morte.

Entretanto, e infelizmente, os primeiros relatos de resistência bacteriana surgiram junto com os antimicrobianos (que incluem antibióticos, sintetizados por seres vivos, e produtos sintéticos ou semi-sintéticos). A bactéria *Staphylococcus aureus*, na época o principal agente de infecção hospitalar da Inglaterra, logo apresentou resistência à penicilina. Outros antibióticos (estreptomicina, cloxacilina, tetraciclina) foram lançados, e de novo ocorreu resistência, em *S. aureus* e outras bactérias. Os geneticistas tentaram explicar a origem do problema, óbvia hoje mas polêmica na época, sugerindo que a droga eliminava as bac-

térias sensíveis e selecionava os raros mutantes naturais resistentes, que formavam nova população (figura 1).

À medida que novas drogas eram usadas, dos anos 40 até os dias atuais, a resistência aumentou em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas – esses dois grandes grupos têm características distintas e foram diferenciados pelo médico dinamarquês Hans Christian Gram (1853-1938). O aumento da resistência tem levado pesquisadores e indústrias à busca de drogas novas e mais ativas, com investimentos crescentes. Mas, como é cada vez mais raro descobrir fungos e bactérias que produzam novos grupos de antibióticos, a prioridade passou a ser a síntese de novas drogas, ou o 'rejuvenescimento' (melhoria) das já existentes, alterando-se as fórmulas originais. Estão em uso hoje, além dos ainda eficazes na formulação original, mais de 100 modernos antimicrobianos: novas gerações de penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, aminoglicosídeos e outros.

O RETORNO DE VELHAS BACTÉRIAS

Apesar de toda a tecnologia, não há motivo para muito otimismo. Às portas do século 21, bactérias tidas como já controladas estão voltando a causar

grandes problemas epidemiológicos e hospitalares (ver 'Bactérias que preocupam'). Por outro lado, alguns patógenos – como *Streptococcus pyogenes*, agente da febre reumática e outros males, e *Treponema pallidum*, agente da sífilis – continuam sensíveis à droga de primeira escolha, a penicilina.

A situação lembra uma corrida: os antimicrobianos partiram na frente das bactérias, sofreram algumas ultrapassagens, voltaram eventualmente à dianteira, mas estão ficando para trás neste fim de século. O mais grave é que, hoje, o desenvolvimento de resistência, por certas bactérias patogênicas, incluindo algumas 'velhas conhecidas', é mais rápido que a capacidade da indústria para produzir novas drogas. Além disso, surgiram novos patógenos oportunistas, em sua maioria multirresistentes, e 'velhos' genes de resistência foram transferidos para novas bactérias.

A IMINÊNCIA DE UM DESASTRE

Entre as 'velhas' bactérias que voltam a se tornar perigosas destaca-se *S. aureus*, um poderoso agente de infecção hospitalar. Algumas linhagens (novas populações) isoladas em hospitais, chamadas de *methicillin* (ou *multiple*) *resistant S. aureus* (MRSA), são imunes a todas as drogas disponíveis, exceto à vancomicina, o que significa risco iminente para a humanidade. A situação é ainda mais crítica porque alguns enterococos, aparentados dessa bactéria, já adquiriram resistência à vancomicina em casos clínicos, e o gene dessa resistência – contido em um plasmídeo R (de resistência) – já foi transferido, em laboratório, para *S. aureus*. Felizmente, o plasmídeo R transferido mostrou-se instável e não se fixou na bactéria receptora.

O Laboratório de Genética de Microorganismos, da Universidade Federal de Minas Gerais, com mais de 20 anos de experiência em mutação e transferência gênica bacteriana, vem pesquisando a possível presença de genes mutantes

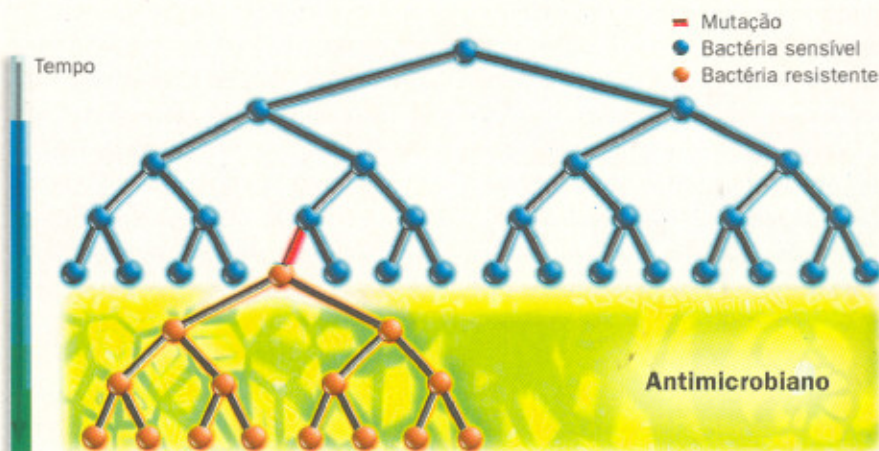


Figura 1. As bactérias sensíveis (em azul), ao se multiplicarem, dão origem, por mutação espontânea (ao acaso), a linhagens resistentes (em laranja), que sobrevivem à droga e formam novas populações

AS BACTÉRIAS QUE PREOCUPAM

Os maiores problemas de resistência a antimicrobianos são constatados em algumas bactérias capazes de causar sérios prejuízos ao organismo humano:

BACTÉRIAS	RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS	DOENÇAS PRINCIPAIS	ONDE E QUEM ELA ATACA
<i>Staphylococcus aureus</i>	Todos, com exceção da vancomicina	Infecção de feridas, sistêmicas, endocardite	Hospitais, comunidade: crianças e adultos
<i>Enterococcus</i>	Vancomicina, aminoglicosídeos, cefalosporinas, eritromicina, penicilinas, tetraciclina	Infecção de feridas, sistêmicas, endocardite	Hospitais
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Aminoglicosídeos, isoniazida, rifamicina, pirazinamida, entabuto	Tuberculose	Comunidade: imunocomprometidos (Aids) crianças e adultos
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Aminoglicosídeos, penicilina, cefalosporinas, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina, trimetoprim	Pneumonia, meningite,	Hospitalar, comunidade: Aids, crianças, idosos e adultos são
<i>Haemophilus influenzae</i>	Cloranfenicol, penicilina, tetraciclina, trimetoprim	Meningite, pneumonia	Comunidade hospitalar
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Penicilina, tetraciclina, espectinomicina	Gonorréia (sexualmente transmitida)	Comunidade
<i>Shigella dysenteriae</i> (e outras enterobactérias)	Ampicilina, tetraciclina, trimetoprim	Infecções intestinais, diarreias e outras	Hospitalar (idosos e outros)
<i>Pseudomonas</i> spp.	Imipenem e quase todos os outros	Infecção de feridas, pneumonia, queimados, sistêmica e trato urinário	Hospitalar (imunocomprometido)
<i>Bacteroides</i> spp.	Tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol, clindamicina, quinolonas, metronidazol	Abscessos internos, infecções de feridas trauma abdominal	Hospitalar, idosos

A lista, incompleta, não inclui diversas bactérias que já apresentam problemas de resistência

(para resistência à vancomicina), sejam espontâneos (sem causa aparente) ou induzidos (por radiação ultravioleta), em linhagens multirresistentes isoladas em hospitais e em uma linhagem padrão sensível a drogas (tese de mestrado de Valéria Pinheiro di Salvo). O objetivo é alertar para o possível surgimento dessa resistência na clínica médica. Já foram detectados, por exemplo, mutantes com cerca de cinco vezes o nível de resistência da bactéria original, confirmando os raros casos relatados no exterior, e também a presença de um halo de inativação da vancomicina, em torno das colônias, maior nos mutantes obtidos que nas bactérias originais.

A presença desse halo significa que a bactéria, ao ser incubada e crescer em um meio de cultura sólido, acrescido de

vancomicina, sintetiza e lança fora da colônia um produto que inativa o antibiótico. O problema é sério: o surgimento na clínica médica de linhagens de *S. aureus* resistentes à vancomicina (e já há relato preliminar desse tipo de resistência) significa um retrocesso à era pré-antibiótica, pelo menos para essa bactéria. Infelizmente, o uso dessa droga nos hospitais é crescente e exagerado.

AS CAUSAS DE TANTA RESISTÊNCIA

Estima-se que as bactérias tenham surgido na Terra há cerca de 3,5 bilhões de anos, em ambiente hostil: temperaturas altíssimas, radiações ultravioleta e cósmicas, tempestades e falta de nutrientes. Elas superaram tudo e evoluíram para ocupar hoje todos os habitats, até

aqueles de condições mais extremas. Podem viver com oxigênio ou sem ele, e algumas adaptam-se às duas situações. Uma (as fotossintetizadoras) usam energia do Sol, como cianobactérias, e outras (as quimiolitotróficas) a retiram de rochas, como tiobacilos. Certas espécies precisam de matéria orgânica já pronta para seu metabolismo, outras são parasitas de outros seres vivos.

Embora tão diversificadas, as bactérias surgiram e evoluíram com sucesso por serem 'pequenas, econômicas e eficientes'. Elas não têm – excetuando os flagelos – as organelas presentes nas células dos eucariotos (que têm núcleo verdadeiro), mas podem realizar as mesmas funções por contarem com as enzimas apropriadas. Sua grande capacidade de adaptação, que provavel-

mente permitiu sua 'eficiente' evolução, está associada à estrutura genômica, que garante a troca rápida de genes dentro de e entre as bactérias, usando para isso elementos não-cromossômicos: plasmídios, transposons, integrons (figura 2) e, às vezes, até bacteriófagos. Estes últimos destroem as bactérias hospedeiras, mas podem carregar e espalhar genes bacterianos.

A causa primária da resistência a drogas é essa capacidade de adaptação ao novo ambiente (hostil), graças à variabilidade genética gerada por mutação e por mecanismos de transferência de genes. Assim, já que é difícil controlar as causas da variabilidade, por serem tão naturais e espontâneas, deve-se pelo menos tentar reduzir ou eliminar as vantagens dos variantes bacterianos nocivos ao homem.

O uso abusivo dos antimicrobianos contribui para aumentar a pressão seletiva dessas drogas, criando ambientes muito favoráveis às bactérias resistentes (figura 3). Nos hospitais, por exemplo, além da alta pressão das drogas, há certo relaxamento na higiene (limpeza do ambiente e das mãos, uso de máscara e luvas). Também favorecem o surgimento da resistência a indicação indiscriminada de drogas por médicos particula-

res, a automedicação de pacientes, o enorme uso desses produtos como aditivo em ração animal (principalmente para aumentar o peso), as prescrições veterinárias e o consumo de alimentos animais e vegetais 'aditivados'.

Há riscos ainda em certos produtos da engenharia genética. A 'tecnologia do DNA recombinante', que permite criar organismos transgênicos, quase sempre usa como vetores (transportadores de genes) pequenos plasmídios. Como em geral estes contêm genes de resistência a drogas, o produto final pode ser contaminado. Finalmente, há alguma pressão seletiva natural de muitos antibióticos, porque vários seres vivos (fungos, bactérias e outros) os produzem e liberam no ambiente. Quase todas as bactérias Gram-negativas, por exemplo, independente de indução, produzem pequenas quantidades de betalactamases, talvez como adaptação à presença no ambiente de betalactâmicos (como a penicilina), que inibem a síntese da parede da célula bacteriana.

Acrescente-se ainda que um só gênero de bactérias do solo, o *Streptomyces*, produz mais de 50% dos antibióticos disponíveis no mercado. Para complicar ainda mais, alguns fatores atuais ajudam a resistência a drogas, como a maior

imunodepressão (decorrente de Aids, quimioterapia anticâncer e maior frequência de transplantes) e até os modernos meios de transporte, que facilitam a disseminação de agentes infecciosos.

MECANISMOS GENÉTICO-BIOQUÍMICOS DE RESISTÊNCIA

A resistência bacteriana a drogas pode ser tratada como cromossômica ou plasmidial, conforme a origem dos genes responsáveis. Transposons e integrons não são considerados um terceiro tipo por não se replicarem de modo autônomo (não são 'replicons'). Os integrons situam-se em geral sobre transposons. Já estes podem estar tanto em plasmídios quanto em cromossomos e transferem-se para outro replicon com alta frequência. Os mecanismos de transferência de genes de uma bactéria para outra são a conjugação, a transdução e a transformação (figura 4).

PRIMEIRA ESTRATÉGIA: RESISTÊNCIA CROMOSSÔMICA

Tudo o que evita ou dificulta o encontro da droga com seu 'alvo' gera maior ou menor resistência. Os alvos são em geral proteínas, quase sempre enzimas importantes para o metabolismo da célula



Cromossomo • DNA de fita dupla, em geral circular, que codifica caracteres essenciais: resistência a drogas e outros. Genes cromossômicos podem ser transferidos para outra bactéria por plasmídios, transposons e bacteriófagos.

Plasmídios R • DNA de fita dupla, quase sempre circular. Codificam caracteres não-essenciais: resistência a drogas e outros. Transferem genes próprios e cromossômicos para outra bactéria, e podem ser transferidos por outros meios.

Transposons • Segmentos de DNA de fita dupla, com extremidades repetidas e invertidas. Codificam caracteres não-essenciais. Não são 'replicons' (não autoduplicam). Altamente móveis, transferem-se e ajudam a transferir genes de plasmídios e cromossomos.

Integrons • Segmentos de DNA de fita dupla. Não são 'replicons' (não autoduplicam). Capturam ou liberam 'cassetes' de genes de resistência, e têm promotor forte para expressá-los.

Bacteriófagos • Vírus integrado ao cromossomo bacteriano. Eventualmente transferem genes bacterianos, como os de resistência a drogas.

Figura 2. Nas bactérias, a troca rápida de genes é garantida por sua estrutura genômica. Além dos elementos acima, fragmentos livres de DNA (de cromossomo, plasmídio, transposon e integron, ou presentes em bacteriófagos) também podem ser transferidos



Figura 3. Condições que favorecem a seleção e disseminação de genes de resistência aos antibacterianos

bacteriana (figura 5). Assim, quanto mais específico e estratégico para a célula for o alvo, mais eficaz será a droga. Sabe-se que a resistência cromossômica surge por mutação espontânea, que pode ser a simples troca de um nucleotídeo (unidade básica do DNA ou RNA). Mas a mutação é muitas vezes letal, tornando a bactéria inviável.

A bactéria pode adquirir, após a mutação, resistência cromossômica pela alteração ou superprodução do alvo, mas também por mudanças na síntese de proteínas ligadas à permeabilidade de seu envoltório, o que altera a entrada (ativa ou passiva) e o acúmulo da droga dentro da célula (ou no espaço periplásmico, entre as membranas externa e interna das bactérias Gram-negativas) e assim impede ou dificulta o encontro droga-alvo.

Como o genoma bacteriano é 'pequeno e econômico', admite-se que uma mutação que altere o alvo ou a permeabilidade ajuda a bactéria na presença da

droga, mas não em sua ausência – porque o gene original provavelmente codificava uma função essencial e agora está avariado. Os alvos das drogas betalactâmicas (penicilina, cefalosporina e outras), por exemplo, estão na membrana celular: são proteínas de ligação das penicilinas (PBP), enzimas que sintetizam a fase final da parede bacteriana. Para chegar a elas, tais drogas devem antes atravessar os canais compostos por porinas, proteínas da espessa membrana externa das bactérias Gram-negativas, e o espaço periplásmico, onde ficam armazenadas as betalactamases (enzimas produzidas por essas bactérias).

Assim, a alteração das porinas cria resistência a esses antibióticos, mas pode dificultar a entrada de outras moléculas, nutrientes essenciais ou não, alterando o metabolismo da bactéria. Já a alteração das PBP, também por mutação cromossômica, leva à resistência mas pode prejudicar a síntese da parede bacteriana (catalisada por elas).

Como a resistência cromossômica depende de mutação espontânea, eventualmente, ela é dirigida quase sempre a uma só droga e os genes são transferidos com frequência relativamente baixa. Por isso, seu impacto na clínica médica é menor que o da resistência plasmidial. No entanto, além do surgimento de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente por mutação de genes cromossômicos (há hoje 1 bilhão de infectados, e a tuberculose mata 3 milhões/ano), foram descobertos há pouco novos processos de resistência, como a 'ativação de genes crípticos' (escondidos), que preocupam e atestam o grande potencial de variabilidade genética do genoma bacteriano.

Descobriu-se ainda que o 'efluxo' – o 'bombeamento' de drogas para fora da célula – é um mecanismo de resistência muito mais comum do que se pensava. Codificado por genes situados em cromossomos e plasmídios, o efluxo ocorre em diversas bactérias e com várias drogas (antes, era conhecido apenas para tetraciclina). Células cancerosas de mamíferos podem, após sucessivos tratamentos, usar processo parecido para impedir o acúmulo de produto quimioterápico em seu interior, tornando o tratamento ineficaz.

A ativação de genes crípticos se dá pela mutação do promotor (segmento de DNA ao qual a RNA polimerase se liga para transcrever um gene), ou pela integração de segmentos de inserção (IS) adiante do gene de resistência. Os IS são segmentos de DNA, menores que os transposons, mas com a mesma capacidade de autotransferência para outros replicons. O sistema é econômico, pois só funciona na presença do indutor (a droga).

Exemplos de genes crípticos, que atestam o poder de defesa (e ataque) das bactérias, são o *mar* e o *sox-RS*. Os produtos do primeiro inibem, na presença de antimicrobianos, a ação dos genes que codificam as porinas em bactérias Gram-negativas, gerando resistên-

cia simultânea a várias drogas (tetraciclina, cloranfenicol, salicilato e outras). Esse tipo de resistência cruzada parece ser muito comum em algumas bactérias, como *Pseudomonas*. O segundo gera resistência ao superóxido (substância que participa do sistema imunológico). Como o mar, o sox-RS reduz a expressão das porinas e torna as bactérias simultaneamente resistentes a drogas e ao sistema imune superóxido humano.

Não se pode esquecer os estranhos 'mutantes dependentes de drogas', embora sua importância clínica ainda não tenha sido avaliada. Nesses casos, a presença da droga conserta um erro, provocado geralmente por uma mutação da proteína-alvo. Sem a droga, a bactéria morre. Tais mutantes são encontrados com frequência em *Escherichia coli* (bactéria intestinal comum) exposta a drogas como rifamicinas e estreptomicinas.

Finalmente, deve-se acrescentar, por sua relevância, que bactérias sensíveis podem receber, 'de graça', genes cromossômicos mutantes de bactérias já resistentes, através dos processos de transferência, tornando-se também imunes a uma ou mais drogas.

SEGUNDA ESTRATÉGIA: RESISTÊNCIA PLASMIDIAL

Em 1959, no Japão, foi descoberta uma linhagem de *Shigella* (causadora de infecção intestinal) resistente a estreptomicina, cloranfenicol, tetraciclina e sulfa. Descobriu-se depois que resistia também ao mercúrio inorgânico, e que podia transferir essa resistência múltipla, em alta frequência, para *E. coli*, quando cultivadas juntas, tanto em tubo de ensaio (*in vitro*) quanto no intestino de animais de laboratório (*in vivo*).

Tais achados fugiam aos padrões até então observados na resistência cro-

mossômica (em geral a uma só droga e transferível em baixa frequência). Com base no que já se sabia sobre o plasmídeo F (de fertilidade), da linhagem K12 de *E. coli*, que codificava sua própria transferência, os japoneses propuseram que os quatro genes de resistência da *Shigella* situavam-se em um só plasmídeo R, a que chamaram R100 (figura 6), por serem transferidos em bloco para a *E. coli*.

É interessante observar que desde o achado desse primeiro plasmídeo, que confere resistência a quatro drogas e ao mercúrio, sabe-se que outras fontes de pressão (além dos antimicrobianos) podem selecionar genes de resistência. Em nosso laboratório (tese de mestrado de Yeda Xênia Sant'Ana), observou-se que 26, entre 30 amostras de *Salmonella typhimurium* isoladas de doentes, em Belo Horizonte, eram imunes ao mercúrio inorgânico e a vários antimicrobia-

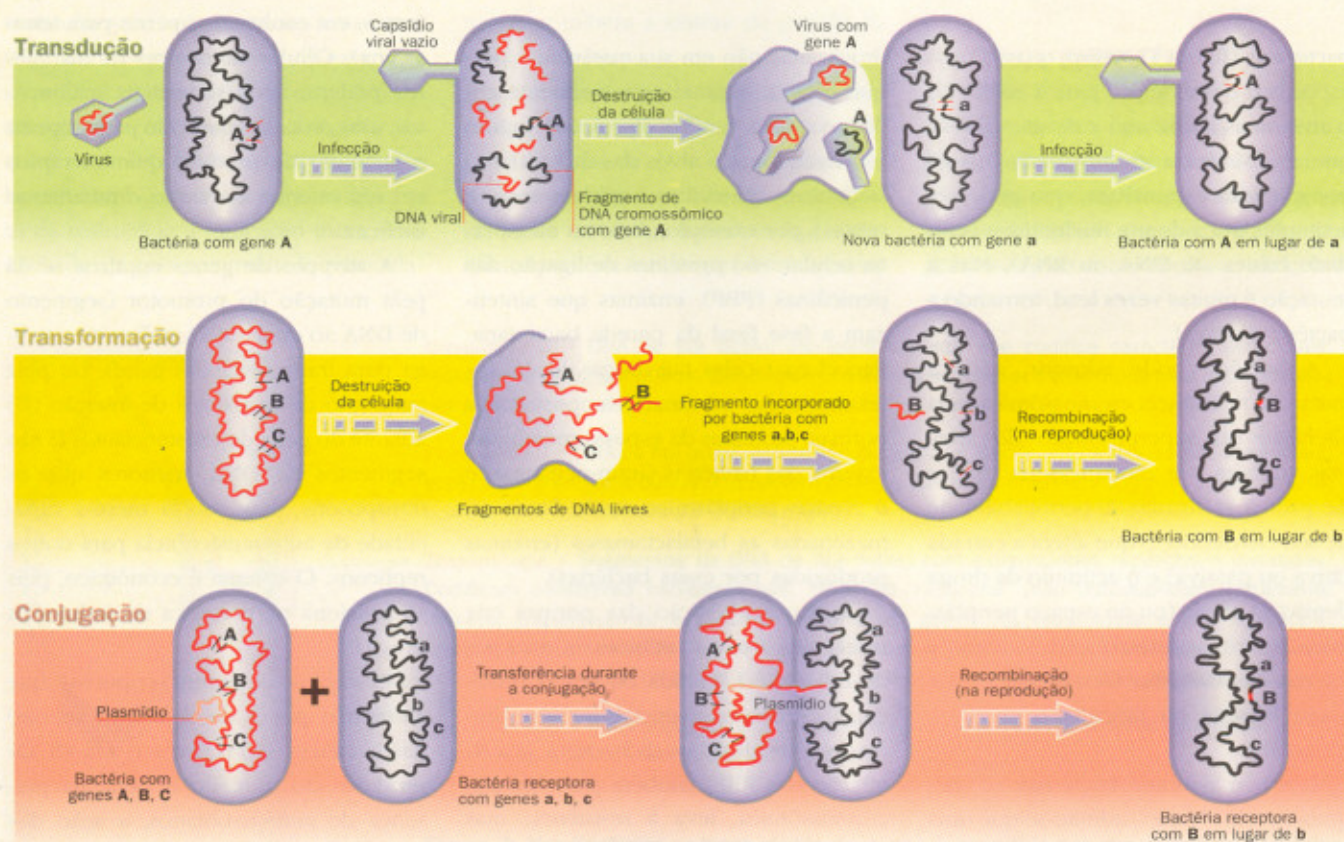


Figura 4. Mecanismos de transferência de genes de resistência (A, B) e outros, situados no cromossomo, de uma bactéria para outra

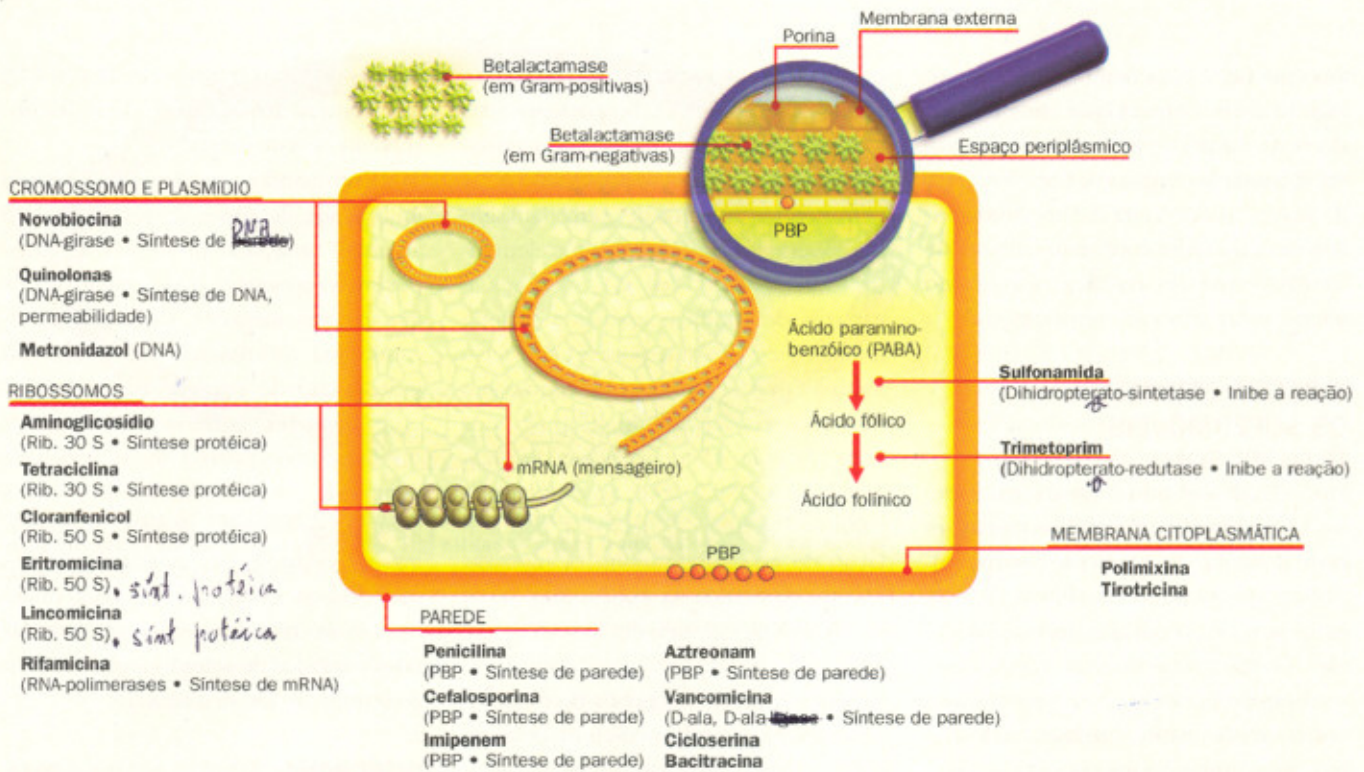


Figura 5. Alvos da ação de algumas drogas na célula bacteriana. Nos parênteses estão os alvos específicos e as funções inibidas pelas drogas

nos. Portanto, o problema da resistência deve ser visto em um contexto ecológico mais abrangente. Nesse aspecto, são importantes medidas como a do governo brasileiro, que há pouco retirou do mercado cerca de 100 produtos que continham mercúrio.

A eficiência da resistência plasmidial e seu possível impacto na saúde humana ficaram evidentes quando se detectou que, além de ser em geral múltipla e altamente transferível, ela pode ser 'promíscua', ou seja, passar para bactérias não-aparentadas geneticamente. O quadro complicou-se ainda mais ao se descobrir que as ações promovidas por genes de resistência plasmidial são muito mais efetivas que as da resistência cromossômica. Isso acontece porque a resistência plasmidial baseia-se, quase sempre, na síntese de enzimas ligadas à decomposição da droga (betalactamases, que degradam betalactâmicos); à sua modificação (transferases, que alteram aminoglicosídeos e outros); ao efluxo (proteína Tet, que transporta para fora a

tetraciclina); à substituição de enzimas 'cromossômicas' que não se ligam às drogas (por dihidropteroato-sintetase, que se liga às sulfas, e dihidrofolato-reductase, que se liga ao trimetoprim); à proteção do alvo (metilase, que impede macrolídeos de atingir seu alvo nos ribossomos); e à redução química (mercúrio-reductase, que atua sobre mercúrio inorgânico).

A resistência plasmidial ao mercúrio inorgânico se dá por sua absorção do ambiente (proteína de transporte), seguida de redução (por ação da enzima mercúrio-reductase) a Hg^0 (mercúrio metálico) e volatilização, pois se torna inviável em meio líquido. Com base nisso, e buscando um processo biotecnológico de despoluição de despejos industriais, nosso laboratório (tese de mestrado de Andréa M. A. Nascimento), em integração com o laboratório de biologia molecular da Universidade de Brasília, clonou em 1985 os genes de resistência ao mercúrio da linhagem BH100 da *E. coli* – primeira clonagem gênica rea-

lizada na UFMG.

Além de codificarem resistência quase sempre múltipla e transferível, os plasmídios R têm outras características interessantes. Variam de tamanho e número, e diversos tipos podem coexistir em uma mesma bactéria, desde que sejam compatíveis. São conjugativos (quando codificam sua própria transferência) ou não-conjugativos, e estes são mobilizados pelos primeiros. Podem ainda estar ou não-integrados no cromossomo, sendo capazes, no primeiro caso, de transferir genes cromossômicos. Muitos são 'promíscuos', facilitando a disseminação de genes de resistência para espécies não-aparentadas. Alguns aumentam a frequência de mutação para resistência de genes cromossômicos (caso da *E. coli* BH 100, de nosso laboratório), em relação à estreptomicina (tese de mestrado de Márcia O. de Paula e Carlos Alberto B. Fernandes).

Os plasmídios R também podem codificar, além de resistência, outras características, entre elas produção de bac-

teriocina (letal para outra bactéria) e patogenicidade (capacidade de produzir doença). Uma linhagem de *S. typhimurium* estudada em nosso laboratório (tese de doutorado de Yeda X. Sant'Ana) contém um plasmídeo conjugativo (cerca de 95 Kb) capaz de codificar ao mesmo tempo essas três características.

TERCEIRA ESTRATÉGIA: OS SUPERMÓVEIS TRANSPOSONS

Em 1974, descobriu-se que o dinamismo e a eficiência dos plasmídios contavam com a ajuda de elementos surpreendentes: os 'transposons' (figura 7). Segmentos de DNA com grande mobilidade, eles codificam a enzima transposase (responsável por sua transferência para outros 'replicons') e a resistência a drogas, entre outras características. Os transposons podem gerar variações genéticas sem exigir a replicação exata de extensos segmentos de DNA (como nos processos de conjugação, transformação e transdução). Eles são 'promís-

cuos': criam as variações invadindo diversos sítios do DNA hospedeiro, mas às vezes exageram, produzindo mutações letais.

Antes dos transposons, já haviam sido descobertos em bactérias outros elementos transponíveis (os IS), menores e capazes de codificar apenas a própria transferência (via transposase). É preciso lembrar que a presença de elementos transponíveis havia sido proposta nos anos 40 pela norte-americana Barbara McClintock (1902-1992), ao estudar mecanismos genéticos ligados à pigmentação de espigas de milho. A hipótese não foi entendida na época, mas deu a ela o prêmio Nobel de Medicina em 1983.

Grande parte dos genes de resistência considerados plasmidiais ou cromossômicos estão de fato sobre transposons e apresentam as propriedades destes: disseminação rápida dentro de célula ou entre célula. A resistência ao mercúrio codificada pelo primeiro plasmídeo descoberto (R100), por exemplo,

situa-se sobre o transposon 21 (Tn 21), que contém um integron, como foi observado recentemente.

Confirmando e justificando a grande mobilidade de genes de resistência em algumas situações, descobriu-se transposons compostos, que contêm vários transposons menores, cada um codificando sua resistência e mantendo sua individualidade para se transpor para outro replicon da mesma ou de outra célula (se conjugativo). São transposons dentro de transposons, ou, em outras palavras, problemas dentro de problemas para a medicina. Talvez alguns dos transposons componentes contenham outros ainda menores, ampliando as possibilidades de seleção, emergência e disseminação de resistência.

INTEGRONS: A MAIS NOVA ARMA

Esperava-se que, com os transposons compostos, as bactérias já tivessem revelado todo o seu potencial de variabilidade genética, mas agora foram descobertos os 'integrons', segmentos de DNA de fita dupla que capturam 'cassetes' de genes de resistência do citoplasma celular e têm promotores fortes para expressá-los. Os integrons codificam uma recombinase responsável por essa captura. A mesma enzima pode, além de capturar genes de resistência, liberá-los. Os integrons mais bem estudados situam-se sobre transposons e precisam, como estes, integrar-se a um replicon para se dividir e se disseminar.

AFINAL, COMO SALVAR OS ANTIMICROBIANOS?

Não existe uma 'receita' simples para resolver o problema da resistência bacteriana a drogas, em especial porque ele se origina no que há de mais essencial no mundo vivo: mutação espontânea, transferência e recombinação de genes, que geram variabilidade genética, sobre a qual atuou e atua o meio ambiente e outros processos evolutivos, criando espécies que habitaram ou habitam a Terra.

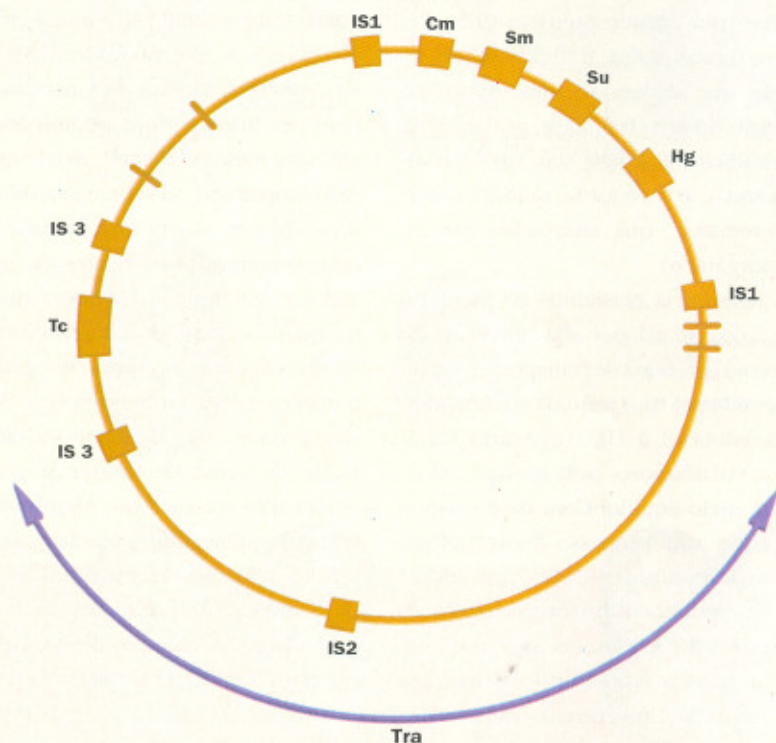


Figura 6. Mapa (simplificado) do R100, primeiro plasmídeo de resistência a drogas descrito, com genes de transferência (Tra), de resistência (Cm, Sm, Su, Hg etc.) e de outras funções plasmidiais

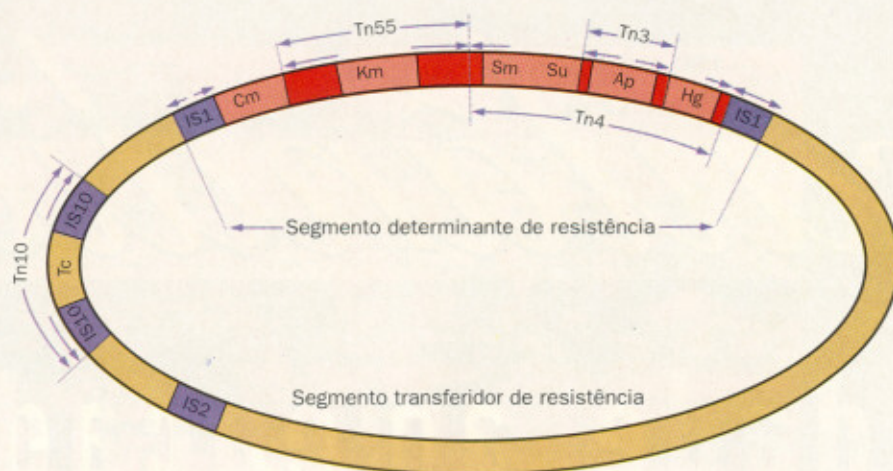


Figura 7. Mapa de plasmídeo R conjugativo: o 'segmento determinante de resistência' contém genes de resistência (Sm, Su, Hg) situados sobre transposons (Tn) compostos, que mantêm a capacidade de transpor em conjunto ou isoladamente

Por isso, são propostas aqui várias medidas, com base em boletins da Organização Mundial de Saúde (OMS), na literatura científica e no conhecimento pessoal. Tais ações não visam resolver, mas remediar, o problema da resistência bacteriana a drogas, e formam dois grupos: 'medidas tecnológicas', que dependem de pesquisas, e 'medidas ecológicas', que reduzem a pressão dos antimicrobianos no ambiente.

MEDIDAS TECNOLÓGICAS

- Estudar a fundo o problema, admitindo que os hospedeiros são geneticamente diferentes quanto ao metabolismo das drogas e quanto à resposta aos agentes infecciosos.
- Continuar a busca de novos antimicrobianos a partir de: (a) microrganismos (embora os resultados atuais com fungos e bactérias sejam desanimadores); (b) produtos animais e vegetais; (c) identificação dos alvos e dos inibidores das drogas (usando técnicas de biologia molecular); (d) detoxificação (desarme) de produtos de comprovada ação antibacteriana, mas tóxica para o hospedeiro (como a bacteriocina). Nessa busca, deve-se estar consciente de que, da detecção de nova droga até a chegada ao mercado têm sido gastos em média 10 anos (a um custo estimado entre US\$ 200 e

300 milhões) e que as bactérias têm respondido com resistência em período muito mais curto.

- Modificar ou 'rejuvenescer' drogas já existentes e protegê-las contra enzimas inativadoras (o ácido clavulânico, por exemplo, liga-se à penicilinase e evita que ela desative a penicilina), levando em conta o grande número de mutantes para cada enzima.
- Inibir a transferência gênica por conjugação (alguns dados preliminares obtidos em nosso laboratório são animadores).
- Obter vacinas, por técnicas convencionais e moleculares, para reduzir o uso dos antimicrobianos.

MEDIDAS ECOLÓGICAS

- Admitir que a resistência bacteriana a drogas é um sério problema de saúde pública, que veio para ficar, por ser baseada na variabilidade genética natural, causada por mutação e recombinação (reprodução), seguida de seleção dos mais adaptados ao ambiente. Isso está de acordo com a regra básica da genética: $F = G + A$, onde F é fenótipo (resistência), G é genótipo (genes do indivíduo) e A é meio ambiente.
- Adotar ações que reduzam o uso dos antimicrobianos em hospitais e outros locais, para evitar seleção de li-

nhagens resistentes e transferência dos genes responsáveis para bactérias (normais e patogênicas), no organismo humano e em outros ambientes. Entre essas ações estão: (a) só usá-los se indispensável, após cuidadoso diagnóstico; (b) realizar antibiogramas (para definir a ação das drogas); (c) criar programas de vigilância hospitalar e comunitária, com rotatividade de drogas; (d) estar alerta (com antibiogramas) para estoques de genes de resistência das microbiotas naturais (aeróbias e anaeróbias); (e) usar vacinas que aumentem as defesas do organismo e reduzam a necessidade de drogas.

Conclui-se, diante do exposto, que para proteger os antimicrobianos da resistência, a longo prazo, é preciso reconhecer o poder genômico das bactérias (seu 'poder de fogo') e adotar estratégia compatível, ou seja, diminuir ao máximo a pressão seletiva, que sempre favorece as bactérias resistentes. Como se percebe, a guerra não está perdida, mas resultados positivos só serão obtidos com uma política de saúde pública bem definida, com a conscientização dos profissionais da área e com a colaboração da comunidade, que para isso deve estar bem informada.

Sugestões para leitura

- AMÁBIL-CUEVAS, C.F., CÁRDENAS-GARCIA, M., & LUDGAR, M. 'Antibiotic resistance', in *American Scientist*, vol. 83 (pp. 321-329), 1995.
- COSTA, S.O.P. 'Aspectos genéticos e clínicos da resistência a drogas', in Azevedo, J.L. (coord.), *Genética de microrganismos em biotecnologia e engenharia genética*, Editora Fealq, Piracicaba, 1985.
- O'BRIEN, T.F. 'The global epidemic nature of antimicrobial resistance and the need to monitor and manage it locally', in *Clinical Infectious Diseases*, vol 24, s. 1, (pp. 2-8), 1997.
- SALYERS, A.A. *Antibiotic resistance transfer in the mammalian intestinal tract: implications for human health, food safety and biotechnology*, Springer Verlag, New York, 1995.
- SPRATT, B.G. 'Resistance to antibiotics mediated by target alterations', in *Science*, vol. 264 (pp. 388-393), 1994.