DÉBORA DOS SANTOS COSTA

**Estudo da frequência do fenótipo mutador para resistência aos antibióticos
beta-lactâmicos em linhagens de *E. coli* patogênicas**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2012

DÉBORA DOS SANTOS COSTA

**Estudo da frequência do fenótipo mutador para resistência aos antibióticos
beta-lactâmicos em linhagens de *E. coli* patogênicas**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cassia
Café Ferreira

Versão original

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Costa, Débora dos Santos.

Estudo da frequência do fenótipo mutador para resistência aos antibióticos beta-lactâmicos em linhagens de *E.coli* patogênicas / Débora dos Santos Costa. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Rita de Cássia Café Ferreira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Genética, resistência e fisiologia bacteriana.

Versão do título para o inglês: Study of the mutator phenotype frequency to beta-lactam resistance in pathogenic *E. coli* strains.

1. Fenótipo mutador 2. Beta-lactâmicos 3. Genes *mut* 4. *Escherichia coli* I. Ferreira, Profa. Dra. Rita de Cassia Café II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0199/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Débora dos Santos Costa.

Título da Dissertação: Estudo da frequência do fenótipo mutador para resistência
aos antibióticos beta-lactâmicos em linhagens de *E.coli*
patogênicas.

Orientador(a): Profa. Dra. Rita de Cássia Café Ferreira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 395/10 referente ao projeto intitulado: *“Estudo da frequência do fenótipo mutador para resistência aos antibióticos Beta-lactâmicos em linhagens de E.coli patogênicas”* sob a responsabilidade de **Débora dos Santos Costa**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 21 de junho de 2010.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAULO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, sobre tudo e todas as coisas. “Se Deus é por nós, quem será contra nós? Aquele que nem mesmo seu Filho poupou, antes o entregou por todos nós, como não nos dará também com ele todas as coisas?” Rm 8:31-32

À minha mãe Valquiria, que de todas as formas possíveis sempre me ajudou e incentivou a estudar, crescer, amadurecer, confiar no Pai e nunca desistir dos meus objetivos diante das adversidades.

À minha orientadora Prof^a Dra Rita de Cassia Café Ferreira, por abrir as portas do mundo acadêmico, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, por me acompanhar nesta fase da minha vida profissional, que com certeza será muito importante para alcançar meus objetivos.

À minha família pelo carinho, compreensão nos momentos difíceis e de stress, pelo sempre presente apoio e força.

A minha prima e madrinha Ana Lucia, pela preocupação, pelo carinho em todas as horas, por me proporcionar momentos de lazer e descanso, pelas orações de direcionamento.

A minha irmã Denise, por me escutar, apoiar e por ser responsável pela concepção da criança mais linda de todas: minha sobrinha Letícia!

Ao Prof^o Dr. Luis Carlos, por sempre estar disposto a ajudar e aconselhar, pela intensa orientação, por todas as sugestões, críticas e ensinamentos, sempre com a intenção de melhorar a qualidade de trabalho e promover o meu crescimento profissional.

Ao Prof^o Sergio Olavo, pelo intenso interesse no tema, por todos os conselhos, sugestões, conversas, críticas e revisões. Pelo apoio que deu a mim e a todos os alunos que vieram antes de mim. Sinceramente agradeço a sua presença no laboratório e o admiro intensamente a sua dedicação em ensinar.

Ao Prof^o Rodrigo Galhardo, pelas sugestões e críticas construtivas que ajudaram a direcionar o foco do trabalho, pela paciência, dedicação e resolução de dúvidas.

Ao meu amigo Roberto Nepomuceno, que desde o começo se mostrou imensamente prestativo, dedicado e amigo para todas as horas. Por me acompanhar e compartilhar de momentos bons e difíceis, sempre estar presente quando precisei. Agradeço sua paciência e amizade comigo, todos os ensinamentos, sugestões e admiro sua intensa dedicação em busca de seus objetivos.

Ao meu amigo Marco Scandurra, que foi quem me ensinou a microbiologia clínica e fez eu me apaixonar por microbiologia, me incentivando a buscar a formação nessa área. Agradeço por todos ensinamentos, conversas, pela imensa paciência e por sempre me apoiar.

Ao sempre querido Vagner, por me apoiar, pelo violão para ajudar nos momentos de tensão com a tese e por acreditar em mim sempre. Agradeço pela imensa compreensão, preocupação e por todos os bons momentos.

A todos os colegas do laboratório, pelas conversas, orientações, auxílio em bancada, sugestões, auxílio em aspectos fundamentais para realização de experimentos, auxílio na elaboração de protocolos.

A Loren Cristina, pelas conversas, por sempre me escutar, pelo auxílio em bancada e por sempre ajudar a todos do laboratório com boa vontade.

A Priscila Gomez, pela ajuda em bancada e elucidação de protocolos, pelas conversas e conselhos profissionais, por compartilhar os momentos de tensão e descontração.

As colegas que se tornaram amigas, Carolina, Aline e Daniela, por compartilhar e proporcionar momentos de descontração, pela ajuda acadêmica, conselhos, ajuda nas disciplinas. Agradeço por tornarem todo esse período de estudo e de pesquisa mais agradável.

Aos colegas, Francisco Cariri, Ewerton, Jaime e Raíza, pela ajuda com acadêmica, auxílio na bancada e sugestões.

À todos os meus amigos que passaram e permanecem na minha vida e no meu caminho, pelo carinho, amor fraterno, incentivo e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e da Pós-Graduação, Gisele, Ana, Naíde, Alice e Bruno, pela ajuda e colaboração em todo meu período de mestrado.

Aos funcionários do serviço de Biblioteca do ICB, em especial a Marcia e Mônica, pelo trabalho de forma eficiente e gentil, por me fornecer ajuda e orientações necessárias.

Ao apoio financeiro da CAPES, CNPq e FAPESP, pelo auxílio a pesquisa, possibilitando a realização desse trabalho.

“ Tudo posso Naquele que me fortalece” Fp. 4:13

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for.
O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem
qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”
Fernando Pessoa

RESUMO

SANTOS, D. C. **Estudo da frequência do fenótipo mutador para resistência aos antibióticos beta-lactâmicos em linhagens de *E. coli* patogênicas**. 2012. 75 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Atualmente a alta incidência de isolados multirresistentes a antibióticos utilizados na clínica tem-se tornado alarmante. Estudos recentes demonstraram que um dos motivos que contribuem para o aumento da resistência a antibióticos em bactérias é a ocorrência de cepas que apresentam o fenótipo mutador. Deficiências nos genes do complexo *mut*, que incluem os sistemas de reparo dependente de metilação (MMR do inglês *methyl-directed mismatch repair*), e o sistema de reparo oxidativo (GO) podem gerar linhagens com um fenótipo mutador, que, por sua vez, levam ao aumento das taxas mutacionais espontâneas. Isolados clínicos com fenótipo mutador foram descritos em amostras de *Escherichia coli* patogênica empregando-se a resistência para antibióticos como rifampicina, cloranfenicol e quinolonas mas não há registros de estudos envolvendo o possível impacto do fenótipo mutador sobre a frequência de mutações espontâneas que levem à resistência aos antibióticos beta-lactâmicos. No presente trabalho estudamos a ocorrência do fenótipo mutador frente à resistência aos antibióticos beta-lactâmicos de amplo uso clínico em cepas de *E. coli* patogênicas de origem humana, incluindo 48 amostras de *E. coli* uropatogênica (UPEC) e 5 amostras de *E. coli* associadas a infecções entéricas. Foram utilizadas como controles positivos para o fenótipo mutador linhagens de *E. coli* K12 deficientes nos genes *mutY* ou *mutS*. Testes qualitativos revelaram a ocorrência de 6 amostras de UPEC e 2 amostras de EHEC com fenótipo mutador para cefalotina, ceftazidima e rifampicina. Entre as amostras estudadas, 3 linhagens de UPEC (amostras 29, 32 e 47) e 1 linhagem de EHEC (amostra 80) apresentaram fenótipo mutador frente à cefalotina e à ceftazidima confirmado em testes quantitativos com valores de mutação espontânea variando entre $0,68 \times 10^{-4}$ e $0,8 \times 10^{-6}$. Os resultados baseados em amplificação por PCR revelaram ausência de alterações estruturais em 3 genes do complexo *mut* (*mutS*, *mutY* e *mutL*) nos quatro isolados que apresentaram fenótipo mutador. O trabalho também envolveu a determinação dos níveis de resistência em clones derivados das 4 linhagens mutadoras após exposição à cefalotina ou à ceftazidima. As colônias obtidas também foram analisadas para a determinação da natureza de mutação que resultou na resistência aos antibióticos beta-lactâmicos. Os resultados obtidos apontam para aumento nos níveis de expressão de uma beta-lactamase para os derivados resistentes da amostra 32, possíveis alterações de permeabilidade do envoltório celular, e, indiretamente, modificação dos alvos celulares para esses antibióticos. Esses resultados revelam a elevada ocorrência do fenótipo mutador entre amostras de UPEC oriundas da clínica e destacam a importância do fenômeno sobre a ocorrência de resistência aos beta-lactâmicos de uso clínico.

Palavras-chave: Fenótipo mutador. Beta-lactâmicos. Genes *mut*. *Escherichia coli*.

ABSTRACT

SANTOS, D. C. **Study of the mutator phenotype frequency to beta-lactam resistance in pathogenic *E. coli* strains.** 2012. 75 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Currently the high incidence of isolates with multiple resistance to antibiotics used in the clinic is alarming. Recent studies show that one of the reasons that may contribute to increased resistance in bacteria is the occurrence of strains with the mutator phenotype. Deficiencies in *mut* genes complex including methylation-dependent repair system (MMR from English *methyl-directed mismatch repair*) and oxidative repair system (GO) can generate strains with a mutator phenotype, which in turn leads to increasing spontaneous mutation rates. Clinical isolates with the mutator phenotype were reported among pathogenic *Escherichia coli* with antibiotics such as rifampicin, chloramphenicol and quinolones. Nonetheless, there are no studies describing the involvement of the possible impact of the mutator phenotype on the frequency of spontaneous mutations leading to resistance to beta-lactam antibiotics. In this work we studied the occurrence of the mutator phenotype leading to resistance to beta-lactam antibiotics use in clinics. For this purpose we tested a set of pathogenic *E. coli* strains of human origin, including 48 strains of uropathogenic *E. coli* (UPEC) and 5 strains of *E. coli* associated with enteric infections. As positive controls for the mutator phenotype we used *E. coli* K12 strains deficient in *mutY* or *mutS* genes. Qualitative tests revealed 6 UPEC samples and 2 EHEC strains with mutator phenotype for cephalothin, ceftazidime and rifampicin. Three UPEC strains (samples 29, 32 and 47) and one EHEC strain (sample 80) showed spontaneous mutation frequencies ranging from 0.68×10^{-4} to 0.8×10^{-6} to cephalothin and ceftazidime. The results based on PCR amplification revealed no structural changes in the *mut* gene complex (*mutS*, *mutY* and *mutL*) in the four mutator strains. The work also involved determination of the resistance level to cephalothin or ceftazidime of clones derived from the mutator strains. The colonies obtained were also analyzed to determine the nature of mutation leading to beta-lactam resistance. The results indicated increased expression levels of a beta-lactamase in derivatives of the 32 strain, possible reduction in cell envelope permeability and, indirectly, modification of cellular targets for these antibiotics. These results showed the high occurrence of mutator phenotype among UPEC strains derived from clinical settings and highlight the importance of the phenomenon on the occurrence of resistance to beta-lactam antibiotics in clinical use.

Keywords: Mutator phenotype. Beta-lactam. Genes *mut*. *Escherichia coli*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismos de Resistência em Bactérias Gram-Negativas.....	26
Figura 2- Sistema MMR.....	31
Figura 3 - Sistema GO e as proteínas Fpg, MutY e MutT.....	33
Figura 4 – Fenótipo mutador.....	46
Figura 5 - Detecção do fenótipo mutador.....	47
Figura 6 - Determinação do CIM utilizando tiras de E-test	49
Figura 7 - Aumento da frequência de mutação espontânea para resistência ao antibiótico rifampicina em relação ao controle negativo MG1655.....	51
Figura 8 - Aumento relativo da frequência de mutação espontânea para resistência ao antibiótico cefalotina nas linhagens de <i>E. coli</i> 29 e 80 em relação à linhagem MG1655.	52
Figura 9 - Aumento relativo da frequência de mutação espontânea para resistência ao antibiótico ceftazidima nas linhagens de <i>E. coli</i> 32 e 47 em relação à linhagem MG1655.	53
Figura 10 - PCR para genes <i>mutY</i> e <i>mutS</i>.....	54
Figura 11 - Faixas de CIM encontrada nas colônias satélites derivadas da linhagem <i>mutY</i> de <i>E. coli</i> K12 após seleção com cefalotina. Valor de CIM da linhagem original: 8 µg.....	55
Figura 12 - Faixas de CIM encontrada nas colônias satélites derivadas da linhagem <i>mutS</i> de <i>E. coli</i> K12 após seleção com cefalotina. Valor de CIM da linhagem original: 1,5 µg	56
Figura 13 - Faixas de CIM encontrada nas colônias satélites derivadas da linhagem <i>E. coli</i> 47 após seleção com ceftazidima. Valor de CIM da linhagem original: 1 µg...57	57
Figura 14 -Faixas de CIM encontrada nas colônias satélites derivadas da linhagem <i>E. coli</i> 32 após seleção com ceftazidima. Valor de CIM da linhagem original: 12 µg.....	58
Figura 15 - Faixas de CIM encontrada nas colônias satélites derivadas da linhagem <i>E. coli</i> 29 após seleção com cefalotina. Valor de CIM da linhagem original: 2 µg.....	59
Figura 16 - Faixa de CIM encontrada nas colônias satélites derivadas da linhagem 80 de <i>E. coli</i> O157:H7 após seleção com cefalotina. Valor de CIM da linhagem original: 4 µg.....	60

Figura 17 - Teste de aproximação para ESB	63
--	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genes do complexo <i>mut</i>	29
Tabela 2 - Bactérias utilizadas para triagem inicial deste trabalho.....	38
Tabela 3 - Linhagens selecionados para determinação da frequência de mutação e concentrações de antibiótico utilizadas.....	40
Tabela 4 - Oligonucleotídeos utilizados no PCR.....	41
Tabela 5 - Antibióticos empregados no isolamento de colônias resistentes a beta-lactâmicos.....	42
Tabela 6 - Colônias utilizadas para determinação da natureza da mutação.....	44
Tabela 7 - Padrão de resistência aos antibióticos para os quais foram detectados o fenótipo mutador.....	48
Tabela 8 - Valores de CIM (expressos em µg / ml) para o antibiótico rifampicina, cefalotina e ceftazidima por meio de E-test.....	49
Tabela 9 - Cálculo da frequência de mutação espontânea para rifampicina.....	50
Tabela 10 - Frequência de mutação espontânea para cefalotina para as linhagens 29 e 80 de <i>E. coli</i>	52
Tabela 11 - Cálculo da frequência de mutação espontânea para ceftazidima para os isolados 32 e 47.....	53
Tabela 12 - Colônias satélites dos halos de inibição da cefalotina ou ceftazidima, e sua respectivas faixas de CIM.	61
Tabela 13 - Detecção de produção de beta-lactamases em isolados resistentes derivados de linhagens mutadoras de <i>E. coli</i>	63
Tabela 14 - Concentração inibitória mínima para Cristal violeta	65
Tabela 15 - Detecção de possíveis alterações na permeabilidade do envoltório celular de isolados de <i>E. coli</i> por medição da captação do CV.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMC- Amoxicilina/Ac. Clavulânico
AMI- Amicacina
AMP- Ampicilina
ATM- Aztreonam
BER- Reparo por excisão de bases
CAZ- Ceftazidima
CIM- Concentração Inibitória Mínima
CIP- Ciprofloxacina
CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute
CFO- Cefoxitina
CFL- Cefalotina
CLO- Cloranfenicol
CPM- Cefepime
CRO-Ceftriaxona
CTX- Cefotaxima
C.V- Cristal Violeta
DEAC- *Escherichia coli* dufusamente aderente
D.O- Densidade óptica
EAEC- *Escherichia coli* enteroagregativa
EDTA- ácido etilenodiamino tetra acético
EHEC- *Escherichia coli* enterohemorrágica
EIEC- *Escherichia coli* enteroinvasiva
EPEC- *Escherichia coli* enteropatogênica
ESBL- Beta- lactamase de amplo espectro
ETEC- *Escherichia coli* enterotoxigênica
GEN- Gentamicina
GO- Reparo oxidativo (*GO system*)
LB- Agar *Luria Bertani*
LEE-*Locus enterocyte effacement*
LPS- Lipopolissacarídeo
IPM- Imipenem
ITU- Infecção do trato urinário

MMR- *methyl-directed mismatch repair*
MPM- Meropenem
NAG- Acido N-acetilglicosamina
NAL- Acido Nalidixico
NAM- Acido N-acetilmurâmico
NER- Reparo por excisão de nucleotídeos
NIT- Nitrofurantoína
NOR- Norfloxacin
PBP- Proteína ligadora de penicilina
PIT- Piperacilina/tazobactam
RIF- Rifampicina
ROS- Espécies reativas de oxigênio
STEC- *Escherichia coli* Shiga Toxigênica
SLT- Toxina *shiga like*
SUT- Sulfametoxazol/Trimetropim
UFC - Unidade Formadora de Colônias
UPEC- *Escherichia coli* uropatogênica
VTEC- *Escherichia coli* verotoxigênicas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 <i>Escherichia coli</i>	17
1.1.1 <i>Escherichia coli</i> patogênica	17
1.1.2 <i>Escherichia coli</i> uropatogênica (UPEC)	19
1.2 Infecções urinárias e antibioticoterapia	19
1.3 Antibióticos beta-lactâmicos	21
1.4 Mecanismos de resistência	23
1.4.1 Produção de enzimas beta-lactamases	23
1.4.2 Alteração na permeabilidade	24
1.4.3 Alteração de alvo	24
1.4.4 Mecanismo de efluxo	25
1.5 Mutações e resistência aos antibióticos	26
1.6 Mecanismos de reparo do DNA	27
1.6.1 Complexo de genes <i>mut</i>	28
1.6.2 Reparo de bases malpareadas (<i>methyl directed mismatch repair</i> – MMR)	30
1.6.3 Reparo oxidativo (Sistema GO)	31
1.7 O fenótipo mutador	34
2 OBJETIVO	37
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Linhagens bacterianas e condições de crescimento <i>in vitro</i>	38
3.2 Antibiograma e caracterização do fenótipo mutador	38
3.2.1 Realização do antibiograma pelo método de difusão em disco (Kirby – Bauer)	38
3.2.2 Caracterização do fenótipo matador	39
3.3 Determinação da frequência de mutação para resistência a antibiótico	39
3.3.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	39
3.3.2 Frequência de mutação	40
3.4 Busca de bases genéticas para o fenótipo mutador encontrado nas linhagens clínicas de <i>E. coli</i>	41
3.5 Seleção de colônias satélites resistentes a beta-lactâmicos e determinação dos valores de CIM para os antibióticos cefalotina ou ceftazidima a partir das linhagens mutadoras	42
3.6 Determinação da natureza da resistência aos beta-lactâmicos em clones derivados das linhagens mutadoras (testes de natureza da mutação)	43
3.6.1 Testes fenotípicos de produção de enzimas beta – lactamases	43
3.6.2 Testes para avaliação de permeabilidade de membrana	44
3.6.2.1 Avaliação da resistência ao cristal violeta	44

3.6.2.2 Teste de captação do cristal violeta (C.V)	45
4 RESULTADOS	46
4.1 Antibiograma e caracterização do fenótipo mutador.	46
4.2 Determinação da frequência de mutação espontânea nas linhagens mutadoras	48
4.2.1 Cálculos da frequência de mutação espontânea	50
4.3 Busca de bases genéticas para o fenótipo mutador encontrado nas linhagens clínicas de <i>E. coli</i>	53
4.4 Caracterização dos mecanismos de resistência em colônias satélites derivadas de linhagens mutadoras após seleção com antibióticos beta-lactâmicos (cefalotina e ceftazidima)	54
4.5 Determinação dos mecanismos envolvidos na resistência à cefalotina ou a ceftazidima nos isolados derivados das linhagens mutadoras.	62
4.5.1 Produção de beta-lactamases nos isolados obtidos.....	62
4.5.2 Teste de resistência ao Cristal violeta (C.V.)	64
4.5.3 Teste de captação do cristal violeta (C.V) – verificação de permeabilidade de membrana	65
5 DISCUSSÃO	68
6 CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma eubactéria comumente encontrada como parte integrante da microbiota do trato gastrointestinal de mamíferos, incluindo humanos, e é classificada como um bastonete reto, gram-negativo, não formador de esporo, podendo ser móvel, quando da presença de flagelo, ou imóvel. As bactérias dessa espécie são anaeróbias facultativas e utilizam D-glicose e outros carboidratos com a formação de ácido e gás. As cepas de *E. coli* podem ser divididas em saprófitos (componentes da microbiota) que, na presença de alteração na imunidade do hospedeiro ou em uma mudança no microambiente que colonizam podem agir como patógenos oportunistas e as cepas patogênicas especializadas, com a capacidade de causar doenças intestinais ou extra - intestinais (TRAVIS et al., 2008).

A classificação tradicional de amostras de *E. coli*, baseia-se na determinação de antígenos somáticos (O), polissacarídeos capsulares (K) e flagelares (H), permitindo a diferenciação entre amostras patogênicas das comensais. O lipopolissacarídeo (LPS) também conhecido como endotoxina, é um componente essencial e característico da membrana externa das bactérias gram negativas, responsável por diversos efeitos biológicos, incluindo a inflamação e a resistência ao soro (KONEMAN, 2008).

1.1.1 *Escherichia coli* patogênica

As linhagens patogênicas de *E. coli* são classificadas da seguinte em linhagens enteropatogênicas, que causam danos intestinais ao hospedeiro, como: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEG), *E. coli* enteroinvasiva A (EIEC) e *E. coli* difusamente aderente (DEAC) e linhagens patogênicas extra-intestinais que são: *E. coli* causadora da meningite neo-natal e *E. coli* uropatogênica (UPEC) (KONEMAN, 2008).

A EPEC causa uma lesão histopatológica denominada “*attaching effacing*”, sendo que os enterócitos são degenerados e ocorre inflamação na lâmina própria, principalmente no íleo. Os fatores de patogenicidade são codificados por uma ilha de patogenicidade denominada *locus enterocyte effacement* (LEE). A região LEE codifica importantes fatores para a aderência, como a intimina bem como uma série de proteínas denominadas Esps (EPEC secreted proteins) (CLEARY, 2004).

EHEC caracteriza-se pela produção de hemolisina e produção da toxina *shiga like* (SLT) codificada pelo gene *stx1* ou *stx2*. A citotoxina Shiga é prejudicial para uma variedade de células endoteliais, incluindo células do cólon e íleo em humanos. A STx 1, toxina de Shiga em *E. coli*, é idêntica a Shiga toxina de *Shigella dysenteriae*, e por isso recebe esse nome. Linhagens de *E. coli* que produzem a toxina de Shiga também podem ser classificadas como *E. coli* Shiga Toxigênicas (STEC) ou *E. coli* verotoxigênicas (VTEC) (DOUGAN et al., 2001). Em humanos, a infecção por EHEC pode ocasionar a síndrome hemolítica urêmica, podendo apresentar uma alta taxa de mortalidade. Essa doença ocorre quando as toxinas produzidas por *E. coli* são absorvidas pela circulação sistêmica e caracteriza-se por trombocitopenia, anemia hemolítica e nefropatia. O sorotipo O157:H7 é um dos mais identificados e conhecidos dentre as estirpes de EHEC (HENTON et al., 1994).

Linhagens caracterizadas como EIEC apresentam características bioquímicas, genéticas e de patogenicidade semelhantes a *Shigella sp.* Os mecanismos de patogenicidade deste patotipo não estão completamente elucidados, contudo estudos demonstram que o microrganismo invade profundamente o epitélio do intestino, e em seguida, atinge o sistema linfático, onde se multiplica ao mesmo tempo em que ocorre a morte de algumas células e produção de endotoxinas. O quadro clínico caracteriza-se por uma forte reação inflamatória, presença de úlceras, diarreia aquosa podendo apresentar muco e sangue (HENTON et al., 1994).

As linhagens de *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) são enterovirulentas e produzem toxinas de efeito rápido provocando a doença de gastroenterite. Dentre os fatores de virulência encontrados em ETEC, podemos destacar as exotoxinas termoestáveis (STa e STb) e termolábil (LT), uma toxina conhecida como EAST e produção de fímbrias para adesão à mucosa do intestino (SIXMA, 1993).

Dentre as *E. coli* patogênicas extra-intestinais, as UPECs estão envolvidas em aproximadamente 80% dos casos de infecções do trato urinário (ITU). A urina é um excelente meio de cultura para a maioria dos microrganismos que infectam o trato urinário e o crescimento bacteriano pode ocorrer resultando em contagens elevadas em infecções estabelecidas não tratadas, ou mesmo por contaminação da genitália externa (CAMARGO, 2001).

1.1.2 *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC)

A grande variabilidade genética encontrada entre as cepas de UPEC não permite que as mesmas sejam agrupadas em categorias distintas como acontece no caso de *E. coli* diarreiogênicas. Várias hipóteses têm sido levantadas para explicar a origem dessa diversidade. Uma delas preconiza que bactérias patogênicas podem se transformar em bactérias uropatogênicas através da transmissão horizontal de genes de virulência que possibilitam que as mesmas infectem e sobrevivam no trato urinário (ABE, 2008). Através dos fatores de virulência, algumas cepas de UPEC podem invadir as células epiteliais do hospedeiro e produzir um biofilme intracelular que confere proteção em relação ao ataque do sistema imune e tratamento com antibióticos por longos períodos. Essa propriedade das UPECs pode explicar a natureza enigmática da infecção crônica e recorrente da ITU (ANDERSON et al., 2004).

Os fatores de virulência mais comumente associados às UPECs são: (i) adesinas específicas, como fimbria P (Pap), fimbria tipo 1, fimbria S; (ii) outras adesinas não fimbriais; (iii) hemolisina e (iv) formação de cápsula de polissacarídeos para imunoevasão (WILES; KULESUS; MULVEY, 2008). Destaca-se a fimbria tipo 1 por ser um importante fator de virulência encontrado em UPEC e em outras *Enterobacteriaceae*. Ela possui afinidade a oligossacarídeos do tipo manose e em UPEC é essencial para a adesão ao epitélio do trato urinário (BOWER et al., 2005).

1.2 Infecções urinárias e antibioticoterapia

O trato urinário é usualmente um ambiente estéril, excetuando – se a uretra distal que apresenta organismos residentes. A manutenção deste ambiente ocorre devido a presença de uma série de mecanismos que atuam na prevenção das ITU. A alta osmolaridade, baixo pH, presença de ácidos orgânicos e concentração de ureia, além do fluxo e produção constantes, os quais possibilitam a eliminação mecânica de microrganismos, são alguns deles. Devem ser consideradas ainda as barreiras de defesa das mucosas e a imunocompetência sistêmica do hospedeiro.

A infecção do trato urinário (ITU) caracteriza-se pela presença de agentes infecciosos e invasão tissular em qualquer parte do trato urinário (urina, bexiga, rins), sendo usualmente classificada de acordo com o seu sítio de infecção. A infecção do trato urinário pode ser assintomática ou sintomática, e um quadro muito comum no trato urinário é a bacteremia

assintomática, que é definida mais precisamente como o isolamento de bactérias na urina em quantidade maior ou igual a 10^5 unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml), mas sem sintoma local ou sistêmico de infecção (STAMM, 2002). A bacteremia de baixa contagem pode significar contaminação, contudo, a maioria dos microorganismos isolados é típica de infecção do trato urinário, como a *E. coli* dentre outras enterobactérias gram negativas ou *S. saprophyticus*. Portanto, a baixa contagem de bactérias pode refletir uma fase inicial de ITU, uma diluição urinária por maior ingestão de líquidos, crescimento lento de certos uropatógenos ou ainda síndrome uretral (STAMM, 2002). As ITU são classificadas como: inferior (cistite-infecção na bexiga) e superior (pielonefrite - infecção do rim). Os sintomas da cistite são relativamente moderados, já a pielonefrite apresenta sintomas mais graves e em 30% dos casos pode gerar complicações, onde uma bacteremia pode evoluir para um quadro de sepse. (ANDERSON et al., 2004). As ITU representam o principal tipo de infecção hospitalar e é uma das mais frequentes causas de consultas na prática médica, com cerca de 40% do total das infecções adquiridas em hospitais e, em custo, 14% do valor total despendido com as infecções nosocomiais. A grande maioria das ITU é causada por enterobactérias, mas também podem ser provocadas por outros microorganismos, *E. coli* permanece o uropatógeno predominantemente isolado de infecções agudas (VIEIRA et al., 2007; ARSLAN, 2005).

A antibioticoterapia em casos de infecção urinária é realizada através do uso de diferentes agentes antimicrobianos. Os antibióticos mais utilizados no tratamento de ITU são os seguintes: sulfametoxazol, trimetropim, amoxicilina, ácido nalidixico, cefalexina, ciprofloxacina, norfloxacina e nitrofurantoína (HEILBERG; SCHOR, 2003). Na rotina de microbiologia clínica, além dos antibióticos citados acima, são testados cefalosporinas de todas as classes (cefalotina, ceftazidima, cefoxitina, cefepime), gentamicina, amicacina, imipenem, meropenem, além do monobactâmico aztreonam.

No que diz respeito ao modo de ação e mecanismos de resistência dos agentes antimicrobianos destacam-se algumas classes, como: aminoglicosídeos, os componentes dessa classe atuam diretamente no ribossomo bacteriano, se ligam à porção 30S do ribossomo, diminuindo a síntese protéica e levando à leitura incorreta do RNA mensageiro. Os mecanismos de resistência contra aminoglicosídeos são: redução da concentração no interior da célula através da ação de bombas de efluxo, alteração do alvo e inativação de enzimas (acetiltransferases, fosfotransferases e nucleotidiltransferase) (KONEMAN, 2008). As quinolonas são utilizadas para o tratamento de infecções respiratórias e urinárias. O alvo das quinolonas são as topoisomerases tipo II (DNA-girase em gram-negativas), enzimas que

separam as fitas de DNA em duas fitas simples. Mutações nos genes que codificam a DNA girase é o principal mecanismo de resistência contra essa classe de antibióticos. O cloranfenicol é um antibacteriano de largo espectro, utilizado principalmente contra bactérias anaeróbias, mas utilizado como controle em todos gram-negativos por ser considerado um antibiótico potencialmente indutor de resistência. Tem ação sobre a síntese proteica, inibindo a formação das ligações peptídicas durante o alongamento da cadeia polipeptídica. O principal mecanismo de resistência bacteriana que inativa esse agente é a enzima cloranfenicol acetiltransferase (TENOVER, 2006). A rifampicina não é usualmente utilizada contra gram-negativos porém é utilizado como controle positivo em cepas mutadoras, que frente a esse antibiótico apresentam o fenótipo mutador com grande quantidade de colônias satélite. A presença de colônias heteroresistentes em relação a rifampicina ocorre devido a mutações no gene *rpoB*, que promove o aumento da resistência. A Rifampicina tem sua ação sobre a RNA-polimerase, promovendo uma ligação irreversível e bloqueando a iniciação da cadeia de RNA. Os beta-lactâmicos incluem as penicilinas (ampicilina), penicilina + inibidor de beta-lactamase (piperacilina/tazobactam), cefalosporinas de primeira (cefalexina, cefalotina), segunda (cefotaxima), terceira (ceftazidima, ceftriaxona) e quarta geração (cefepime), monobactâmicos (aztreonam), carbapenêmicos (imipenem, meropenem, ertapenem). Essa categoria de antibióticos possui larga aplicação clínica e os mecanismos de resistência a esses compostos podem envolver diferentes estratégias, como descrito no próximo item (TENOVER, 2006)

1.3 Antibióticos beta-lactâmicos

Atualmente, os antibióticos beta-lactâmicos permanecem como componentes essenciais a antibioticoterapia utilizada para o tratamento de infecções causadas por bacilos gram-negativo em hospitais (CLSI, 2011). As cefalosporinas são agrupadas em “gerações” por suas características antimicrobianas. As primeiras cefalosporinas foram agrupadas na “primeira geração” enquanto mais adiante, cefalosporinas de espectro de ação mais amplo frente a bactérias gram-negativas, foram classificadas como cefalosporinas de segunda geração. Cada nova geração de cefalosporinas tem mais potência frente a bactérias gram-negativas e características antimicrobianas perceptivelmente maiores que a geração precedente. Os carbapenêmicos também são um grupo de antibióticos beta-lactâmicos com a diferença de que o átomo de enxofre no anel tiazolidínico da molécula de penicilina é substituído por um átomo de carbono (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

A obtenção do ácido 6-amino-penicilânico por hidrólise da penicilina, permitiu a síntese de diversos beta-lactâmicos por adição e/ou substituição de radicais, como a ampicilina e a ureidopenicilina. A primeira cefalosporina foi isolada de *Cefasloporium acremonium* em 1948, mas apenas após a caracterização do ácido cefalosporânico e modificações em suas cadeias laterais, teve seu uso clínico iniciado em 1964. As cefalosporinas, junto com as cefamicinas, constituem o subgrupo dos cefens. Possuem em sua estrutura básica o anel beta-lactâmico associado a um anel dihidrotiazinico, denominados em conjunto, ácido cefalosporânico (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

Os antibióticos beta-lactâmicos, atuam na parede celular bacteriana que é composta por unidades alternadas de ácido N-acetilmurâmico (NAM) e N-acetilglicosamina (NAG), cuja ligação covalente é catalisada por transglicosidades. A ligação entre as cadeias com repetições de NAM e NAG é feita entre os terminais pentapeptídico com dois resíduos de D-alanina na sua extremidade. A ligação entre as cadeias com repetições NAM e NAG é feita entre os terminais pentapeptídicos das moléculas de NAM, cada NAM possui um terminal pentapeptídico com dois resíduos de D-alanina na sua extremidade. A ligação covalente entre esses dois resíduos – a transpeptidação- é catalisada pelas proteínas ligadoras de penicilina (PBPs). Essas ligações, que se repetem ao longo de toda a parede celular, são essenciais para conferir à mesma rigidez e estabilidade. Os antibióticos beta-lactâmicos atuam interferindo na biosíntese da camada de peptidoglicano, o anel beta-lactâmico tem estrutura semelhante ao terminal D-alanina-D-alanina do NAM, o que permite a sua ligação às PBPs, que por sua vez sofrem acilação durante essa interação, o que as torna incapazes de catalisar outras reações de transpeptidação (DRAWZ SM, 2010). Como a parede celular é uma estrutura dinâmica e duplicada a cada 20 ou 30 minutos, para a divisão bacteriana, e a primeira etapa da síntese da parede inclui a autólise para inserção de novas unidades de NAM e NAG, a parada da síntese causada pelo beta-lactâmico resulta indiretamente na desestruturação da parede e predispõe a célula à lise osmótica. Além das transpeptidases, outras proteínas ligadoras de penicilina participam da formação da parede da célula bacteriana e possuem funções distintas. Dessa forma a interferência com diferentes PBPs produz diferentes efeitos morfológicos à medida que a síntese da parede é comprometida (KONEMAN, 2008). As cefalosporinas são amplamente utilizadas no tratamento de ITU causada por bactérias da família *Enterobacteriaceae* e mostra grande afinidade pela PBP3 em *E. coli*, a qual, quando inativa resulta na inibição da divisão celular.

Sobre os mecanismos de resistência dessa categoria, esses podem ser expressos continuamente haja ou não um estímulo (KONEMAN et al., 2008). Essa assertiva é referida

como expressão constitutiva. Em contrapartida, alguns genes precisam ser “induzidos” pela exposição à substância estimulante antes de produzirem o produto do gene induzido. Muitas beta-lactamases das bactérias gram-negativas estão presentes no cromossomo e são produzidas constitutivamente, mas podem ser induzidas para produzir níveis ainda maiores da enzima. Alguns mecanismos são expressos de forma homogênea (totalidade da população bacteriana testada), enquanto outros são expressos de forma heterogênea (apenas uma pequena fração das bactérias) (KONEMAN, 2008).

A resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, geralmente é impulsionada pela produção de enzimas beta-lactamases codificadas por plasmídeos (mecanismo de resistência exógena), porém outros mecanismos de resistência codificados pelo cromossomo (mecanismos de resistência endógena) também podem ser utilizados pela bactéria contra os beta-lactâmicos, como a alteração na permeabilidade, alteração da proteína alvo (PBPs) impedindo a ligação do antibiótico, ou ainda, pela conjugação desses mecanismos (MOYA et al., 2009).

1.4 Mecanismos de resistência

1.4.1 Produção de enzimas beta-lactamases

Compostos beta-lactâmicos são produzidos por diversos microorganismos presentes no solo e provavelmente sua produção pode representar uma vantagem competitiva pelo nicho ecológico. De modo análogo, a produção de beta-lactamases pode representar uma vantagem adaptativa para garantir a integridade da parede celular. As beta-lactamases constituem um grupo diverso de enzimas, mas tem em comum a capacidade de hidrolisar o anel beta-lactâmico. Inicialmente as beta-lactamases acilam os beta-lactâmicos e a seguir atuam hidrolisando-os, o que permite a regeneração de sua capacidade catalítica, tornando-as disponíveis para atuar em outra catálise (DRAWZ, 2010). Muitos gêneros de bactérias gram-negativas apresentam ocorrência natural de beta-lactamases mediadas por cromossomos. Essas enzimas são estruturalmente relacionadas com as PBPs e apresentam homologia em sua sequência (GHUYSEN, 1991).

Duas classificações de beta-lactamases são amplamente utilizadas. A primeira proposta foi a de Ambler, que se baseia na similaridade de sequências de aminoácidos, sendo as enzimas agrupadas em quatro classes principais A, B, C e D, nessa classificação, o grupo de enzimas com capacidade de hidrolisar oximiino cefalosporinas denominado beta-

lactamases de espectro estendido (ESBL) pertencem à classe A de Ambler. A segunda classificação, proposta por Bush-Jacoby-Medeiros se baseia na homologia, ou seja, substratos preferenciais e bloqueio da atividade enzimática por inibidores (BUSH; JACOBY, 2010). Nessa classificação, as ESBLs pertencem ao subgrupo 2be, indicando que derivam das enzimas TEM-1, TEM-2 E SHV-1, mas possuem um espectro de hidrólise mais amplo indicado pela letra “e” na sigla. Outra particularidade funcional é que em sua maioria, sofrem inibição por clavulanato, sulbactam e tazobactam, o que facilita sua detecção laboratorial. Outro grupo de enzimas com propriedades funcionais semelhantes às das derivadas de TEM-1, TEM-21 E SHV-1 são as cefotaximases (CTX-M). Esse grupo de enzimas pertence à classe A de Ambler, e assim como as ESBLs derivadas de TEM-1, TEM-21 E SHV-1, são inibidas por clavulanato, sulbactam e piperacilina (BUSH; JACOBY, 2010).

1.4.2 Alteração na permeabilidade

A permeabilidade das membranas aos antibióticos e o transporte das moléculas através das barreiras são muito importantes, sendo mais importantes ainda nas bactérias gram-negativas, que possuem duas membranas que formam um obstáculo contra os agentes que tem o seu alvo de ação localizado dentro da célula.

Para muitos antibióticos, incluindo o grupo beta-lactâmico, o principal meio de transporte através da membrana externa das bactérias entéricas é o grupo de proteínas de membrana denominadas porinas. Duas importantes proteínas foram identificadas em *E. coli*: um grande canal porina denominado OmpF (proteína F da membrana externa) e um pequeno canal porina denominado OmpC (YOSHIMURA; NIKAIDO, 1985). Outros antibióticos além dos compostos beta-lactâmicos também parecem depender das porinas para ter acesso a célula. A resistência ao cloranfenicol e aos aminoglicosídeos que geralmente é causada pela degradação enzimática, assim como a resistência aos beta-lactâmicos e quinolonas que geralmente é causada por alteração de alvo, também podem resultar de alterações nas porinas e, conseqüentemente, redução na permeabilidade do envoltório celular (SANDERS et al., 1984).

1.4.3 Alteração de alvo

O alvo dos antibióticos beta-lactâmicos são as PBPs, em *E. coli* são encontradas 12 PBPs diferentes, sendo que 4 delas podem não ser essenciais *in vivo*, enquanto as outras

contribuem direta ou indiretamente com a sensibilidade aos beta-lactâmicos. (SARKAR et al., 2011). A alteração ou deleção de uma PBP pode levar a resistência bacteriana ao antibiótico que tem essa proteína por alvo, fazendo com que o antibiótico não tenha mais acesso a cadeia de peptidoglicano em crescimento. Pequenas mutações pontuais, deleções ou inserções nos genes que codificam uma PBP, podem levar a alterações na sequência de aminoácidos da proteína resultante desse gene. Tem sido demonstrada em estudos com diversas bactérias a ocorrência de PBPs alteradas que levam a resistência, como a PBP1 em *H. pylori*, a PBP2 em *S. aureus* e a inativação da PBP4 em *P. aeruginosa*. (SARKAR et al., 2011).

A função distinta das diferentes PBPs foi ilustrada de forma significativa em *E. coli*, na qual a interferência com proteínas diferentes produz diferentes efeitos morfológicos, a medida que a síntese das paredes celulares é comprometida. Em *E. coli* a PBP 2 atua na formação das paredes cruzadas na divisão celular e a PBP 3 no alongamento das células após a divisão (SPRATT, 1975). As cefalosporinas são amplamente utilizadas no tratamento de ITU causada por bactérias da família *Enterobacteriaceae* e mostra grande afinidade pela PBP3 em *Escherichia coli*, a qual, quando inativa resulta na inibição da divisão celular.

1.4.4 Mecanismo de efluxo

O efluxo de antibióticos pode conferir um nível residual de resistência através da remoção ativa, de modo que as concentrações intracelulares desses agentes nunca atingem um nível suficientemente alto para exercer uma atividade antimicrobiana efetiva (KONEMAN, 2008). Este mecanismo pode não ser suficiente para expressar resistência clínica, porém, em conjunto com outros mecanismos pode estar na origem de falências terapêuticas. A especificidade do antibiótico pode variar em função da bomba de efluxo. A resistência é frequentemente causada por mutações que ocorrem nos repressores transcricionais dos genes que codificam essas proteínas. As mutações que ocorrem nestes genes podem também levar a um aumento da eficiência do transporte dos antibióticos para o exterior da célula (MOREIRA; SOUZA; MORAES, 2004).

Figura 1- Mecanismos de Resistência em Bactérias Gram-Negativas

Os mecanismos de resistência presentes em gram-negativos incluem a perda de porinas, o que reduz o movimento do fármaco através da membrana celular, a presença de β -lactamases, no espaço periplasmático, o que degrada o β -lactâmico; aumento da expressão da bomba de efluxo da transmembrana, a qual expelle o medicamento a partir de a bactéria antes que possa ter um efeito, que tornam o antibiótico incapaz de interagir com o seu alvo, as mutações no alvo de ação dos antibióticos, que impedem que o antibiótico se ligue ao alvo e uma mutação no lipopolissacarídeo, o que torna a classe de antibióticos de polimixina incapazes de ligar este alvo. As esferas vermelhas indicam os antibióticos.

Fonte: Peleg (2010).

1.5 Mutações e resistência aos antibióticos

A estabilidade e integridade do DNA são indispensáveis para a sobrevivência e continuidade da correta informação genética pós replicação. Porém, em células normais existe a frequente formação de lesões no DNA que podem levar ao estabelecimento de mutações, as quais podem ter os mais diversos efeitos sobre a célula, como efeitos deletérios e letais até efeitos benéficos que promovem adaptabilidade ao meio (PERRON; HALL; BUCKLING, 2010). Com a intenção de preservar a integridade genômica, os organismos dispõem de múltiplos mecanismos de reparo e prevenção de danos, os quais promovem a estabilidade do DNA, protegem o genoma de modificações potencialmente mutagênicas ou citotóxicas e

garantem a transmissão acurada da informação genética (MILLER, 1996). Os mecanismos de reparo de DNA trabalham, com algumas exceções, para evitar que essas lesões tornem –se mutações. Boa parte dessas lesões é formada por fatores endógenos ou exógenos, que danificam o DNA de maneira contínua.

As mutações no DNA por troca de bases ocorrem por transição entre bases do mesmo grupo, uma purina por outra pirimidina por outra pirimidina; ou por transversão entre bases de grupos distintos. Se a lesão leva a uma distorção estrutural, causando um bloqueio da progressão da molécula de DNA polimerase, ela é classificada como potencialmente letal (SNIEGOWSKI; GERRISH; LENSKI, 1997). Mutações em nível molecular (o tipo mais comum é a mutação pontual) podem ser causadas por fatores exógenos (ambientais) ou endógenos. Esse tipo de mutação envolve a substituição de um par de bases, ou ainda a adição ou deleção de uma base. Essa mutação pode levar a alteração de um códon, resultando em uma das seguintes situações: mutação de sentido trocado, quando ocorre a alteração do aminoácido codificado, gerando uma proteína defeituosa; mutação sem sentido, a alteração do códon gera um códon de terminação, gerando uma proteína incompleta; mutação silenciosa, quando o códon alterado codifica o mesmo aminoácido, não prejudicando portanto a síntese proteica; ou ainda a uma alteração no quadro de leitura (frameshift). Sabe-se que processos celulares normais geram danos no DNA, da mesma natureza, porém em maior frequência, que aqueles gerados por fatores ambientais (LINDAHL, 1999).

Apesar da maioria das mutações serem desvantajosas, há a possibilidade das mesmas desenvolverem novas características desejáveis. A mutação pode funcionar como um mecanismo de adaptabilidade e evolução, como exemplo as bactérias que desenvolvem resistência a antimicrobianos, decorrente de mutações cromossômicas.

1.6 Mecanismos de reparo do DNA

Os conhecimentos acerca dos mecanismos de reparo de DNA são essenciais ao entendimento sobre como e por que o genoma de um indivíduo é afetado ao longo do seu tempo de vida e sobre como processos de reparo de DNA são eficientemente conduzidos, através de diferentes caminhos. As vias de reparo de DNA estão universalmente presentes nas células e são conservadas. Apesar da proteção oferecida por seus diversos mecanismos, alguns danos escapam ao reparo e causam erros na replicação e transcrição. Estão descritos atualmente os seguintes mecanismos de reparo: (i) reparo direto (fotorreativação). O mecanismo de fotorreativação utiliza a luz visível para retirar ou reverter danos causados por

irradiação UV no DNA. A enzima fotoliase tem dois cromóforos, um deles capta um fóton e a transfere para um segundo cromóforo. A energia do segundo cromóforo é utilizada para reverter o dímero, ou seja, quebrar a ligação covalente entre as pirimidinas (LINDAHL, 1999); (ii) reparação direta por alquiltransferência. Outra forma de reversão direta da lesão é o reparo de bases alquiladas. Em consequência de processos químicos e enzimáticos, grupos alquil podem ser incorporados ao DNA. Proteínas codificadas pelos genes *ada* e *ogt* realizam o processo de alquiltransferência, captando para si os grupos alquil em um mecanismo no qual a molécula de proteína que recebe o grupo alquil perde a sua atividade ; (iii) reparo por excisão de bases (BER), esse tipo de reparo é caracterizado pela excisão única e exclusivamente da base lesada. Uma série de enzimas, denominadas DNA-glicosilases, reconhece a lesão e promovem a hidrólise da ligação N-glicosil que liga a base ao esqueleto de fosfato-açúcar do DNA. Após a liberação da base errônea (formação do sítio AP), a enzima AP endonuclease promove a excisão da cadeia em regiões adjacentes a base perdida. A enzima DNA polimerase I coloca citosina no local da lesão e a DNA ligase promove a ligação da fita corrigida (LINDAHL, 1999); (iv) reparo por excisão de nucleotídeos (NER), esse sistema é mais geral e mais flexível do que o BER descrito no item anterior, pois é capaz de reconhecer e reparar um grande número de lesões não necessariamente relacionadas estruturalmente. O mecanismo funciona com a inicial remoção de um fragmento de DNA contendo a lesão, e a lacuna resultante é preenchida tendo a fita intacta como molde (LINDAHL, 1999); (v) reparação de bases mal pareadas (*mismatch repair*), o reparo de erros de pareamento (ou MMR) é uma via de reparo que corrige bases mal pareadas no DNA após a replicação. A atividade revisora da enzima corrige alguns, mas não todos os erros. O reparo de erros de pareamento consiste no reconhecimento da base mal pareada, excisão do segmento de DNA que contém o erro e a síntese da região removida utilizando a fita parental como molde (WU; KHALPEY; CASCALHO, 2004); (vi) reparo oxidativo (ou sistema GO), vários tipos de lesões de base podem ser causadas por estresse oxidativo, sendo que a lesão 8-oxoG é a mais abundante e bem caracterizada em *E. coli* (MICHAELS, 1992).

1.6.1 Complexo de genes *mut*

Os genes *mut* têm sido amplamente descritos na literatura associados ao aumento da taxa de mutação quando defeituosos. O organismo seja ele procariótico ou eucariótico, ao perder parte da função de uma das vias de reparo composta pelos genes *mut* (MMR e sistema GO), pode sofrer alterações importantes, como processos de carcinogênese em células

eucarióticas e alterações letais ou benéficas em células procarióticas. Em bactérias, o complexo de genes *mut* quando defeituoso, têm sido associado ao surgimento de cepas consideradas hipermutadoras, onde o defeito no gene aumenta a taxa e frequência de mutação e essas mutações afetam benéficamente os mecanismos de resistência a antibióticos (HORST, 1999; MILLER, 2002).

A resistência endógena pode resultar de mutações envolvendo genes cromossômicos, pois durante o processo de replicação, todo organismo vivo está passível a sofrer danos ou erros em seu DNA. Como já citado nos itens anteriores, os mecanismos de reparo são responsáveis por corrigir lesões do DNA. As lesões não eliminadas podem resultar em mutações, que serão herdadas pelas gerações seguintes, podendo impossibilitar o bom funcionamento do organismo ou em alguns casos aumentar a variabilidade de uma espécie. Em bactérias, mutações em alguns genes podem levar a um fenótipo seletivo, sendo dessa forma favorável a adaptabilidade da bactéria ao meio.

Dentre os mecanismos de reparo atuantes em bactérias, dois agem no organismo através da ação pós-replicativa das proteínas resultantes do complexo de genes *mut* (tabela 1), são eles: reparo de bases mal pareadas (MMR) e o reparo por excisão de bases - (mediado pelo sistema GO). Em *E. coli* o sistema MMR envolve os produtos dos genes *mutS*, *mutL*, *mutH* e *uvrD* e o sistema GO conta com a participação do produtos dos genes *mutT*, *mutM* e *mutY* (CHOPRA et al., 2003) (Tabela 1).

Tabela 1 - Genes do complexo *mut*

Gene	Especificidade	Ação
<i>mutH</i>	G:C - A:T e A:T - G:	participa do sistema MMR
<i>mutL</i>	G:C - A:T e A:T - G:	participa do sistema MMR
<i>mutS</i>	G:C - A:T e A:T - G:	participa do sistema MMR
<i>mutD</i>	Todas substituições de base	atua com a DNA polimerase III
<i>mutT</i>	A:T - C:G	previne incorporação de A: 8-oxodG
<i>mutY</i>	G:C - T:A	Glicosilase corrige G: A e 8-oxodG:A
<i>mutM</i>	G:C - T:A	promove excisão da 8-oxodG

Fonte: Adaptado de Horst (1999).

1.6.2 Reparo de bases malpareadas (*methyl directed mismatch repair* – MMR)

O reparo de erros de pareamento (ou MMR) é uma via de reparo que corrige bases mal pareadas no DNA após a replicação. A replicação é uma importante fonte de mutações, visto que a DNA polimerase incorpora um erro de pareamento a cada 10^{-4} a 10^{-5} nucleotídeos adicionados (WU; KHALPEY; CASCALHO, 2004). A atividade revisora da enzima corrige alguns, mas não todos os erros. O reparo de erros de pareamento consiste no reconhecimento da base mal pareada, excisão do segmento de DNA que contém o erro e a síntese da região removida utilizando a fita parental como molde.

Oito diferentes tipos de erros de pareamento podem ser gerados durante a replicação, além de estruturas em forma de alça resultantes de inserções ou deleções de nucleotídeos em uma das fitas de DNA. O MMR reconhece com eficiência a maioria dos erros, retirando-os do genoma recém replicado. É necessário que haja uma coordenação entre o MMR e a replicação do DNA, para que seja feito o direcionamento do reparo à fita recém sintetizada (BOWER et al., 2001).

Em *E. coli*, o sistema MMR é direcionado por metilação das sequências GATC na fita que é sintetizada após a replicação. Além da DNA polimerase, SSB (single strand binding protein), helicase, exonucleases e DNA ligase, três enzimas específicas são requeridas. O MutS se liga nas bases mal-pareadas. O MutH se liga na sequência GATC. Se somente uma das fitas é metilada no GATC, a proteína MutH atua como endonuclease sítio específica clivando a fita não metilada na porção 5' do G da sequência GATC, marcando a fita para ser reparada. A proteína MutL se liga ao MutS e MutH no complexo. Uma vez que a clivagem ocorreu, a fita de DNA não metilada é degradada no sítio de clivagem até a região de mau pareamento e replicada com DNA novo (BREGEON et al., 1999; TAJIRI; MAKI; SEKIGUCHI, 1995).

Figura 2 - Sistema MMR

Para a correção de bases mal incorporadas, é necessária distinção entre a fita molde e a fita recém sintetizada. Em procariotos, logo após a replicação, as adeninas no contexto GATC estão metiladas apenas na fita molde. O processo de reparo se inicia com a ligação do homodímero de MutS ao erro de pareamento. Então, MutL é recrutada e ativa MutH, que cliva a fita não metilada a 5' da sequência GATC mais próxima (acima ou abaixo do erro de pareamento). O fragmento desde o local de clivagem até o erro de pareamento é removido por uma exonuclease, auxiliada por uma helicase e por proteínas de ligação a fita simples. A distância entre o *mismatch* e o sítio GATC pode chegar a 1000 pb, o que torna o MMR um processo bastante dispendioso.

Fonte: Alberts (2002).

1.6.3 Reparo oxidativo (Sistema GO)

A oxidação, no que diz respeito à modificação de bases, representa o principal fator endógeno de danos ao DNA, sendo estimada a formação de 10 000 bases oxidadas por dia por célula de mamífero. Mais de cem tipos diferentes de modificações causadas por espécies reativas de oxigênio (ROS) no DNA já foram identificadas, incluindo lesões de bases, sítios AP, lesões de desoxirribose, quebras de fita simples, quebras de fita dupla e *crosslinks*, muitas das quais apresentam propriedades citotóxicas e/ou mutagênicas (CADET et al., 1997).

O aumento intracelular de ROS causa danos a diversas biomoléculas e caracteriza uma situação de estresse oxidativo. No curso da evolução, os organismos desenvolveram diferentes estratégias para minimizar os efeitos deletérios de danos oxidativos (ou reduzir o custo do próprio metabolismo), incluindo um intrincado sistema de defesa antioxidante (composto por SOD, glutathione peroxidase, catalase, peroxiredoxinas) (FINKEL, 2000) e diversos mecanismos de reparo do DNA, dos quais se destaca o reparo por excisão de bases (BER). Dentre os diversos danos causados por ROS no DNA, o BER está envolvido no reparo de lesões em bases, erros de pareamento, sítios AP e quebras de fita simples (FRIEDBERG; WALKER; SIEDE, 1995).

Dentre os quase 50 tipos identificados de lesões de base causadas por estresse oxidativo, a lesão 8-oxoG (8-oxoguanina ou 7,8-dihidro-8-oxoguanina, muitas vezes referida como **GO**) é uma das mais abundantes e bem caracterizadas (WOOD et al., 1992). A 8-oxoG é formada em altas quantidades, pela reação de diferentes moléculas oxidantes com o DNA, mas principalmente pelo radical OH. Apresenta propriedades mutagênicas, devido à capacidade de realizar pareamento com a adenina durante a replicação, o que pode resultar, predominantemente, em alta frequência de transversões GC:TA. Altas concentrações de 8-oxoG são encontradas no DNA nuclear e mitocondrial de diferentes tipos de células, embora seus valores basais absolutos, que refletem o balanço entre a geração contínua da lesão e sua remoção, sejam controversos (WOOD et al., 1992).

Em *Escherichia coli*, três diferentes enzimas, que constituem o Sistema GO, cooperam simultaneamente para prevenir a mutagênese espontânea causada pela 8-oxoG: Fpg, MutY e MutT. A enzima Fpg é uma DNA glicosilase bifuncional que reconhece e remove especificamente a lesão 8-oxoG quando pareada a citosina (MICHAELS; MILLER, 1992). Alguns resíduos de 8-oxoG não são reparados por Fpg (ou Ogg1) e persistem no DNA até a próxima replicação. Nesses casos, considerando que polimerases replicativas preferencialmente incorporam adenina frente a 8-oxoG (de 5 a 200 vezes mais frequentemente que citosina), é alta a probabilidade de, em um segundo *round* de replicação, ocorrer uma transversão GC:TA no local da lesão (WOOD et al., 1992). Para minimizar este problema, a glicosilase MutY remove adenina do par 8-oxoG:A (e deve atuar antes do segundo *round* de replicação envolvendo a lesão), gerando um *gap* que será preenchido pelo DNA polimerase. A síntese de DNA durante o reparo normalmente restaura o par 8-oxoG:C (uma vez que a polimerase envolvida no reparo incorpora C, preferencialmente), criando uma nova oportunidade para a retirada de 8-oxoG por Fpg (MICHAELS; MILLER, 1992).

O *pool* de nucleotídeos também é alvo de oxidação e GTPs são atacados por ROS, formando 8-oxodGTPs. Em *E. coli*, em condições de estresse oxidativo, nucleotídeos presentes no *pool* são, na verdade, os principais alvos de oxidação pelo radical OH. Quando 8-oxo-dGTP é erroneamente incorporado frente à adenina no molde de DNA, a ação da glicosilase MutY favorece a fixação da transversão AT:CG, pois remove a base correta do par 8-oxoG:A, a adenina. Dessa forma, é importante que nucleotídeos oxidados, principalmente 8-oxo-dGTPs, sejam eliminados do *pool* de nucleotídeos. Essa função é realizada pela terceira proteína do sistema GO, a hidrolase MutT, que previne a incorporação de 8-oxodGTP no DNA, hidrolisando o trifosfato oxidado a monofosfato (8-oxo-dGMP) (WOOD et al., 1992; EDWARD; YANOFSKY, 1969).

A importância do sistema GO pode ser evidenciada pelo elevado fenótipo mutador apresentado por *E. coli* deficientes nos genes *fpg*, *mutY* e *mutT*. As frequências de transversões GC:TA e AT:GC são até 800 vezes maiores em *E. coli* duplo mutantes *fpg-mutY*- e até 1000 vezes maiores em mutantes *mutT*-, quando comparadas às células selvagens (MICHAELS; MILLER, 1992).

Figura 3 - Sistema GO e as proteínas Fpg, MutY e MutT.

A oxidação do *pool* de nucleotídeos pode gerar 8-oxo-dGTP. Caso 8-oxo-dGTP não seja hidrolisada a 8-oxo-dGMP por MutT, pode ser incorporada frente a A, gerando o par A:GO, substrato de MutY. A ação de MutY remove a base molde (adenina), fixando a mutação AT:GC. 8-oxo-dGTP também pode ser incorporada frente a C, gerando o par C:GO, substrato de Fpg.

Fonte: Adaptado de Slupka, (1996).

1.7 O fenótipo mutador

Apesar de o reparo de DNA ser crucial para a manutenção da integridade genômica em todos os organismos, o surgimento de variação no conteúdo genômico, gerando novos caracteres, que podem permitir maior adaptação a novas condições ambientais, também é essencial para o sucesso evolutivo. Sem mutações, seria impossível alcançar adaptação. A taxa de mutação espontânea em um organismo (expressa em número de mutações por genoma por replicação) é relativamente constante entre diferentes organismos, com diferentes tamanhos de genoma (DRAKE et al., 1998) e reflete o balanço entre os processos químicos e biológicos que geram as mutações e os processos biológicos que suprimem as mutações (GLASSNER; POSNICK; SAMSON, 1998). Esse balanço pode eventualmente ser alterado, promovendo fenótipos mutadores.

Fenótipos mutadores podem ser gerados por um conjunto de fatores como: defeitos em vias de reparo de DNA (MILLER, 1996), elevada exposição a agentes mutagênicos, defeitos na atividade revisora de DNA polimerases, síntese translesão propensa a erros, entre outros. Dentre eles, alterações em mecanismos de controle da fidelidade de replicação do DNA (incluindo a inativação do MMR ou a indução de polimerases propensas a erro) parecem ser os principais responsáveis por aumentos na taxa de mutação e geração de variabilidade (MILLER, 1996).

Um fenótipo mutador pode conferir vantagem seletiva em ambientes adversos, através da maior geração de variabilidade e, portanto, maior adaptabilidade ao meio. No entanto, uma vez que a maioria das mutações são deletérias ou neutras, o acúmulo de mutações indesejadas, promovido por um fenótipo mutador, pode resultar em perda de *fitness*. Dessa forma, quando o ambiente se torna constante, o fenótipo mutador já não é mais favorável à célula adaptada e as células devem, assim, perder a característica mutadora (o que pode ser obtido, por exemplo, através da transferência horizontal de genes). Alternativamente, o próprio estresse ambiental pode ser a fonte de um fenótipo mutador transiente, suficiente para gerar variabilidade justamente no momento em que ela é necessária (DENAMUR; MATIC, 2006). Os mecanismos através dos quais o estresse ambiental aumenta a frequência de mutações são o dano direto no DNA e, principalmente, a indução de respostas globais de tolerância, como a síntese translesão propensa a erros ou a regulação negativa de genes do MMR, através da ativação de respostas SOS.

Técnicas de análise da taxa de mutação já foram descritas para vários organismos (revisado por GATEHOUSE, 1987; GEE et al., 1994; JOSEPHY, 2000). Em *Escherichia coli*,

o ensaio de mutagênese “LacZ” (CUPPLES, 1989), baseia-se na reversão de mutações específicas no gene que codifica para a β -galactosidase, enzima que catalisa a hidrólise de lactose gerando glicose e galactose. As várias linhagens de *E. coli* LacZ⁻ do sistema de Miller contém diferentes mutações que se reverterem por um evento específico de transição, transversão ou *frameshift*. Os revertentes LacZ⁺ são capazes de crescer em meio mínimo contendo lactose como fonte de carbono e assim podem ser selecionados e quantificados em meio sólido. Portanto, este sistema pode ser utilizado para testar diretamente a especificidade da mutação.

Como já sabemos, a replicação cromossômica requer um alto grau de fidelidade, e os estudos em *Escherichia coli* K-12 têm identificado os principais mecanismos pelos quais isso é conseguido. A abordagem experimental utilizada para resolver a questão de fidelidade baseou-se principalmente no isolamento e caracterização das linhagens mutadoras. Um fenótipo mutante é exibido por mutantes que têm uma frequência de mutação espontânea aumentada em relação ao tipo selvagem. A suposição é que essas bactérias são prejudicadas em sistemas que normalmente deveriam corrigir erros de replicação e, em geral, essa hipótese tem sido correta. Levou algum tempo, no entanto, para essa suposição ser comprovada, dado que um dos trabalhos mais relevantes no tema, considerando uma mutação no sistema MMR associado a aumento de resistência em linhagens mutantes de *E. coli* e *Salmonella* foi publicado em 1996 por LeClerc.

Numerosos estudos laboratoriais indicam que mutações que afetam a expressão dos genes do complexo *mut* geram cepas mutadoras em *E. coli*, aumentando portanto as taxas mutacionais e gerando possíveis vantagens adaptativas (HORST, 1999). A grande maioria dos mutadores apresenta defeito nos genes que codificam as proteínas de reparo do methyl-directed mismatch repair (MMR), sistema que corrige a incorporação de bases errôneas na nova fita de DNA. (LI et al., 2003). Em estudos genéticos o termo “taxa de mutação” (conforme definido por LURIA; DELBRUCK, 1943) é aplicado para estimativas da quantidade de mutações que ocorrem por nucleotídeo, por geração em todo genoma, sendo consideradas mutações favoráveis ou não. Diferentemente desse conceito, a frequência de mutação, quantifica os mutantes presentes em uma população, e não a quantidade de eventos mutacionais. (BAQUERO, 2000).

No caso do fenótipo mutador para resistência a antibióticos, a frequência de mutação é definida *in vitro* pela quantidade de mutantes detectáveis em uma população bacteriana quando exposta a uma determinada concentração de antibiótico. (BAQUERO, 2000; TRINDADE, 2010). A frequência espontânea de mutação em bactérias varia em torno de 10^{-9}

e cepas mutadoras apresentam um aumento de 50 a 1000 vezes dessa frequência (CHOPRA; O'NEILL; MILLER, 2003), conforme foi demonstrado em um dos primeiros estudos sobre frequência de mutação, onde os intervalos variaram de 10^{-8} a 10^{-6} em *E.coli* para rifampicina. (LE CLERC et al., 1996).

A emergência de isolados de *E. coli* com fenótipo de múltipla resistência (resistência a 3 ou mais classes de antimicrobianos) é considerada um sério problema de saúde pública. Cepas de *E. coli* K12 naturalmente mutadoras que apresentam o gene *mut* alterado podem apresentar vantagens seletivas, como uma relevante resistência à cefalosporina por meio de alterações da PBP3 (proteína alvo da cefalosporina) pela substituição de 3 ou 4 aminoácidos (MOYA et al., 2009). A alta frequência de cepas mutadoras que apresentam aumento da resistência a antibióticos tem sido frequentemente descrito em cepas patogênicas de *E.coli*, *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Neisseria meningitidis*. (BEGG; HALL, 2006; MILLER et al., 1996), demonstrando que as cepas mutadoras conseguem se adaptar mais rapidamente ao ambiente de *stress* causado pelo antibiótico do que as cepas selvagens, gerando uma seleção que contribui para a emergência de isolados multirresistentes, fato que representa um sério problema para a antibioticoterapia no tratamento das infecções no ambiente hospitalar.

2 OBJETIVO

Esse trabalho tem como objetivo geral verificar a prevalência de linhagens com o fenótipo mutador para antibióticos beta-lactâmicos entre linhagens patogênicas de *E. coli* provenientes de infecções urinárias e intestinais em humanos. O trabalho visou ainda estudar os mecanismos envolvidos na resistência os antibióticos beta-lactâmicos em colônias resistentes derivadas das linhagens mutadoras selecionadas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens bacterianas e condições de crescimento *in vitro*

As linhagens de bactérias utilizadas na triagem inicial compreendem 53 isolados clínicos mantidos na bacterioteca do Laboratório de Genética e Fisiologia de bactérias da USP, sendo 48 provenientes de infecções urinárias (UPEC) e 5 provenientes de infecções intestinais. Foram utilizadas também, como controle positivo, 2 linhagens bacterianas deficientes nos genes *mutY* e *mutS* e 1 linhagem não-mutadora para controle negativo (Tabela 2). As amostras foram semeadas a partir de estoques congelados em placas de Agar *Luria Bertani* (LB) e incubadas por 18 a 24 horas, a 37 °C, para posterior isolamento de colônias.

Tabela 2 - Bactérias utilizadas para triagem inicial deste trabalho

Bactéria	Patótipo	Amostras	Referência
<i>E. coli</i>	UPEC	1 a 16	Bacterioteca laboratório
<i>E. coli</i>	UPEC	19 a 42	Bacterioteca laboratório
<i>E. coli</i>	UPEC	44 a 51	Bacterioteca laboratório
<i>E. coli</i>	EHEC	80	Bacterioteca laboratório
<i>E. coli</i>	EHEC	597	Bacterioteca laboratório
<i>E. coli</i>	EHEC	3003	Bacterioteca laboratório
<i>E. coli</i>	EHEC	61	Bacterioteca laboratório
<i>E. coli</i>	EHEC	79	Bacterioteca laboratório
<i>E.coli</i>	K12	Mut-Y	MILLER, 2002
<i>E.coli</i>	K12	Mut-S	MILLER, 2002
<i>E.coli</i>	K12	MG1655	LI B, 2003

3.2 Antibiograma e caracterização do fenótipo mutador.

3.2.1 Realização do antibiograma pelo método de difusão em disco (Kirby – Bauer)

Foram inoculadas 3 – 4 colônias em meio LB líquido, incubando – o por 6 a 8 horas a 37 °C sob agitação de 200 rpm. A turbidez do crescimento foi ajustada para uma D.O 0,5 – 0,6 (mensurada em 600 nm) para realização do antibiograma. Discos especiais de papel filtro impregnados com concentrações padronizadas de antibióticos são colocados sobre uma placa de Agar *Müeller-Hinton* previamente semeada com a amostra. Após incubação de 18 a 24 horas, a 37 °C, o halo de inibição é medido e interpretado como sensível, resistente ou

intermediário, de acordo com os critérios estabelecidos no *Manual Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI* (antigo NCCLS). Foram utilizados para o teste os seguintes antibióticos beta-lactâmicos em disco: aztreonam (30 mcg), cefalotina (30 mcg), ceftazidima (30 mcg), cefepime (30 mcg), ceftriaxona (30 mcg), cefoxitina (30 mcg), ampicilina (10 mcg), amoxicilina/ac. Clavulânico (30 mcg), piperacilina/tazobactam (30 mcg), ertapenem (10 mcg), meropenem (10 mcg), imipenem (10 mcg). Utilizamos ainda para obter um parâmetro comparativo, antibióticos de classes distintas, em disco, que são geralmente utilizados na clínica no antibiograma para isolados gram – negativos provenientes de ITU: rifampicina (10 mcg), cloranfenicol (30 mcg), ciprofloxacina (5 mcg), norfloxacina (10 mcg), ac. nalidixico (30 mcg), nitrofurantoína (300 mcg), sulfametoxazol/trimetropim (25 mcg), gentamicina (10 mcg), amikacina (30 mcg).

3.2.2 Caracterização do fenótipo matador

Para identificar o fenótipo mutador, verificamos a presença de colônias dentro do halo de inibição de cada antibiótico testado, essas colônias serão denominadas colônias satélites. Isolados/cepas mutadoras com presença de colônias satélites, e, portanto demonstrando aumento de resistência ao antibiótico testado, tiveram sua frequência de mutação calculada.

3.3 Determinação da frequência de mutação para resistência a antibiótico

3.3.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para determinação frequência de mutação é necessário inicialmente determinar a concentração inibitória mínima (CIM). Na determinação do CIM foi utilizado o método quantitativo de determinação em tiras E-test (Probac, São Paulo- SP, Brasil), para os antibióticos cefalotina, ceftazidima e rifampicina. O inóculo, diluição e semeadura foram realizados da mesma forma que no método de disco difusão, seguido da aplicação das tiras nas placas. A gradiente de antibiótico presente nas tiras reflete a uma faixa contínua de concentração, que varia de 0.016 a 256 mcg/ml nas tiras de cefalotina e ceftazidima e de 0.002 a 32 mcg/ml nas tiras de rifampicina. Esta faixa corresponde a 15 diluições num método convencional de CIM. A leitura do CIM foi realizada segundo tabela padronizada pelo fabricante em mcg/ml.

3.3.2 Frequência de mutação

Após obter o CIM das amostras, é necessário realizar a titulação dos isolados/cepas em meio livre de antibiótico e posteriormente com adição do antibiótico a ser testado, parâmetros que serão utilizados para o cálculo da frequência de mutação. Para a titulação sem acréscimo de antibiótico no meio foram inoculadas 3 – 4 colônias em meio LB líquido, incubando – o por 18 a 24 horas a 37 °C sob agitação de 200 rpm. Foi realizada uma diluição seriada em solução salina estéril partindo de alíquotas de 100 mcl da cultura crescida, de forma a obter suspensões diluídas até 10^{-8} . Foram semeadas em placas de LB 100 mcl de cada suspensão bacteriana em duplicata e incubadas por 18 a 24 horas a 37 °C . Foi realizada a contagem de colônias crescidas nas placas equivalente a cada diluição e calculada a média do valor encontrado para cada amostra. Na titulação com acréscimo de antibiótico no meio, o procedimento foi realizado da mesma forma descrita no item anterior, porém nesse caso as placas de LB foram preparadas com concentrações de antibiótico referente a 3 vezes o valor do CIM encontrado para cada amostra. O antibiótico rifampicina foi utilizado como controle positivo (segundo descrito por Le Clerc em 1996, cepas mutadoras apresentam altas frequências para rifampicina, visto que mutações pontuais em apenas um gene - *rpoB* - confere resistência) e os antibióticos cefalotina e ceftazidima foram testados para as cepas que apresentaram fenótipo mutador para esses antibióticos no teste de triagem. As concentrações utilizadas foram definidas conforme descrito na tabela 3.

Tabela 3 - Linhagens selecionados para determinação da frequência de mutação e concentrações de antibiótico utilizadas

Cepa	Rifampicina (mcg)	Cefalotina (mcg)	Ceftazidima (mcg)
MG 1655	18	4,5	1
Mut - Y	36	24	--
Mut - S	18	4,5	--
29	9	6	--
47	12	--	3
32	12	--	36
80	9	8	--

-- não há valores pois isolado não apresentou o fenótipo mutador ou se mostrou resistente ao antibiótico

Os valores de frequência de mutação espontânea foram expressos como o número de mutantes resistentes recuperados como uma fração do total de bactérias viáveis (CHOPRA et al., 2002) descrito na seguinte equação:

$$F = \frac{\text{título em meio c/ antibiótico} \times \text{diluição}}{\text{título em meio s/ antibiótico}}$$

3.4 Busca de bases genéticas para o fenótipo mutador encontrado nas linhagens clínicas de *E. coli*

A identificação de genes codificadores de *mutY*, *mutS* e *mutL* (genes escolhidos dentre o complexo *mut* para identificação por PCR) foi realizada pela reação de polimerase em cadeia (PCR). O DNA bacteriano foi obtido utilizando a metodologia do Kit Wizard (Promega, São Paulo-SP, Brasil) para bactérias gram-negativas. Nas reações de PCR serão utilizados os iniciadores descritos na Tabela 4. A reação foi otimizada utilizando a enzima Pfu DNA polimerase da Promega e posteriormente foi utilizada a enzima Taq DNA polimerase High Fidelity (Invitrogen, Grand Island-NY, USA).

Tabela 4 - Oligonucleotídeos utilizados no PCR

Gene alvo	Sequência	Temperatura
<i>mutY</i> de UPEC	F= 5'gCCCCCAACAACAgTgAATTCgg 3' R= 5'gCTgTAACAAACgCTCCACggg 3'	60,2 °C
<i>mutS</i> de UPEC	F= 5'CgACgCCCATACgCCCAT 3' R= 5' CgATAAATCCACTCCAgC 3'	60,2 °C
<i>mutL</i> de UPEC	F= 5'CCAATTCAggTCTTACCgCC 3' R= 5'ACAgATTgTAACAgACCACCC 3'	56,2 °C
<i>mutY</i> de EHEC	F= 5'AgCgTCgCAATTTTCAGCCC 3' R= 5' gCCAgTgCgTAACTgCTg 3'	60,2 °C
<i>mutS</i> de EHEC	F= 5'CgACgCCCATACgCCCAT 3' R= 5'ACACCAgACTCTTCAggAg 3'	60,2 °C
<i>mutL</i> de EHEC	F= 5' ggTCTTACCgCCACAACtgg 3' R= 5'ATCACTCATCTTTCAgggC 3'	56,2 °C

O produto amplificado de cada reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, usando o marcador molecular de 100 pares de bases (pb) GeneRuler 1kb e corado com *Gel Red Nucleic Acid Stain* e visualizado em UV (312 nm) com auxílio de um transiluminador ultravioleta, sendo foto documentado pelo sistema GelDoc It.

3.5 Seleção de colônias satélites resistentes a beta-lactâmicos e determinação dos valores de CIM para os antibióticos cefalotina ou ceftazidima a partir das linhagens mutadoras

Para obtenção das colônias satélites foi realizado um antibiograma, conforme técnica descrita abaixo, utilizando as linhagens mutadoras e antibióticos descritos na tabela 2. Foram inoculadas colônias em meio LB líquido, incubadas por 6 a 8 horas a 37 °C sob agitação de 200 rpm. A turbidez do crescimento foi ajustada para uma D.O 0,5 – 0,6 (mensurada em 600 nm) para realização do antibiograma. Discos especiais de papel filtro impregnados com concentrações padronizadas de antibióticos são colocados sobre uma placa de Agar *Müller-Hinton* previamente semeada com a amostra. Após incubação de 18 a 24 horas, a 37 °C, colônias satélites foram retiradas de dentro do halo (demonstrado na figura 1) de inibição as para prosseguirmos com o estudo. Seleccionamos 20 colônias satélites de dentro de cada halo para posterior determinação do CIM para os antibióticos cefalotina ou ceftazidima. Para a determinação do CIM, o antibiótico foi diluído em 200 mcl de meio LB em diferentes concentrações, utilizando placas de 96 poços. A concentração inicial de antibiótico em todos os casos foi igual ao valor de CIM já conhecido do isolado original.

Tabela 5 – Antibióticos empregados no isolamento de colônias resistentes a beta-lactâmicos

Cepa	Antibiótico
Mut - Y	Cefalotina
Mut - S	Cefalotina
29	Cefalotina
47	Ceftazidima
80	Cefalotina
32	Ceftazidima

3.6 Determinação da natureza da resistência aos beta-lactâmicos em clones derivados das linhagens mutadoras (testes de natureza da mutação)

Os testes de natureza da mutação foram divididos em 2 grandes grupos: testes fenotípicos de produção de enzimas beta-lactamases e testes para avaliação de permeabilidade de membrana. A utilização dessas técnicas visa verificar 2 dos 3 mecanismos de resistência que atuam contra os antibióticos beta-lactâmicos (produção de enzimas beta-lactamases e alteração de permeabilidade de membrana).

3.6.1 Testes fenotípicos de produção de enzimas beta – lactamases

Para avaliar a possível produção de enzimas beta-lactamase, realizamos o teste clínico de aproximação de discos (CLSI, 2011), sendo esse teste dividido em 3 métodos:

- aproximação utilizando discos de EDTA, imipenem (IPM) e meropenem (MPM) - Utilizado para detecção de enzimas metallo – beta lactamase
- aproximação utilizando discos de Amoxicilina/Ac. Clavulânico (AMC), aztreonam (ATM), ceftriaxona (CRO), ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX) - Utilizado para detecção de enzimas beta-lactamase de amplo espectro (ESBL)
- aproximação utilizando discos de cefoxitina (CFO) e aztreonam (ATM) -Utilizado para detecção de Amp C. (DALMARCO, 2006)

Os testes foram realizados seguindo o mesmo procedimento já descrito para realização de antibiograma por disco difusão. De cada isolado, foram testadas 3 clones resistentes a cefalotina ou ceftazidima além da colônia original (sem aumento da resistência). Os clones utilizados nessa etapa foram definidos após a determinação do CIM no item anterior, sendo esses representantes das faixas de CIM encontradas.

Tabela 6 - Colônias utilizadas para determinação da natureza da mutação

Linhagem	Colônia	antibiótico
MutY	Original	Cefalotina
MutY	1	Cefalotina
MutY	7	Cefalotina
MutY	8	Cefalotina
MutS	Original	Cefalotina
MutS	4	Cefalotina
MutS	9	Cefalotina
MutS	10	Cefalotina
47	Original	Ceftazidima
47	14	Ceftazidima
47	18	Ceftazidima
47	5	Ceftazidima
32	Original	Ceftazidima
32	2	Ceftazidima
29	Original	Cefalotina
29	2	Cefalotina
29	7	Cefalotina
29	10	Cefalotina
80	Original	Cefalotina
80	4	Cefalotina

3.6.2 Testes para avaliação de permeabilidade de membrana

Os testes para avaliação de permeabilidade de membrana, foi realizado utilizando o corante Cristal violeta (C.V) em 2 testes distintos:

3.6.2.1 Avaliação da resistência ao cristal violeta

Foi realizado um MIC com cristal violeta diluído em LB, em placa com 96 poços. As concentrações de C.V variaram de 0,07 mcg a 26 mcg/ml, com o propósito de determinar a concentração de C.V a ser utilizada no experimento seguinte e avaliar a resistência a C.V nas amostras estudadas.

3.6.2.2 Teste de captação do cristal violeta (C.V)

As colônias foram crescidas O/N em 6 ml de LB e alíquotadas em 2 partes distintas, sendo o tubo 1 para mensurar D.O (590nm) antes de acrescentar o CV (alíquota branco) e o tubo 2 o teste a 37 °C, (conforme descrito por GUSTAFSSON et al., 1973) O tubo 2 foi incubado por 15 minutos a 37°C e em seguida foi acrescentada o C.V a uma concentração final de 10mcg/ml e incubado novamente por mais 15 minutos. A D.O dos tubos acrescidos de C.V foi mensurada utilizando o tubo 1 como branco, obtendo assim valores de absorbância para o C.V em cada amostra. As amostras foram centrifugadas a 4.500 rpm a 4°C por 15minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o pellet bacteriano resuspendido em 2 ml de PBS 1x acrescido de lisozima a (concentração final de 800 mcg/ml) e os tubos foram incubados a 37°C por 30 minutos. Após esse procedimento foi acrescentado a amostra o detergente SDS (concentração final de 1% do volume total) e novamente incubado a 37°C por 15 minutos. O tratamento do pellet com PBS/lisozima e SDS foi realizado com a intenção de promover a lise das células e dessa forma liberar todo o conteúdo de C.V que foi internalizado. (GUSTAFSSON et al., 1973; GUYMON; SPARLING). Após o segundo período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos e sobrenadante teve a D.O mensurada. O percentual de C.V captado pela célula foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$\frac{\text{D.O sobrenadante (pós lise celular)} \times 100}{\text{D.O tubo com C.V (descontado branco)}} = \text{C.V captado pela célula}$$

4 RESULTADOS

4.1 Antibiograma e caracterização do fenótipo mutador

Realizamos o antibiograma das 53 cepas testadas (48 amostras de UPEC e 5 entéricas) para 21 antibióticos, sendo 12 diferentes beta-lactâmicos e determinamos o fenótipo mutador (figura 4) pela presença de colônias satélites nos halos de inibição de antibióticos para os quais uma determinada linhagem tenha se mostrado sensível. Das 53 cepas testadas, 8 foram positivas para o fenótipo mutador para 1 ou mais antibióticos, representando 15% do total de cepas testadas. Das linhagens mutadoras identificadas, 6 apresentam o fenótipo para RIF (11,3%), 3 para ATM (5,6%), 4 para CFL (7,5%), 2 para CAZ (3,7%), 2 para CPM (3,7%), 1 para CRO (1,8%) e 1 para CTX (1,8%) (Figura 5).

Figura 4 – Fenótipo mutador

Presença de colônias satélites em amostras bacterianas com potencial fenótipo mutador. Colônias satélite nos halos do antibiotico cefalotina na cepa controle MutY (A); colônias satélite no halo do antibiotico ceftazidima no isolado 32 (B); colônias satélite nos halos do antibiotico cefalotina no isolado 29 (C); colônias satélite no halo do antibiotico cefalotina na cepa 80 (D).

Figura 5 – Detecção do fenótipo mutador

Dentre 53 isolados. Foi observado a presença de colônias satélite em 6 dos 12 antibióticos testados, sendo que o percentual de isolados com fenótipo variou de 1,8% para cefotaxima e ceftriaxona a 11,3% para rifampicina.

Das 8 amostras com fenótipo mutador positivo, 6 são isolados de UPEC (amostras 7, 28, 29, 30, 32 e 47) e 2 cepas de EHEC (79 e 80). Na tabela 6 são apresentados os resultados dos antibiogramas feitos com as linhagens identificadas como mutadoras. Todos os isolados de UPEC com fenótipo mutador foram resistentes para 2 ou mais antibióticos e os 2 isolados entéricos resistentes para apenas 1 antibiótico. O antibiótico rifampicina também foi selecionado para caracterizar o efeito mutador das linhagens selecionadas. Como controles positivos foram utilizados linhagens de *E. coli* K12 deficientes nos genes *mutY* ou *mutS* e a linhagem MG1655 (linhagem isogênica selvagem da linhagem Mut-S). As linhagens mutadoras apresentaram colônias satélites nos halos de inibição formados pelos antibióticos rifampicina e cefalotina. Não foram observadas colônias satélites nos halos de inibição dos antibióticos cloranfenicol, ciprofloxacina, e norfloxacina em nenhuma das linhagens testadas.

Tabela 7- Padrão de resistência aos antibióticos para os quais foram detectados o fenótipo mutador.

Cepas	Padrão de resistência** (diâmetro do halo de inibição em mml)						
<i>UPEC</i>	RIF	ATM	CFL	CAZ	CPM	CRO	CTX
7	11*	S- 30*	S-21	S-27	S-29	S-30	S-30
28	9*	S-27	I -15*	S-25	S-28	S-29	S-30
29	9*	S-28	S-20*	S-27	S-30	S-27	S-25
30	R	S-30	R-13*	S-25	S-28	S-27	S-29
32	10*	R-12*	R	I-14*	R-12*	R	R
47	12*	I-15*	R	S-22*	I-17*	I-16*	I-17*
<i>Intestinais</i>							
80	9*	S-30	S-16*	S-27	S-30	S-29	S-30
79	17*	S-32	S-18	S-29	S-32	S-31	S-32
<i>Controle</i>							
Mut– S	11*	S-29	S-20*	S-28	S-30	S-35	S-32
Mut - Y	13*	S-28	S-22*	S-25	S-30	S-33	S-31
MG1655	12	S-30	S-21	S-29	S-31	S-32	S-30

*Presença de colônias satélites no halo (fenótipo mutador positivo)

** S = sensível, I = intermediário, R = resistente (o antibiótico rifampicina não tem padronização clínica de perfil em cepas gram negativas; amostras com perfil apenas ‘R’ não apresentaram halo e são consideradas resistentes)

4.2 Determinação da frequência de mutação espontânea nas linhagens mutadoras

Dentre os isolados com fenótipo mutador positivo, selecionamos os isolados 29, 32 e 47 (UPEC) e a cepa 80 (EHEC), em conjunto com os antibióticos cefalotina ou ceftazidima e rifampicina (controle) para prosseguirmos com o trabalho e análise do fenótipo mutador.

Para a quantificação da frequência de mutação espontânea, foi necessário inicialmente determinar os valores de CIM para os diferentes antibióticos que revelaram o fenótipo mutador para as amostras selecionadas, com o propósito de estabelecer as concentrações seletivas a serem utilizadas para a determinação das frequências de mutação espontânea. Os valores obtidos de CIM foram compatíveis ao esperado em relação aos perfis e diâmetros estabelecidos no teste de disco difusão (tabela 8 e figura 6).

Figura 6- Determinação do CIM utilizando tiras de E-test

Na figura determinação do CIM para cefalotina na cepa controle MutY.

Tabela 8 - Valores de CIM (expressos em µg / ml) para o antibiótico rifampicina, cefalotina e ceftazidima por meio de E-test

Linhagens	Classificação	Rifampicina	Cefalotina	Ceftazidima
7	UPEC	3	1,5	0,032
29	UPEC	6	6	0,125
30	UPEC	2	2	0,032
32	UPEC	4	8	0,125
47	UPEC	4	>256	12
80	EHEC	3	128	1
79	EHEC	1	4	0,094
Mut - S	K12	6	4	0,064
Mut - Y	K12	12	1,5	0,064
MG1655	K12	6	8	0,19

Foram utilizadas tiras de rifampicina com gradiente de 0.002 a 32 mcg/ml e tiras de cefalotina e ceftazidima com 0.016 a 256 mcg/ml)

Os testes com cefalotina indicaram uma grande variação do CIM entre as linhagens testadas (Tabela 7). Em relação à rifampicina, observamos um alto índice de positividade para a formação de colônias satélites entre as cepas testadas para esse antibiótico. Os testes com

ceftazidima indicaram que a linhagem 47 apresentou valor de CIM mais elevado em relação às outras linhagens analisadas.

Partindo das observações obtidas com os testes de antibiograma e determinação do CIM, selecionamos as linhagens que o fenótipo mutador nos ensaios qualitativos para o maior número de antibióticos testados. A linhagem 29, pelos padrões do CLSI apresenta sensibilidade à cefalotina e fenótipo mutador para os antibióticos rifampicina e cefalotina, as linhagens 32 e 47 que responderam com presença de colônias satélites para uma variedade de beta-lactâmicos e a linhagem 80, representante de um isolado intestinal, que respondeu para cefalotina. As linhagens Mut-S e Mut-Y foram utilizadas como controles positivos, e a linhagem MG1655 como controle negativo.

4.2.1 Cálculos da frequência de mutação espontânea

Os cálculos para frequência de mutação espontânea para resistência aos diferentes antibióticos testados foram realizados levando em consideração os valores de CIM de cada cepa. Para definir as concentrações de antibiótico utilizadas no teste, foram padronizadas em 3 vezes o valor do CIM para cada antibiótico (rifampicina, cefalotina e ceftazidima). (Tabela 8).

Tabela 9 - Cálculo da frequência de mutação espontânea para rifampicina.

Linhagens	CIM	Concentração antibiótico (mcg/ml)	Frequência de mutação
MG1655	6 µg / ml	18	2×10^{-9}
Mut - Y	12 µg / ml	36	4×10^{-7}
Mut - S	6 µg / ml	18	5×10^{-7}
29	6 µg / ml	18	$3,5 \times 10^{-6}$
47	4 µg / ml	12	$2,1 \times 10^{-5}$
32	4 µg / ml	12	$3,1 \times 10^{-5}$
80	3 µg / ml	9	4×10^{-7}

Figura 7 - Aumento da frequência de mutação espontânea para resistência ao antibiótico rifampicina em relação ao controle negativo MG1655

Estabelecidas as condições de ensaio, observamos que nas duas linhagens deficientes em genes *mut* ocorreu um aumento de 100 vezes da frequência de mutação espontânea para resistência à rifampicina em relação à linhagem MG1655. No isolado 29 observou-se um aumento de 1000 vezes na frequência espontânea de mutação em relação à linhagem MG1655, e aumento de 10 vezes em relação às linhagens MutY e MutS. O isolado 80 apresentou um aumento de 100 vezes na frequência de mutação espontânea para resistência à rifampicina quando comparado à MG1655 e nenhuma diferença em relação às linhagens MutY e MutS. Os isolados 47 e 32 apresentaram as maiores frequências de mutação espontânea para a rifampicina com aumento de 10.000 vezes em relação à MG1655 e aumento de 100 vezes em relação às linhagens MutY e MutS (figura 7).

Tabela 10 - Frequência de mutação espontânea para cefalotina para as linhagens 29 e 80 de *E. coli*

Linhagens	CIM	Concentração antibiótico (mcg)	Frequência de mutação
Mg1655	1,5 µg / ml	4,5	$5,2 \times 10^{-9}$
Mut - Y	8 µg / ml	24	6×10^{-7}
Mut - S	1,5 µg / ml	4,5	$2,1 \times 10^{-6}$
29	2 µg / ml	6	8×10^{-7}
80	4 µg / ml	12	$8,2 \times 10^{-7}$

Figura 8 - Aumento relativo da frequência de mutação espontânea para resistência ao antibiótico cefalotina nas linhagens de *E. coli* 29 e 80 em relação à linhagem MG1655.

Em relação ao antibiótico cefalotina, as linhagens 29 e 80 apresentam frequência de mutação espontânea aumentada em relação a linhagem não mutadora. As linhagens controle deficientes nos genes *mutY* ou *mutS* também apresentaram fenótipo mutador frente a esse antibiótico. Podemos observar na linhagem MutY um aumento de 100 vezes da frequência de mutação e na linhagem MutS um aumento de 1000 vezes em relação à linhagem MG1655. Nas linhagens 29 e 80 observou-se aumento de 100 vezes na frequência de mutações espontâneas para resistência ao antibiótico em relação à linhagem MG1655, com valores equivalente ao encontrado com a linhagem MutY mas, em ambos os isolados, valores 10 vezes menores do que aqueles detectados com a linhagem Mut-S. (Figura 8)

Tabela 11- Cálculo da frequência de mutação espontânea para ceftazidima para as linhagens 32 e 47

Linhagem	CIM	Concentração antibiótico (mcg)	Frequência de mutação
MG1655	0,064 µg / ml	1	1×10^{-9}
32	12 µg / ml	24	$6,8 \times 10^{-5}$
47	1 µg / ml	3	$1,2 \times 10^{-6}$

Figura 9- Aumento relativo da frequência de mutação espontânea para resistência ao antibiótico ceftazidima nas linhagens de *E. coli* 32 e 47 em relação à linhagem MG1655.

Podemos observar no isolado 32 um aumento de 10.000 vezes da frequência de mutação espontânea em relação à linhagem MG1655 enquanto que no isolado 47 o aumento observado foi de 1000 vezes (figura 6). As cepas MutY e MutS não apresentaram fenótipo mutador para ceftazidima, portanto não se encontram na tabela acima.

4.3 Busca de bases genéticas para o fenótipo mutador encontrado nas linhagens clínicas de *E. coli*

Na busca de alterações genéticas que explicassem o fenótipo mutador expresso pelas linhagens de *E.coli* selecionadas amplificamos os genes *mutS*, *mutY* e *mutL* com material genético das linhagens e iniciadores específicos para os genes encontrados em *E. coli* K12. A

amplificação dos 3 genes nas linhagens 29, 32, 47 e 80 resultou na detecção de bandas com tamanho esperado: a banda de *mutY* com 1.055 pb, *mutS* com 2.523 pb e *mutL* com 1.805 pb (Figura 10). Todos os genes foram amplificados sem demonstrar evidências de deleções.

Figura 10- PCR para genes *mutY* e *mutS*.

Podemos observar as bandas correspondente ao gene *mutS* amplificada a partir do DNA dos isolados 29 (poços 2 e 3), 32 (poços 6 e 7) e 47 (poços 10 e 11). A banda de *mutY* aparece na altura de aproximadamente de 1000 pb, amplificada a partir do DNA dos isolados 29 (poços 4 e 5), 32 (poços 8 e 9) e 47 (poços 12 e 13).

4.4 Caracterização dos mecanismos de resistência em colônias satélites derivadas de linhagens mutadoras após seleção com antibióticos beta-lactâmicos (cefalotina e ceftazidima)

Nessa etapa, procuramos identificar os possíveis mecanismos que levariam à resistência aos beta-lactâmicos empregados na identificação das linhagens mutadoras de *E. coli*. Para tal finalidade, realizamos inicialmente a determinação do CIM para os antibióticos cefalotina ou ceftazidima para 20 colônias satélites isoladas a partir do halo inibição desses antibióticos nas linhagens que apresentaram o fenótipo mutador para esses antibióticos. Dentre as 20 colônias testadas de cada linhagem verificamos que havia colônias que apresentavam valores de CIM iguais ou muito próximos, por esse motivo separamos as colônias por faixas de CIM, como indicado nas figuras de 11 a 16.

Figura 11- Faixas de CIM encontrada nas colônias satélites derivadas da linhagem *mutY* de *E. coli* K12 após seleção com cefalotina. Valor de CIM da linhagem original: 8µg

Conforme demonstrado na figura 11, dentre as 20 colônias da linhagem MutY testadas, 7 apresentaram valores de CIM na faixa de 18 a 30 mcg/ml, 7 apresentaram valores de CIM na faixa de 35 a 55 mcg/ml e 6 apresentaram valores de CIM de 230 mcg/ml.

Figura 12- Faixas de CIM encontrada nas colônias satélites derivadas da linhagem *mutS* de *E. coli* K12 após seleção com cefalotina. Valor de CIM da linhagem original: 1,5 µg

Conforme demonstrado na figura 12, dentre as 20 colônias de MutS testadas, 7 apresentaram valores de CIM na faixa de 18 a 35 mcg/ml, 8 apresentaram valores de CIM na faixa de 40 a 60 mcg/ml e 5 apresentaram valores de na CIM faixa de 65 a 80 mcg/ml.

Figura 13- Faixas de CIM encontrada nas colônias satélites derivadas da linhagem *E. coli* 47 após seleção com ceftazidima. Valor de CIM da linhagem original: 1 µg

Conforme demonstrado na figura 13, dentre as 20 colônias do isolado 47 testadas, 1 apresentou valor de CIM na faixa de 6 mcg/ml, 12 apresentaram valores de MIC na faixa de 12 mcg/ml e 7 apresentaram valores de CIM na faixa de 25 mcg/ml.

Figura 14- Faixas de CIM encontrada nas colônias satélites derivadas da linhagem *E. coli* 32 após seleção com ceftazidima. Valor de CIM da linhagem original: 12 µg

Conforme demonstrado na figura 14, todas as 20 colônias do isolado 32 testadas apresentaram valores de CIM na faixa de 1000 mcg/ml.

Figura 15- Faixas de CIM encontrada nas colônias satélites derivadas da linhagem *E. coli* 29 após seleção com cefalotina. Valor de CIM da linhagem original: 2 µg

Conforme demonstrado na figura 15, dentre as 20 colônias do isolado 29 testadas, 5 apresentaram valores de CIM na faixa de 9 a 35 mcg/ml, 10 apresentaram valores de CIM na faixa de 55 a 200 mcg/ml e 5 apresentaram valores de CIM na faixa de 230 mcg/ml.

Figura 16- Faixa de CIM encontrada nas colônias satélites derivadas da linhagem 80 de *E. coli* O157:H7 após seleção com cefalotina. Valor de CIM da linhagem original: 4 µg

Conforme demonstrado na figura 16, dentre as 20 colônias da cepa 80 testadas, 3 apresentaram valores de CIM na faixa de 30 mcg/ml, 6 apresentaram valores de CIM na faixa de 35 mcg/ml e 11 apresentaram valores de MIC na faixa de 40 mcg/ml. Dentre as 20 colônias – satélites de cada isolado/cepa selecionamos 1 a 2 representantes de uma mesma faixa de CIM (tabela 12) que serão utilizadas para prosseguirmos com os testes de natureza de mutação nos itens a seguir.

Tabela 12- Colônias satélites dos halos de inibição da cefalotina ou ceftazidima, e suas respectivas faixas de CIM

Linhagens	Representante faixa	CIM
MutY	Colônia original	8
MutY	I	30
MutY	II	55
MutY	III	230
MutS	Colônia original	1,5
MutS	I	18
MutS	II	60
MutS	III	80
47	Colônia original	1
47	I	6
47	II	12
47	III	25
32	Colônia original	12
32	I	1000
29	Colônia original	2
29	I	9
29	II	35
29	III	230
80	Colônia original	4
80	I	30 a 40

Para realizarmos as análises posteriores voltadas para a caracterização dos mecanismos envolvidos na resistência aos beta-lactâmicos expressa em colônias derivadas das linhagens mutadoras testadas, selecionamos um isolado de cada faixa de CIM identificada. Tal escolha baseou-se no fato que, dependendo do mecanismo envolvido, os valores de CIM para cada antibiótico seriam diferentes. Por exemplo, linhagens resistentes a beta-lactâmicos por alteração de permeabilidade do envoltório expressariam valores de CIM inferiores àqueles que expressassem níveis aumentados de beta-lactamase codificada por genes cromossômicos. Na tabela 10, mostramos os respectivos aumentos nos valores de CIM das linhagens selecionadas em relação à linhagem mutadora parental. Dentre as colônias derivadas da linhagem MutY, na qual o CIM original é de 8 mcg/ml para cefalotina, podemos verificar que o CIM variou de 30 a 230 mcg/ml, representando um aumento aproximado de 8 a 28 vezes da resistência à cefalotina nessas colônias. Dentre as colônias derivadas da cepa MutS, na qual o CIM original é de 1,5 mcg/ml para cefalotina, podemos verificar que o CIM variou de 18 a

80mcg/ml, representando um aumento aproximado de 12 a 53 vezes da resistência à cefalotina nessas colônias. Na linhagem 47 que foi testado para ceftazidima, o CIM original é de 1 mcg/ml nas colônias satélites selecionadas o CIM variou de 6 a 25 mcg/ml, representando um aumento de 6 a 25 vezes da resistência à ceftazidima. A linhagem 32, também testado para ceftazidima, tem o CIM original de 12 mcg/ml, a colônia satélite selecionada apresentou CIM superior a 1000 mcg/ml, representando um aumento superior a 83 vezes na resistência. A linhagem 29, testado para cefalotina, apresenta um CIM original de 2 mcg/ml. Selecionamos um isolado de cada faixa de resistência encontrada que apresentaram em termos de CIM valores entre 4 a 115 vezes superiores ao da linhagem original. Por último, escolhemos um isolado derivados da linhagem 80, originalmente com CIM para cefalotina de 4mcg/ml, com valores de CIM em torno de 10 vezes superiores ao da linhagem parental

4.5 Determinação dos mecanismos envolvidos na resistência à cefalotina ou a ceftazidima nos isolados derivados das linhagens mutadoras

Existem 3 possíveis mecanismos principais de resistência que afetam a ação dos antibióticos beta-lactâmicos, sendo eles: produção de beta-lactamase, redução da permeabilidade do envoltório celular e alteração de alvo (PBPs- proteínas ligadoras de penicilina). Para determinar a natureza das mutações encontradas e possíveis causas do aumento de resistência realizamos testes fenotípicos para verificar 2 dos 3 mecanismos de resistência (produção de beta-lactamase e redução da permeabilidade do envoltório). Para os testes a seguir foram utilizados os clones descritos na tabela 12.

4.5.1 Produção de beta-lactamases nos isolados obtidos

Foram realizados testes de aproximação de discos (tabela 13), sendo os discos de EDTA/imipenem/meropenem para verificar a possível produção de Metallo-beta lactamases, no qual quando positivo ocorre um alargamento do halo entre os carbapenêmicos e o EDTA. Também foram empregados discos de amoxicilina/ácido clavulânico em conjunto com discos contendo cefalosporinas e/ou aztreonam para verificar possível produção de beta-lactamases de amplo espectro (ESBL) (Figura 17). O clavulanato é um inibidor de beta-lactamases, logo em um teste positivo observa-se um alargamento do halo entre o clavulanato e os beta-

lactâmicos. Por fim, realizamos testes para a detecção da produção da beta-lactamase AmpC realizado com discos de cefoxitina e aztreonam e o clavulanato. (DALMARCO, 2006).

Figura 17- Teste de aproximação positivo para ESBL

Podemos observar zona de alargamento de halo na colônia do isolado 29 (A) e fenômeno da formação de zona fantasma no isolado 32 (B).

Tabela 13- Detecção de produção de beta-lactamases em isolados resistentes derivados de linhagens mutadoras de *E. coli*

Linhagem	Colonia representante faixa de MIC	Metallo beta lactamase	ESBL	Amp C
MG 1655	Original	Negativo	Negativo	Negativo
MutY	Original	Negativo	Negativo	Negativo
MutY	I	Negativo	Negativo	Negativo
MutY	II	Negativo	Negativo	Negativo
MutY	III	Negativo	Negativo	Negativo
MutS	Original	Negativo	Negativo	Negativo
MutS	I	Negativo	Negativo	Negativo
MutS	II	Negativo	Negativo	Negativo
MutS	III	Negativo	Negativo	Negativo
47	Original	Negativo	Negativo	Negativo
47	I	Negativo	Negativo	Negativo
47	II	Negativo	Negativo	Negativo
47	III	Negativo	Positivo	Negativo
32	Original	Negativo	Negativo	Negativo
32	I	Negativo	Positivo	Negativo
29	Original	Negativo	Negativo	Negativo
29	I	Negativo	Negativo	Negativo
29	II	Negativo	Negativo	Negativo
29	III	Negativo	Negativo	Negativo
80	Original	Negativo	Negativo	Negativo
80	I	Negativo	Negativo	Negativo

Conforme esperado, a linhagem MG1655 (controle negativo) e as linhagens MutY e MutS (controles positivos) não apresentaram resultados que indicam produção de beta-

lactamases. As linhagens MutY e MutS apresentam defeito nos genes *mutY* e *mutS*, respectivamente, são conhecidamente mutadoras e não produtoras de beta-lactamases. Podemos verificar nos dados acima que apenas os isolados 47 e 32 apresentaram colônias com indicativo de aumento na expressão de beta-lactamase do tipo ESBL, sendo que a linhagem original não expressa esse traço. Nesse caso podemos ter mutações espontâneas sofridas por esses isolados que levariam a um aumento na expressão de genes que codificam para essas enzimas, mas que permaneceriam silenciosos nas linhagens originais.

4.5.2 Teste de resistência ao Cristal violeta (C.V.)

O CV é letal para linhagens de *E. coli* em determinadas concentrações. Linhagens que apresentem valores de CIM elevados, em geral, apresentam alterações de permeabilidade do envoltório que impedem a entrada do corante na célula (Gustafsson et al., 1973). Em primeiro lugar, determinamos os valores de CIM para o CV. nas linhagens mutadoras. Como mostrado na Tabela 12, os valores de CIM para o CV variaram entre 10 e 14 mcg/ml entre as diferentes linhagens mutadoras. Nenhum dos isolados resistentes a beta-lactâmicos derivados das linhagens mutadoras apresentou valores de CIM para o C.V. superior a 14. Desta forma, nenhum dos clones resistentes a beta-lactâmicos derivados de linhagens mutadoras aparenta ter alterações de permeabilidade no envoltório que poderiam contribuir para o aumento nos valores de CIM para os antibióticos beta-lactâmicos testados.

Encontramos valores de CIM entre 10 e 14 mcg nas colônias testadas, e a concentração padronizada para uso no teste seguinte foi de 10 mcg/ml.

Tabela 14- Concentração inibitória mínima para Cristal violeta

Isolado/cepa	Colônia representante faixa de MIC	MIC
MutY	Colônia original	12
MutY	I	14
MutY	II	14
MutY	III	12
MutS	Colônia original	12
MutS	I	14
MutS	II	14
MutS	III	12
47	Colônia original	10
47	I	11
47	II	12
47	III	11
32	Colônia original	12
32	I	12
29	Colônia original	12
29	I	12
29	II	12
29	III	12
80	Colônia original	10
80	I	12

4.5.3 Teste de captação do cristal violeta (C.V) – verificação de permeabilidade de membrana

Outro ensaio feito para avaliar possíveis alterações de permeabilidade do envoltório celular foi o teste de captação do CV que tem por objetivo verificar qual o percentual de um composto que a célula consegue captar do meio. A cepa MG 1655 foi utilizada como controle negativo e apresentou um alto percentual de absorção do C.V.

Tabela 15- Detecção de possíveis alterações na permeabilidade do envoltório celular de isolados de *E. coli* por medição da captação do CV

Isolado/cepa	Colônia	% C.V captado	Desvio padrão
MG1655	Original	34,6	1,6
MutY	Original	29,4	5,3
MutY	I	26,2	5,7
MutY	II	24,6	5,8
MutY	III	16	1,4
MutS	Original	30,1	2,8
MutS	I	28,1	7,7
MutS	II	20,9	0,5
MutS	III	27	5,5
47	Original	23,7	1,2
47	I	29,7	7,3
47	II	28,3	4,7
47	III	17,1	1,3
32	Original	21,2	3,1
32	I	23	4
29	Original	26	5,6
29	I	32,9	4,1
29	II	25,1	4,4
29	III	18,1	0,7
80	Original	32,9	4,8
80	I	24,9	0,2

Considerando os valores encontrados, verificamos que em relação ao controle negativo MG1655, as colônias originais das duas linhagens controles MutY e MutS conhecidamente mutadoras, apresentam percentuais de absorção próximo ao de MG1655.. A colônia representante da faixa de CIM III da cepa MutY, apresenta um percentual baixo em relação à linhagem controle MG1655, fato que pode decorrer de uma alteração na permeabilidade. A linhagem 47 apresentou baixo percentual na colônia representante da faixa de CIM III, podendo caracterizar uma baixa permeabilidade, enquanto as outras colônias e linhagem original apresentam valores próximos acima de 50% do valor do controle negativo. A linhagem 32 teve alta permeabilidade para todas as colônias, e podemos, portanto, considerar que o mecanismo de resistência atuando não depende exclusivamente de redução

de permeabilidade. A linhagem 29, verificamos um percentual baixo de absorção na colônia representante da faixa de CIM III, podendo caracterizar redução de permeabilidade; e na linhagem 80 todos os valores se mostraram próximos ao de MG1655, não consideramos então como resistência por permeabilidade.

5 DISCUSSÃO

O mecanismo de adaptabilidade é dependente de duas forças opostas, sendo elas a manutenção da informação genética e alterações que promovam variabilidade genética e consequentemente seleção de organismos. Na maioria dos casos, a variação genética ocorre na presença de erros durante a replicação do DNA que não são corrigidos pelos mutador em geral resulta de alterações nos genes participantes do complexo *mut*, envolvido com dois sistemas pós-replicativos de reparo: MMR e reparo oxidativo. (DENAMUR, 2006).

A identificação do fenótipo mutador foi primeiramente realizada analisando o halo de inibição dos antibióticos após realização do antibiograma. A presença de colônias satélites dentro do halo de inibição, onde a concentração de antibiótico é maior, indica que essas colônias são mais resistentes do que toda população e podem apresentar valores diferenciados de MIC entre si. Foram testados antibióticos de classes distintas que são utilizados na rotina clínica incluindo os antibióticos beta – lactâmicos, usualmente não são utilizados em estudos voltados para a caracterização do fenótipo mutador em linhagens bacterianas isoladas de amostras clínicas. Em outros estudos, como o trabalho descrito por Miller e colaboradores em 2002, foi observado o fenótipo mutador para quinolonas (entre outros antibióticos) em linhagens de *E. coli*. No nosso estudo não encontramos linhagens positivas para antibióticos desse grupo. O diferente comportamento de linhagens consideradas mutadoras frente a diferentes antibióticos testados pode refletir na natureza da alteração genética que resulta no fenótipo mutador, possibilidade que deverá ser avaliada durante a conclusão dos experimentos previstos para esta tese.

Na literatura tem sido relatada a ocorrência de linhagens bacterianas mutadoras com altos níveis de resistência a antibióticos de classes distintas, com frequência de mutação variando entre 100 e 1000 vezes superior a encontrada em linhagens não mutadoras (LECLERC, 1996). Nossos resultados mostraram isolados patogênicos com elevadas frequências de mutação espontânea para os antibióticos cefalotina e ceftazidima, variando entre 100 e 10.000 em relação ao controle a linhagem MG1655. A presença de alterações em genes *mut* está estreitamente relacionada ao aumento da frequência de mutações espontâneas nesses isolados e pode ter um reflexo importante na adaptabilidade dessas cepas quando exposta aos antibióticos no meio (MILLER et al., 2004).

Deve ser destacado que estudos de mesma natureza realizados anteriormente com diferentes espécies de bactérias empregaram antibióticos de diversas classes, porém não relacionados aos beta-lactâmicos ou cefalosporinas, como as duas cefalosporinas (cefalotina e

ceftazidima) estudadas no presente estudo. Trata-se, portanto, do primeiro relato de mutadores para antibióticos dessas categorias químicas. Deve ser lembrado que a resistência aos antibióticos beta-lactâmicos pode estar relacionada a mutações que levam à alteração ou perda de porinas (redução da permeabilidade), alteração do alvo de ação (PBPs) ou a produção de beta-lactamases (CHOPRA et al., 2003).

Verificamos também que os valores de MIC das colônias satélites estão aumentados em relação aos isolados originais. Conforme demonstrado no presente relatório, houve um aumento de resistência (valores de MIC) variando de 8 a 53 vezes nas linhagens MutY e MutS e variando de 6 a 115 vezes entre as colônias dos isolados estudados, demonstrando que as colônias satélites apresentam diferentes mecanismos que levam à resistência aos beta-lactâmicos. No isolado 32 verificamos o maior valor de MIC que chegou a 1000 mcg em todas as colônias testadas, o que corresponde ao aumento da expressão de beta-lactamases em todas as colônias examinadas.

A natureza da mutação de cada colônia foi estudada abordando 2 mecanismos de resistência para beta lactâmicos: produção de beta-lactamase e alteração de permeabilidade. Nos testes para identificação de beta-lactamase de amplo espectro (ESBL) colônias satélites dos isolados 47 e 32 apresentaram reação positiva, fenômeno que não se repetiu em colônias derivadas de outras linhagens mutadoras. Nos testes de captação de cristal violeta, verificamos também colônias com baixo percentual de absorção, o que pode significar uma possível alteração na permeabilidade. No entanto, a variabilidade nos valores observados entre as colônias não permite apontar com segurança que tal mecanismo possa ter relevância na resistência aos antibióticos testados.

Nos testes moleculares, até o momento verificamos a presença de três genes *mut* nas linhagens mutadoras identificadas. Em nenhuma das linhagens foi observada alteração nos genes alvo, pois todos foram amplificados de forma idêntica. Os respectivos genes *mutY*, *mutL*, e *mutY* foram amplificados e serão submetidos a sequenciamento.

6 CONCLUSÃO

- Primeiro relato da ocorrência do fenótipo mutador para antibióticos beta-lactâmicos cefalotina e/ou ceftazidima entre linhagens patogênicas de *E. coli* isoladas de casos clínicos;
- entre 53 isolados de *E. coli* analisadas 8 linhagens apresentaram o fenótipo mutador para pelo menos um antibiótico testado;
- as frequências de mutação espontâneas encontradas em 4 linhagens selecionadas com fenótipo mutador em relação aos beta-lactâmicos cefalotina e/ou ceftazidima foram de 100 a 10.000 vezes superiores às aquelas encontradas em linhagem não mutadoras e de 10 a 100 vezes superiores às aquelas medidas com linhagens de *E. coli* K12 deficientes nos genes *mutY* ou *mutS*;
- não foram encontradas alterações estruturais (como deleções) nos genes *mutS*, *mutY* e *mutL* nas 4 linhagens mutadoras de *E. coli* estudadas;
- clones resistentes a beta-lactâmicos derivados da linhagem 32 apresentaram aumento da expressão de beta-lactamase enquanto que análises semelhantes feitas com clones resistentes derivados das linhagens mutadoras 47, 29 e 80 apontam para possíveis alterações em proteínas alvos (PBPs) como base mais provável para o aumento nos níveis de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos;
- como conclusão final do trabalho demonstra-se que a elevada incidência do fenótipo mutador em linhagens patogênicas de *E. coli* de origem clínica pode representar um elemento importante na evolução desses patógenos, em particular, na incidência de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos.

REFERÊNCIAS*

- ABE, C. M. et al. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 52, p. 397- 406, 2008.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER P. **Molecular biology of the cell**. New York: Garland Science, 2002.
- ANDERSON, G. G. et al. Host subversion by formation of intracellular bacterial communities in the urinary tract. **Microbes Infect.**, v. 6, p. 1094-1101, 2004.
- ARSLAN, H. et al. Risk factors for ciprofloxacin resistance among *Escherichia coli* strains isolated from community – acquired urinary tract infections in Turkey. **J. Antimicrob. Chemoth.**, v. 56, p. 914-918, 2005.
- BAQUERO, F.; MARTINEZ, L. J. Mutation frequencies and antibiotic resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. 1771-1777, 2000.
- BEGG, H. K. S.; HALL, M. C. L. Hypermutable bacteria isolated from humans – a critical analysis. **Microbiology**, v. 152, p. 2505-2514, 2006.
- BLAZQUEZ, J. Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance. **Antimicrobial Resistance**. p. 1201-1207, 2003.
- BREGON, D.; MATIC, I.; RADMAN, M.; TADDEI, F. Inefficient mismatch repair: genetic defects and down regulation. **J. Genet.**, p. 21-28, 1999.
- BOWER, J. M. et al. Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. **Traffic**, v.6, p. 18-31, 2005.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 54, p. 969-976, 2010.
- CADET, J.; BERGER, M.; DOUKI, T.; RAVANAT, J. L. Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, p. 131-187, 1997.
- CLEARY, J. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin, **Microbiology**, v. 150, p. 527-538, 2004.
- CAMARGO, I. L. B. C.; MASCHIETO, A.; SALVINO, C.; DARINI, A. L. C. Diagnóstico bacteriológico das infecções do trato urinário - uma revisão técnica. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 34, p. 70-78, 2006.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CHOPRA, I.; O'NEILL, J. A.; MILLER, K. The role of mutators in the emergence of antibiotic – resistant bacteria. **Drug. Resistance Updates**, p. 137-145, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. **Twenty-first Informational Supplement**, M100-S21, v. 31, n. 1, 2011.

CUPPLES, C. G.; MILLER, J. H. A set of lacZ mutations in *Escherichia coli* that allow rapid detection of each of six base substitutions. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 86, n. 14, p. 5345-5349, 1989.

DALMARCO, E. et al. Identificação laboratorial de beta – lactamases de espectro estendido (ESBLs) – revisão. **RBAC**, v. 38, n. 3, p. 171-177, 2006.

DENAMUR, E.; MATIC, I. Evolution of mutation rates in bacteria. **Molecular Microbiology**, p. 820-827, 2006.

DENAMUR, E. et al. High frequency of mutator strains among human uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Journal of Bacteriology**, p. 605-609, 2002.

DOUGAN, G. et al. The *Escherichia coli* gene pool. **Current Opinion in Microbiology**, England, v. 4, p. 90-94, 2001.

DRAKE, J. W.; CHARLESWORTH, B.; CHARLESWORTH, D.; CROW, J. F. Rates of spontaneous mutation. **Genetics**, v. 148, n. 4, p. 1667-1686, 1998.

DRAWZ, S. M.; BONOMO, RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 23, n. 1, p. 160-201, 2010.

EDWARD, C.; YANOFSKY, C. Mutator Gene Studies in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, p. 390-397, 1969.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-247, 2000.

FRIEDBERG, E. C.; WALKER, G. C.; SIEDE, W. DNA Repair and Mutagenesis. **ASM**, p. 99-109, 1995.

GATEHOUSE, D. Critical features of bacterial mutation assays. **Mutagenesis**, v. 2, n. 5, p. 397-409, 1987.

GEE, P.; MARON D. M.; AMES, B. N. Detection and classification of mutagens: a set of base-specific *Salmonella* tester strains. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, n. 24, p. 91, 1994.

GHUYSEN, J. M. Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. **Annual Review Microbiology**, v. 45, p. 37-67, 1991.

GLASSNER, B. J.; POSNICK, L. M.; SAMSON, L. D. The influence of DNA glycosylases on spontaneous mutation. **Mutat. Res.** v. 400, n. 1-2, p. 33-44, 1998.

GUSTAFSSON, P. et al. Outer penetration barrier of *Escherichia coli* K12: kinetics of the uptake of gentian violet by wild type and envelope mutants. **Journal of Bacteriology**, p. 893-900, 1973.

GUYMON, L. F; SPARLING, F. P. Altered crystal violet permeability and lytic behavior in antibiotic – resistant and sensitive mutants of *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Bacteriology**, v. 124, n. 2, p. 757-763, 1975.

HEILBERG, I. P.; SHOR, N. Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato urinário – ITU. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 49, p. 109-116, 2003.

HENTON, M. M.; HUNTER, P. *E coli* infections. **Infections Diseases of Livestock**, p. 1085-1099, 1994.

HORST, J. P.; WU, T.; MARINUS, G. M. *Escherichia coli* mutator genes. **Trends in Microbiology**, v. 7, Jan 1999.

MILLER, J. H.; SUTHAR, A.; TAI, J.; YEUNG, A.; TRUONG, C.; STEWART, J. L. Direct Selection for Mutators in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, p. 1576–1584, Mar 1999.

JONHNSON, J. R; RUSSO, T.A. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “the other bad *E. coli*.” **J. Lab. Clin. Med.**, v. 139, n. 3, p. 155-162, 2002.

JOSEPHY PD. The *Escherichia coli lacZ* reversion mutagenicity assay. **Mutat. Res.**, v. 455, n. 1-2, p. 71-80, 2000.

KAPER, J.P.; NATARO, J.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews**, v. 2, p. 123–140, 2004.

KONEMAN,. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LeCLERC, J. E.; LI, B.; PAYNE, W. L.; CEBULA, T. A. High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. **Science**, v. 274, p. 1208-1210, 1996.

LI, B.; TSUI, H.; LECLERC, E. J.; DEY, M.; WINKLER, E. M.; CEBULA, A. T. Molecular analysis of mutS expression and mutation in natural isolates of pathogenic *Escherichia coli*. **Microbiology**, v.149, p. 1323-1331, 2003.

LINDAHL, T.; WOOD, R. D. Quality control by DNA repair. **Science**, v. 286, p. 1897-1905, 1999.

LURIA, S. E, DELBRUCK M. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. **Genetics**, v. 28, p. 491-511, 1943.

MARINUS, M. DNA Methylation and Mutator Genes in *Escherichia coli* K-12. **Mutation Research**, v. 705, n. 2, p.71-76, 2010.

MICHAELS, M. L.; MILLER, J. H. The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine). **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 6321–6325, 1992.

MILLER, K.; O'NEILL, J. A.; CHOPRA, I. Response of *Escherichia coli* hypermutators to selection pressure with antimicrobial agents from different classes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 925-934, 2002.

MILLER, K.; O'NEILL J. A.; CHOPRA I. *Escherichia coli* present an enhanced risk for emergence of antibiotic resistance during urinary tract infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 23-29, 2004.

MILLER, J. H. Spontaneous mutators in bacteria: insights into pathways of mutagenesis and repair. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 50, p. 625-643, 1996.

MOREIRA, M. A. S.; SOUZA, E. C.; MORAES, C. A. Multidrug efflux system in gram-negative bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 653, p. 19-28, 2004.

MOYA, B.; DO" TSCH, A.; JUAN, C.; BLA´ZQUEZ, J.; ZAMORANO, L.; et al. b-Lactam Resistance Response Triggered by Inactivation of a Nonessential Penicillin-Binding Protein. **PloS. Pathog.**, v. 5, n. 3, p. e1000353, 2009. doi:10.1371/journal.ppat.1000353.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *E. coli*. **Clin. Microbiol. Ver.**, v. 11, p. 142-201, 1998.

SNIEGOWSKI, P. D.; GERRISH, P. J.; LENSKI, R. E. Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*. **Nature**, v. 387, june, 1997.

PELEG, A.; et al. Hospital- Acquired infections due gram-negative bacteria. **N Engl J Med PMC**, p. 1804-1813, 2010.

PERRON, G.; HALL, A.; BUCKLING, A. Hipermutability and compensatory adaptation in antibiotic – resistant bacteria. **The American Naturalist**, July 2010.

RADMAN, M. M. I.; TADDEI, F.; PICARD, B.; BINGEN, E. D. C.; DENAMUR, E. Highly variable mutation rates in commensal and pathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v. 277, p. 1833-1834, 1997.

SANDERS, C. C. et al. Selection of multiple antibiotic resistance by quinolones, beta-lactams, and aminoglycosides with special reference to cross-resistance between unrelated drug classes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, p. 797-801, 1984.

SARKAR, S. K.; DUTTA, M.; CHOWDHURY, C.; KUMAR, A.; GHOSH, A. PBP5, PBP6 and DacD play different roles in intrinsic beta-lactam resistance of *Escherichia coli*. **Microbiology**, p. 2702-2707, 2011.

SIXMA T. K. et al. Refined structure of *Escherichia coli* heatlabile enterotoxin, a close relative of choleta toxin. **Journal of Molecular Biology**, v. 230, n. 3, p. 890-918, 1993

SLUPKA, M. M.; BAIKALOV, C.; LUTHER, W. M.; CHIANG, J. H.; WEI, Y. F.; MILLER, J. H. Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of *Escherichia coli* *mutY* gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. **J. Bacteriol.**, p. 3885-3892, 1996.

SPRATT, B. G. Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation and shape of *Escherichia coli* K-12. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, p. 2999-3003, 1975.

STAMM, W. E. Scientific and clinical challenges in the management of urinary tract infections. **Am. J. Med.**, v. 113, p. 15-45, 2002.

SHIBUTANI, S.; TAKESHITA, M.; GROLLMAN, A. P. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. **Nature**, v. 349, n. 6308, p. 431-434, 1991.

TAJIRI, T.; MAKI, H.; SEKIGUCHI, M. Functional cooperation of MutT, MutM and MutY proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in *Escherichia coli*. **Mutat. Res.**, v. 336, n. 3, p. 257-267, 1995.

TRINDADE, S. et al. Rate and effects of spontaneous mutations that affect fitness in mutator *Escherichia coli*. **Philosophical Transactions**, v. 365, n. 1544, p. 1177-1186, 2010.

WILES, J. T.; KULESUS, R. R.; MULVEY, M. A. Origins and Virulence Mechanisms of Uropathogenic *Escherichia coli*. **Exp Mol Pathol.**, v. 85, n. 1, p. 11-19, 2008.

VIEIRA, J.; SARALVA, R.; MENDONÇA, L. Antibiotic susceptibility antimicrobial of uropathogens isolated from culture of patients with urinary tract infections from the University Hospital Bettina Ferro de Souza, Belém-PA. **RBAC**, v. 39, n. 2, p. 119-121, 2007.

WOOD, M. L.; ESTEVE, A.; MORNINGSTAR, M. L.; KUZIEMKO, G. M.; ESSIGMANN, J. M. Genetic effects of oxidative DNA damage: comparative mutagenesis of 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 7,8-dihydro-8-oxoadenine in *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Res.**, v. 20, n. 22, p. 6023-6032, 1992.

WU, X.; KHALPEY, Z.; CASCALHO, M. Cellular physiology of mismatch repair. **Curr. Pharm. Des.**, v. 10, n. 32, p. 4121-4126, 2004.

YOSHIMURA, F.; NIKAIDO, H. Diffusion of beta-lactam antibiotics through the porins channels of *Escherichia coli* K-12. **Antimicrob. Agents Chemother.**, p. 84-92, 1985.