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

São Paulo
2012

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 clinica 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 generated 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 toresistance 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 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*.

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 lipopolissacarideo (LPS) também conhecido como endotoxina, é um componente essencial e característico da membran externa das bactérias gram negativas, responsável por diversos efeitos biológicos, incluino 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 enteropatôgenicas, 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 enterocite 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 ulceras, 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 á 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 piolenefrite 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 urinaria é realizada através do uso de diferentes agentes antimicrobianos. Os antibióticos mais utilizados no tratamento de ITU são os seguintes: sulfametoxazol, trimetropim, amoxacilina, 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 azttreonam.

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 urinarias. 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 (cefoxitina), terceira (ceftazidima, cefotaxima, 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 acido 6-amino-penicilânico por hidrolise 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, acido 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 peptideoglicano, 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 oxiimino 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 hidrolise mais amplom 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 àquelas 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-lactamicos 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, consequentemente, 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

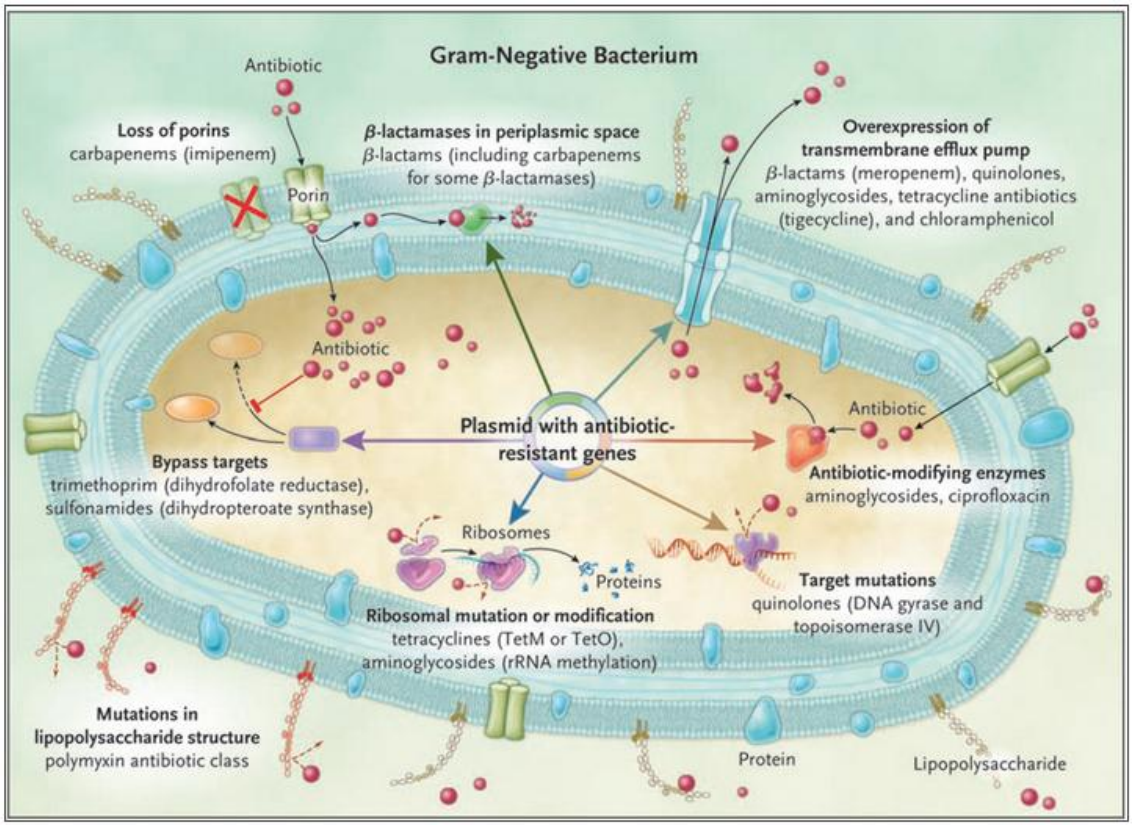
contribuem direta ou indiretamente com a sensibilidade aos beta-lactâmicos. (SARKAR et al., 2011). A alteração ou deleção de uma PBP pode levar a resistência bacteriana ao antibiótico que tem essa proteína por alvo, fazendo com que o antibiótico não tenha mais acesso a cadeia de peptideoglicano em crescimento. 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 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 expele 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 continua.

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 individuo 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 alquitransferência. 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 sito 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 beneficamente os mecanismos de resistência a antibióticos (HORST, 1999; MILLER, 2002).

A resistência endógena pode resultar de mutações envolvendo genes cromossomais, 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**
mutH	G:C - A:T e A:T – G:	participa do sistema MMR
mutL	G:C - A:T e A:T – G:	participa do sistema MMR
mutS	G:C - A:T e A:T – G:	participa do sistema MMR
mutD	Todas substituições de base	atua com a DNA polimerase III
mutT	A:T – C:G	previne incorporação de A: 8-oxodG
mutY	G:C – T:A	Glicosilase corrige G: A e 8-oxodG:A
mutM	G:C – T:A	promove excisão da8-oxodG

Fonte: Adaptado de Horst (1999).

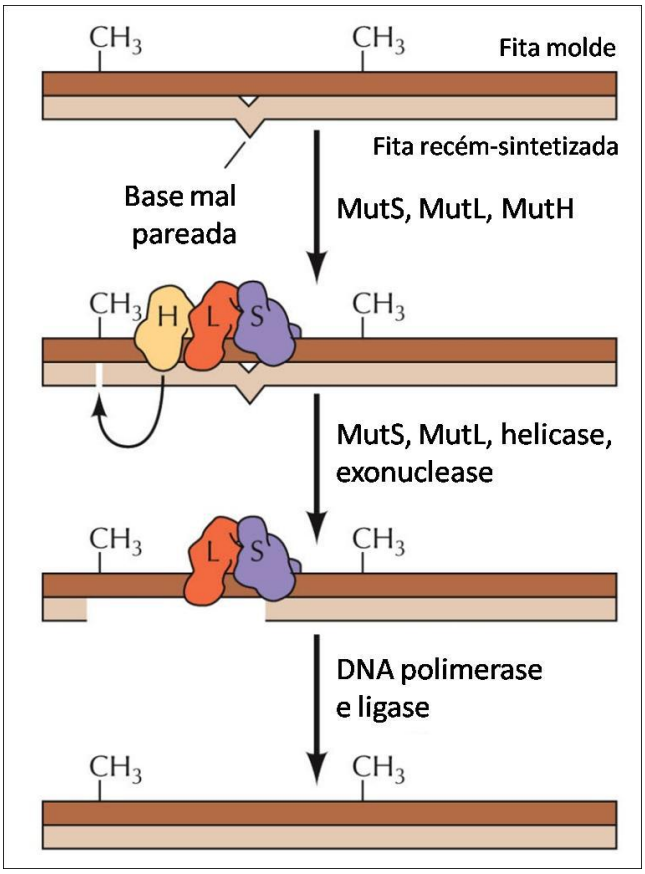
1.6.2 Reparo de bases malpareadas (*methyl directed mismatch repair* – MMR)

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} 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 sequencias 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 sìtio 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 intricado sistema de defesa antioxidante (composto por SOD, glutationa 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).

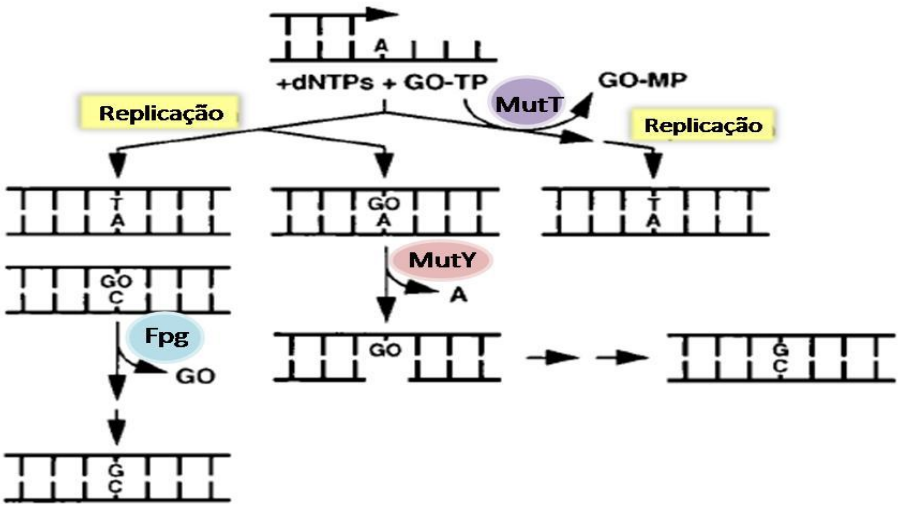
Dentre os quase 50 tipos identificados de lesões de base causadas por estresse oxidativo, a lesão 8-oxoG (8-oxoguanina ou 7,8-dihidro-8-oxoguanina, muitas vezes referida como **GO**) é uma das mais abundantes e bem caracterizadas (WOOD et al., 1992). A 8-oxoG é formada em altas quantidades, pela reação 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 noDNA, 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 revertem 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.

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 àquelas encontradas em linhagem não mutadoras e de 10 a 100 vezes superiores àquelas 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 viru lence 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.

BREGEON, 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. Updatedd 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 bactéria. **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.