

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

LETÍCIA ZENATTI

Evolução dirigida com linezolida e tedizolida da *Staphylococcus aureus*  
SA43, representante da linhagem ST5-SCC*meclII*, e comparação  
fenotípica de isolados derivados

São Carlos  
2022



LETÍCIA ZENATTI

Evolução dirigida com linezolida e tedizolida da *Staphylococcus aureus* SA43, representante da linhagem ST5-SCC*mecII*, e comparação fenotípica de isolados derivados

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Área de concentração: Física Biomolecular.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo.

Versão corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Zenatti, Letícia

Evolução dirigida com linezolida e tedizolida da *Staphylococcus aureus* SA43, representante da linhagem ST5-SCCmecII, e comparação fenotípica de isolados derivados / Letícia Zenatti; orientadora Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo - versão corrigida -- São Carlos, 2022.  
65 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2022.

1. Resistência antimicrobiana. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. Linezolida. 4. Tedizolida. I. Camargo, Ilana Lopes Baratella da Cunha, orient. II. Título.

À minha filha, com amor e gratidão por sua  
doçura, carinho, presença e paciência ao longo do  
período de elaboração deste trabalho.



## **AGRADECIMENTOS**

À professora Dra. Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo, pela orientação, atenção e apoio durante a elaboração deste trabalho. Sua dedicação, ensinamentos e paciência contribuíram para meu crescimento científico e intelectual.

Ao Instituto de Física de São Carlos, pela oportunidade de realização do curso de mestrado. Ao professor Paulo Bispo, pela parceria no sequenciamento.

À todos os integrantes do laboratório LEMiMo, em especial à Gabriela Righetto, Camila Boralli, Pamela Esquen e Iago Silva, que participaram do meu dia a dia, me ensinaram e auxiliaram sempre que solicitei.

À Nicoli Dabul, Geovana Vieira e Camila Boralli pela oportunidade de trabalharmos em conjunto e discutirmos os resultados obtidos.

À minha família, pais e irmãos, que me apoiou e incentivou durante a realização deste projeto. Em especial aos meus pais, Reginaldo e Dinalva Zenatti, que me auxiliaram nos cuidados com minha filha e proporcionaram a oportunidade de me dedicar à área acadêmica.

À minha filha Luani Zenatti Turi, força motriz para buscar sempre mais.

Aos meus amigos Luiz Paulo Turi, Karen Jochelavicius, Keilla Colombo, Mayara Ruggiero e Letícia Marques pelas conversas, comidas, saídas e ajudas sempre que precisei.

Aos meus amigos Cássia Kocki e Alex Moura, por me fazerem rir até a reta final.

À CAPES pela bolsa concedida.

**“O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) Código de financiamento 001”.**





“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

**Isaac Newton**



## RESUMO

ZENATTI, L. **Evolução dirigida com linezolida e tedizolida da *Staphylococcus aureus* SA43, representante da linhagem ST5-SCCmeclI, e comparação fenotípica de isolados derivados.** 2022. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

As infecções por *S. aureus* ST5-SCCmeclI resistentes à meticilina surgiram em hospitais brasileiros e são um desafio para o tratamento devido à multirresistência. A tedizolida (TZD) é a última oxazolidinona aprovada no país para tratar infecções cutâneas por cocos Gram-positivos. Nosso objetivo foi expor a TZD ou linezolida (LNZ) in vitro e a longo prazo o isolado clínico brasileiro *S. aureus* SA43, representativo da linhagem ST5-SCCmeclI encontrada no país, e observar os efeitos na susceptibilidade a antimicrobianos. Foi realizada uma evolução dirigida (ED) executada expondo SA43 a níveis crescentes de TZD ou LNZ in vitro, em paralelo e em triplicata a partir de diferentes colônias (experiências A, B e C). Usamos caldo Mueller-Hinton cátions ajustados mais LNZ ou TZD em três concentrações: CIM,  $\frac{1}{2}$ CIM e 2xCIM. Após incubação a 37°C overnight, o tubo com a maior concentração de fármaco apresentando crescimento foi usado como inóculo para a próxima cultura. Após repetir isso por 34 dias, três passagens sem fármacos foram realizadas para estabilização de cada cultura antes de realizar os outros experimentos. Nos isolados derivados, avaliamos as alterações do fitness bacteriano determinando o tempo de duplicação (TD) e resistência cruzada a vários antimicrobianos. Populações resistentes emergiram durante a ED com LNZ, mas não se perpetuaram, resultando apenas em alterações leves nas CIMs de TZD ou LNZ. Embora o perfil de suscetibilidade a todos os antibióticos após ED tenha se mantido inalterado, observamos alterações significativas com as populações resistentes, ambas tornando-se resistentes à quinupristina/dalfopristina, e uma delas tornando-se suscetível à amicacina. Comparamos o TD dos isolados antes e após a exposição às duas oxazolidinonas e observamos aumento do TD em todos os isolados expostos a TZD e nos experimentos A e C expostos a LNZ (o TD no experimento B não teve alterações). Como a maioria dos isolados derivados apresentou alteração no TD, é razoável sugerir possíveis mudanças no fitness. Por fim, foi realizada a análise de variantes nas sequências completas do genoma das amostras A1 (LNZ-S/TZD-S), A28 (LNZ-R/TZD-R) e A34 (LNZ-S/TZD-S), da ED com

LNZ, e foi observado um SNP G455A no gene *rplC*, codificando a proteína ribossômica L3, que já foi relacionada à resistência a LNZ em várias espécies e pode explicar o fenótipo dessas cepas. Em conclusão, este estudo sugere que o TZD é tão seguro quanto o LNZ, pelo menos nesta linhagem, uma vez que a ED de pelo menos 34 dias resultou em isolados suscetíveis a LNZ/TZD, sem alterar a suscetibilidade a todas as drogas testadas.

**Palavras-chave:** Resistência antimicrobiana. *Staphylococcus aureus*. Linezolida. Tedizolida.

## ABSTRACT

ZENATTI, L. **Directed evolution with linezolid and tedizolid of *Staphylococcus aureus* SA43, representative of the ST5-SCCmecII strain, and phenotypic comparison of isolated results.** 2022. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

Methicillin-resistant *S. aureus* ST5-SCCmecII infections have emerged in Brazilian hospitals and are a challenge to treat due to multidrug-resistance. Tedizolid (TZD) is the last oxazolidinone approved in the country to treat Gram-positive cocci skin infections. We aimed to expose the Brazilian clinical isolate *S. aureus* SA43, representative of the ST5-SCCmecII lineage found in the country, to TZD or linezolid (LNZ) in vitro and in a long term to observe the effects on antimicrobial susceptibility. A directed evolution (DE) was achieved by exposing SA43 to TZD or LNZ escalating levels in vitro, in parallel, and in triplicates starting from different colonies (experiments A, B, and C). We used cation-adjusted Mueller-Hinton broth plus the LNZ or TZD in three concentrations: MIC,  $\frac{1}{2}$  MIC, and 2x MIC. After incubation at 37 °C overnight, the tube with the highest drug concentration showing growth was used as inoculum for the next culture. After repeating this for 34 days, three drug-free passages were performed for stabilization of each strain before performing the other experiments. In the derived isolates, we assessed fitness alterations by determining the doubling time (DT) and cross-resistance to several antimicrobials. Resistant populations were selected during the DE with LNZ, but did not remain, resulting only in mild changes in TZD or LNZ MICs. Although the susceptibility profile to all antibiotics after DE was unchanged, we observed significant alterations with the resistant populations, both becoming resistant to quinupristin/dalfopristin, and one of them becoming susceptible to amikacin. We compared the isolates' DT before and after exposure to both oxazolidinones and observed increased DT in all isolates exposed to TZD and in the experiments A and C exposed to LNZ (the DT in experiment B had no changes). As most of the derived isolates had altered DT, it is reasonable to suggest possible changes in fitness. Finally, variant analysis was performed in the whole genome sequences of samples A1 (LNZ-S/ TZD-S), A28 (LNZ-R/TZD-R) and A34 (LNZ-S/TZD-S), from the DE with LNZ, and it was observed a G455A SNP in the *rpIC* gene, coding ribosomal protein L3, which have already been related to LNZ resistance in several species and might explain the phenotype of

these strains. In conclusion, this study suggests that TZD is as safe as LNZ, at least for this strain, since the 34-days DE resulted in LNZ/TZD susceptible isolates despite of the observed SNPs plus without altering the susceptibility to any of the drugs tested.

**Keywords:** Antimicrobial resistance. *Staphylococcus aureus*. Linezolid. Tedizolid.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura básica das oxazolidinonas.....	25
Figura 2 – Mecanismo de ação da linezolida.. .....	27
Figura 3 - Estrutura química da tedizolida, pró-fármaco da tedizolida (fosfato de tedizolida) e linezolida. ....	28
Figura 4 - Clones MRSA mais frequentes. ....	31
Figura 5 - Representação esquemática do mecanismo de ação e resistência à linezolida.. .....	32
Figura 6 - Esquema experimental da evolução dirigida.....	36
Figura 7- Concentração Inibitória Mínima (CIM) para as linhagens obtidas nos experimentos A, B e C na evolução dirigida com LNZ .....	42
Figura 8 - Gel de PFGE de linhagens da ED com LNZ. ....	43
Figura 9 - Curva de crescimento da ED com LNZ nos (a) experimento A, (b) experimento B e (c) experimento C. ....	44
Figura 10 - Curva de crescimento das linhagens resistentes a LNZ. ....	45
Figura 11 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) para as linhagens obtidas nos experimentos A, B e C na evolução dirigida com TDZ. ....	51
Figura 12 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) de TDZ para SA43-TDZ-C28 .....	52
Figura 13 – Gel de PFGE de linhagens da ED com TDZ. ....	53
Figura 14 - Curva de crescimento de linhagens da ED com TDZ no (a) experimento A, (b) experimento B e (c) experimento C.....	54





## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Antibióticos utilizados nos experimentos de CIM e Disco Difusão e seus locais de ação.....	39
Tabela 2 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) de LNZ para linhagens antes e após a LNZ.....	41
Tabela 3 – Tempo de duplicação das linhagens antes e após ED com LNZ.....	46
Tabela 4 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) por microdiluição em caldo de linhagens da ED com LNZ. ....	47
Tabela 5 – Perfil de sensibilidade por disco difusão de linhagens da ED com LNZ. ....	48
Tabela 6 - Resultado da comparação dos genomas obtidos após sequenciamento.....	49
Tabela 7 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) de TDZ para linhagens antes e após a ED. ....	51
Tabela 8 – Tempo de duplicação das linhagens antes e após ED com TDZ.....	54
Tabela 9 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) por microdiluição em caldo de linhagens da ED com TDZ. ....	55
Tabela 10 - Perfil de sensibilidade por disco difusão de linhagens da ED com TDZ. ....	56



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AK	Amicacina
BHI	Infusão de Cérebro e Coração, do inglês, “ <i>Brain and Hear Infusion</i> ”
BrCAST	Comitê brasileiro para Teste de Sensibilidade de Antimicrobianos, do inglês “ <i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> ”
C	Cloranfenicol
CC	Complexo Clonal
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças americano, do inglês “Centers for Disease Control and Prevention”
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIP	Ciprofloxacino
CIM	Concentração inibitória mínima
CIM80	Concentração inibitória mínima para inibir 80% dos isolados
CN	Gentamicina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ED	Evolução dirigida
FD	Ácido fusídico
EUCAST	Comitê Europeu para Teste de Sensibilidade de Antimicrobianos, do inglês “ <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> ”
hVISA	<i>Staphylococcus aureus</i> com resistência intermediária heterogênea à vancomicina, do inglês “ <i>Heterogeneous Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus</i> ”
IFSC	Instituto de Física de São Carlos
K	Canamicina
LEMiMo	Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular
LNZ	Linezolida
mRNA	RNA mensageiro
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina, do inglês “ <i>Meticilin Resistant <u>Staphylococcus aureus</u></i> ”
PBP	Proteína de ligação à penicilina, do inglês “ <i>Penicilin Binding Protein</i> ”

PFGE	Eletroforese em gel de Campos Pulsados, do inglês “ <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> ”
QD	Quinupristina/Dalfopristina
R	Resistente
RNA	Ácido ribonucleico
S	Sensível
SCC <sub>mec</sub>	Cassete Cromossômico Estafilocócico <i>mec</i> , do inglês “ <i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i> ”
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único, do inglês “ <i>Single nucleotide polymorphism</i> ”
ST	Tipo de Sequência, do inglês “ <i>Sequence Type</i> ”
SXT	Sulfametoxazol/Trimetoprim
TD	Tempo de duplicação
TDZ	Tedizolida
USP	Universidade de São Paulo
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> com resistência intermediária à vancomicina, do inglês, “ <i>Vancomycin Intermediate <u>Staphylococcus aureus</u></i> ”
WHO	Organização Mundial da Saúde, do inglês “ <i>World Health Organization</i> ”

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 Resistência bacteriana .....	23
2.2 Oxazolidinonas.....	25
2.2.1 Linezolida .....	26
2.2.2 Tedizolida .....	27
2.3 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	28
2.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina .....	29
2.3.2 Resistência as oxazolidinonas .....	31
3 OBJETIVOS .....	33
3.1 Objetivo geral .....	33
3.2 Objetivos específicos .....	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	35
4.1 Comitê de Ética .....	35
4.2 Linhagem <i>S. aureus</i> SA43.....	35
4.3 Evolução dirigida .....	35
4.4 Eletroforese em gel de campos pulsados (PFGE) .....	36
4.5 Curva de crescimento e tempo de duplicação.....	38
4.6 Caracterização fenotípica.....	39
4.7 Análise genômica .....	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	41
5.1 Linezolida .....	41
5.1.1 Evolução dirigida com linezolida .....	41
5.1.2 Eletroforese em gel de Campos Pulsados .....	43

5.1.3 Curva de crescimento e tempo de duplicação .....	44
5.1.4 Caracterização fenotípica .....	46
5.1.5 Caracterização genotípica .....	48
5.2 Tedizolida .....	50
5.2.1 Evolução dirigida com tedizolida.....	50
5.2.2 Eletroforese em gel de Campos Pulsados.....	52
5.2.3 Curva de crescimento e tempo de duplicação .....	53
5.2.4 Tipagem fenotípica .....	55
6 CONCLUSÕES .....	57
REFERÊNCIAS .....	59
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	63

## 1 INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um problema global devido aos grandes impactos na sociedade, socialmente e financeiramente. Infecções causadas por linhagens resistentes estão relacionadas aos maiores efeitos colaterais, tempos de internações e mortalidade dos pacientes e, conseqüentemente, ao maior gasto financeiro envolvido em seus tratamentos. (1) O número de pesquisas em novos antimicrobianos tem caído drasticamente, em contrapartida, o número de isolados com algum tipo de resistência vem aumentando. Nesse contexto, novas classes de antibióticos, como as oxazolidinonas linezolid e tedizolida, que agem na subunidade 23S ribossomal e impedem a tradução proteica bacteriana, surgem como alternativas para o tratamento de infecções causadas por microrganismos resistentes. (2)

*Staphylococcus aureus* é um patógeno nosocomial de grande relevância, uma vez que apresenta altas taxas de virulência, capacidade de sobreviver e colonizar por longos períodos e resistência a antibióticos. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, ou MRSA (do inglês, “*Methicilin resistant Staphylococcus aureus*”), já representa mais de 50% dos isolados no Brasil. (3)

Neste estudo, realizamos a evolução dirigida, através da exposição *in vitro* e a longo prazo, às oxazolidinonas linezolid e tedizolida da linhagem *S. aureus* SA43, representante da linhagem ST5-SCC*meclI* brasileira de MRSA. (3) Ao final, avaliamos alterações fenotípicas e genotípicas entre os isolados.





## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Resistência bacteriana

Vários produtos naturais com propriedades antimicrobianas surgiram durante a era de ouro da descoberta dos antibióticos, entre 1940-1970. Essas moléculas têm como alvo funções bacterianas essenciais ou processos de crescimento, principalmente com o objetivo de interferir ou destruir a parede celular bacteriana, a membrana celular ou enzimas bacterianas cruciais envolvidas na síntese de ácidos nucleicos e proteínas. Estes “antibióticos de primeira geração” visam estruturas exclusivas de bactérias, portanto não presentes em mamíferos, para assim minimizar possíveis efeitos colaterais. Porém, os microrganismos evoluíram rapidamente e se tornaram resistentes, tornando alguns desses antibióticos obsoletos e a resistência bacteriana um problema global. (1)

A descoberta da penicilina ocorreu em 1928, seu uso na clínica e na comunidade foi ampliado em 1945. Logo em seguida, isolados bacterianos resistentes à penicilina apareceram em 1947. Em 1959, a indústria farmacêutica desenvolveu a meticilina, capaz de evitar a penicilinase, a enzima responsável por quebrar os anéis da penicilina. A meticilina chegou ao mercado em 1960, entretanto, isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a esse antibiótico apareceram apenas um ano depois, evidenciando a rapidez com que as bactérias podem ser selecionadas e prevalecerem. (1,4)

A palavra “resistência” refere-se à capacidade das bactérias de sobreviver a um tratamento antibiótico específico. Algumas espécies bacterianas são naturalmente resistentes a um determinado grupo de antibióticos ou podem adquirir resistência, o que significa que apenas alguns isolados de uma espécie específica são resistentes a um antibiótico; esse tipo de resistência pode ocorrer devido a uma mutação espontânea no DNA cromossômico ou extra cromossomicamente, através de aquisição de plasmídeos ou transposons. Alguns dos mecanismos de resistência mais comuns incluem modificação ou inativação do próprio antibiótico, alterações na permeabilidade da membrana externa, aparecimento de bombas de efluxo e alterações no local alvo bacteriano. Uma possível desvantagem da resistência bacteriana é a ocorrência de maior gasto energético no *fitness* bacteriano. (5-7)

A resistência bacteriana ocorre naturalmente, porém é acelerada com o uso inadequado de antibióticos, como erros na indicação, dosagem e tempo de tratamento. É importante destacar que os antibióticos fazem parte do cotidiano humano, para tratamento e prevenções, e também no agronegócio, o que contribui para a seleção de isolados resistentes ao redor do mundo. No cenário atual, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a resistência bacteriana chegará a causar 10 milhões de mortes por ano até 2050 e o decaimento de 24 milhões de pessoas para a condição de pobreza extrema até 2030. Em 2014, estimou-se que entre as grandes empresas farmacêuticas, apenas quatro tinham programas ativos de descoberta de antibióticos, número bem abaixo dos 18 programas existentes em 1990. Isso ocorre devido à grande dificuldade e custo envolvidos na busca por novos antibióticos. (1,5-6)

Várias abordagens foram desenvolvidas para combater os problemas com a resistência bacteriana atual e emergente. Entre elas destacam-se a prevenção e diminuição da disseminação. Para o desenvolvimento de novos antimicrobianos, é realizada triagem de novos compostos naturais, concentrando principalmente em fungos e bactérias do solo, porém é um processo lento e dispendioso, pouco atrativo para a indústria privada. (1-2)

Também é possível realizar combinações de antimicrobianos de alvo único ou mesmo a modificação dos antibióticos clássicos usando ferramentas de biologia molecular e química para encontrar novas maneiras de superar a resistência. Alguns antibióticos de 2ª, 3ª ou 4ª geração são compostos modificados com propriedades farmacológicas melhoradas, mas com o mesmo mecanismo de ação. A principal desvantagem dessa abordagem é que os locais-alvo antigos geralmente estão diretamente relacionados a processos bacterianos essenciais. Isso cria uma forte pressão de seleção,; indivíduos com maior capacidade de produzir variabilidade genética terão maior chance de superar o efeito do antibiótico, levando ao aparecimento de resistência. Nos casos em que a resistência aparece devido a mutações no local-alvo ou através do desenvolvimento de bombas de efluxo que removem o antibiótico da bactéria, o problema se torna extremamente desafiador, pois os novos análogos também podem ser afetados. (1,8-9)

Outra abordagem são as novas classes de antibióticos. As novas classes devem encontrar novos mecanismos ou novos locais-alvo em bactérias. Ao selecionar um novo alvo, diferentes critérios devem ser atendidos: ele deve estar

presente em um espectro específico de bactérias, deve ser acessível a ligação de moléculas e não deve estar presente em humanos em nenhuma forma homóloga. Uma vez que o alvo terapêutico é identificado e validado, demonstrando que afetar o alvo terá um efeito bactericida ou bacteriostático direto, o próximo passo é encontrar uma molécula que seja eficaz contra esse alvo e segura o suficiente para uso. Por exemplo, um inibidor de enzima ou uma molécula que interfere na ligação ao alvo. (2,9)

## 2.2 Oxazolidinonas

Nesse contexto, surgiram as oxazolidinonas em 1978. A primeira nova classe de antibióticos lançados desde a fosfomicina em 1972, totalmente sintética, ou seja, não ocorre na natureza e não foi desenvolvida com base na estrutura de uma molécula natural. A estrutura básica inclui um átomo de nitrogênio, um átomo de oxigênio e um grupo carbonila (Figura 1). (9-10)

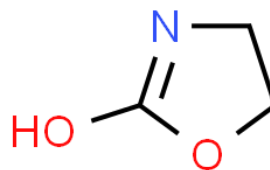


Figura 1 – Estrutura básica das oxazolidinonas.  
Fonte: ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. (11)

As oxazolidinonas foram sintetizadas primeiramente pela *DuPont Pharmaceuticals* no final da década de 1980, porém os primeiros análogos de chumbo mostraram-se inadequados para o desenvolvimento farmacêutico. Na década de 1990, a então *Upjohn Corporation*, voltou os estudos de oxazolidinonas para as relações estrutura-atividade e à síntese de análogos não tóxicos com boa atividade antibacteriana, gerando os primeiros antimicrobianos da classe, a linezolidina (LNZ) e eperezolidina. (10,12-13)

Oxazolidinonas têm atividade inibitória contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas, incluindo *S. aureus* resistente à meticilina, enterococos resistentes à vancomicina (VRE) e *Streptococcus pneumoniae* resistente à penicilina. Também

apresenta atividade contra alguns microrganismos anaeróbios, incluindo *Clostridium perfringens*, *C. difficile*, *Peptostreptococcus spp.* e *Bacteroides fragilis*. (14)

Antibióticos desta classe interagem com a subunidade 23S do ribossomo e interferem na síntese proteica, porém, enquanto a maioria dos outros inibidores (cloranfenicol, macrolídeos, lincosamidas e tetraciclina) que permitem que a tradução do mRNA comece, mas depois inibem o alongamento do peptídeo, as oxazolidinonas ligam-se à subunidade 50S do ribossomo procariótico, impedindo-o de complexar com a subunidade 30S, mRNA, fatores de iniciação e formil metionil-tRNA, bloqueando a montagem de um complexo de iniciação funcional para síntese proteica, impedindo assim a tradução do mRNA. Além disso, ter um alvo que não se sobrepõe aos inibidores de síntese proteica permite que a atividade dessa classe não seja afetada pelas rRNA metilases que modificam o rRNA 23S de modo a bloquear a ligação de macrolídeos, clindamicina e estreptograminas do grupo B. (10, 13)

Os estudos de relação estrutura-atividade das oxazolidinonas revelaram que o grupo N-aryl e a configuração 5-S são essenciais para a atividade. O grupo 5-acilaminometil é responsável pela atividade. Substituintes extras no anel aromático proximal não afetam a atividade antibacteriana, mas podem alterar a solubilidade e a farmacocinética. (13)

### 2.2.1 Linezolida

A linezolida foi o primeiro fármaco da classe das oxazolidinonas. Seu uso foi aprovado no Brasil em junho de 2000 pela ANVISA. Ela interage no domínio V do componente 23S do ribossomo. Esta inibição produz principalmente atividade antimicrobiana bacteriostática em concentrações clinicamente relevantes. (1-2)

Estudos demonstram que linezolida é tão eficaz quanto à vancomicina no tratamento de pacientes com infecções causadas por estafilococos resistentes à meticilina e também demonstrou eficácia contra infecções causadas por VRE. Este fármaco é indicado para tratamento de pneumonia nosocomial, para pacientes hospitalizados com pneumonia adquirida na comunidade e para pacientes com infecções complicadas de pele ou tecidos moles. (14)

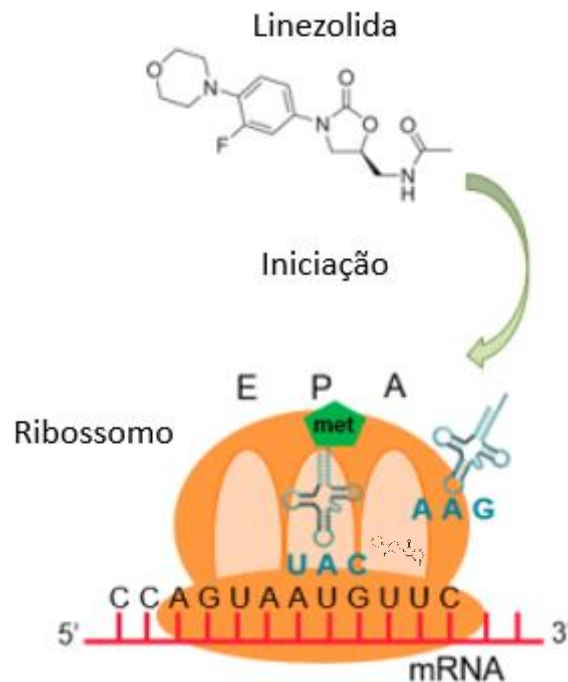


Figura 2 – Mecanismo de ação da linezolida. LNZ combina-se com a subunidade ribossomal 50S, impedindo-a de complexar com a subunidade 30S, mRNA, fatores de iniciação e formil metionil-tRNA. Consequentemente, nenhum complexo de iniciação funcional é formado e a síntese de proteínas é interrompida.

Fonte: Adaptada de MONSERRAT-MARTINEZ *et al.* (1)

### 2.2.2 Tedizolida

A dosagem duas vezes ao dia, seus efeitos colaterais hematológicos (trombocitopenia e mielossupressão) e mitocondrial, o surgimento de resistência, particularmente pelos genes *cftr* transferíveis horizontalmente, limitaram a utilidade clínica da LNZ. Para sanar estas dificuldades, surge então a tedizolida. Considerado fármaco de segunda geração das oxazolidinonas, aprovada no Brasil pela ANVISA em dezembro de 2017, é comercializado com o nome de SIVEXTRO (*Merck Sharp & Dohme*, New Jersey, USA), na forma de pró fármaco. (15)

Embora semelhante à linezolida, a tedizolida contém uma cadeia hidroximetil C-5, que explica sua melhor biodisponibilidade oral e interações reduzidas da monoamina oxidase. (16) Além disso, as diferenças estruturais entre os anéis C e o D criam um sítio alvo adicional para interação com resíduos de rRNA 23S, para formar o sítio de ligação PTC, aumentando a eficácia da tedizolida. (17)

Comparada à LNZ, a TDZ possui melhores propriedades farmacológicas comparado à linezolida, como melhor biodisponibilidade, absorção, meia-vida e

permeabilidade, chegando a ser 8 vezes mais potente que a linezolida, o que diminui a quantidade de doses necessárias, o tempo de tratamento e de internação e os efeitos colaterais. (9,16-18)

É eficiente aos mesmos microrganismos de atuação da LNZ, porém também é eficaz em cepas resistentes à linezolida *cfr*-positivas (na ausência de certas mutações ribossomais que conferem suscetibilidade reduzida à oxazolidinona). (16)

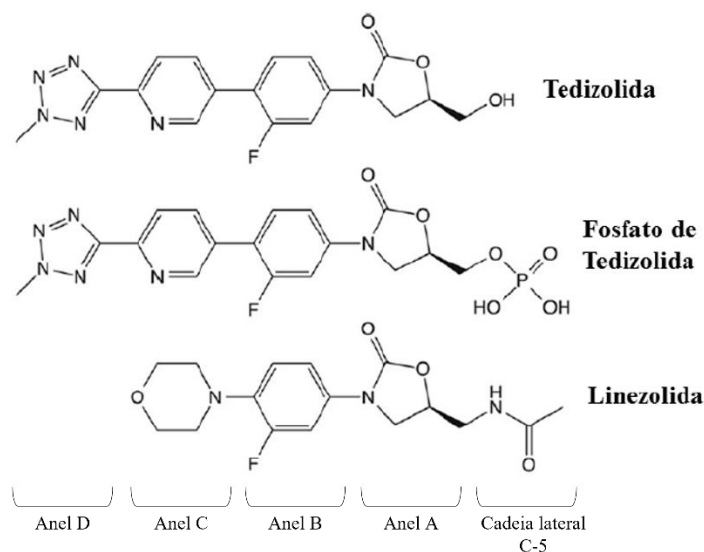


Figura 3 - Estrutura química da tedizolida, pró-fármaco da tedizolida (fosfato de tedizolida) e linezolida.

Fonte: Adaptada de RYBAC *et al.* (9)

### 2.3 *Staphylococcus aureus*

A OMS listou e incentiva fortemente o estudo de novos antimicrobianos para algumas espécies que representam grandes problemas na saúde global. (19) Destacamos nessa lista a espécie MRSA, que são causa de grande preocupação em ambientes hospitalares e na comunidade, principalmente devido à sua habilidade de adquirir resistência a diversos antimicrobianos, colonizar indivíduos por longos períodos de modo assintomático e serem um dos maiores causadores de infecções relacionadas à assistência à saúde, como aumento da mortalidade e do tempo de internação. (7)

*Staphylococcus aureus* são microrganismos tanto comensais quanto patogênicos, transmitidos por contato, seja por partículas no ar, em superfícies ou

por contato direto com indivíduo contaminado. Podem ser encontrados no ser humano no trato respiratório superior e na pele. (20) Aproximadamente 30% dos adultos são colonizados de modo crônico no trato respiratório por longos períodos. (8)

Membros da família *Staphylococcaceae*, são cocos gram-positivos, aeróbias facultativas, não esporulantes, capazes de sobreviver a condições adversas de temperatura (de 7 a 48,5 °C), pH (de 4,2 a 9,3) e altas taxas de cloreto de sódio (até 15%). (21) *S. Aureus* causam desde infecções simples, como espinhas e intoxicações alimentares, até infecções mais graves, como choque tóxico e sepse. Em 2017, dados do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC – do inglês “*Centers for Disease Control and Prevention*”) norte americano estimou que apenas nos Estados Unidos 323.700 pessoas foram hospitalizadas por infecções causadas por MRSA e 10.600 vieram à óbito em decorrência destas infecções. (5)

### 2.3.1 *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

Antibióticos  $\beta$ -lactâmicos se ligam à Proteína Ligadora de Penicilina, ou PBP (do inglês, “*Penicilin Binding Protein*”), responsável por reações envolvidas na síntese de peptidoglicano na parede celular bacteriana, impedindo assim a correta formação da parede celular e, portanto, ocasionando fragilidade da célula bacteriana. (22) A presença de  $\beta$ -lactamases, que hidrolisam o anel  $\beta$ -lactâmico, inviabiliza o mecanismo de ação desse tipo de fármaco, tornando o microrganismo resistente à essa classe de antibióticos. *S. aureus* resistente a penicilina é capaz de produzir  $\beta$ -lactamases, codificadas pelo gene *blaZ*. O fenótipo de resistência à meticilina, que também gera resistência à penicilina, ocorre devido a presença do elemento genético móvel cassete cromossômico estafilocócico *mec*- SCC*mec* (do inglês “*Staphylococcal cassette chromosome mec*”) no DNA cromossômico do microrganismo, que carrega o gene *mecA* ou *mecC*, responsáveis pela codificação de uma proteína ligante de penicilina alterada, como a PBP-2a. (7) PBP2a tem baixa afinidade aos  $\beta$ -lactâmicos, a bactéria consegue construir a parede celular bacteriana de forma íntegra, ou seja, torna-se resistente. (23) Atualmente, mais de 50 % dos isolados clínicos de *S. aureus* são resistentes à meticilina em vários países, incluindo Brasil, Peru, Japão, Romênia, entre outros (24)

Os isolados MRSA, em sua evolução e pressão seletiva, adquiriram e integraram ao seu genoma um elemento móvel que pode variar entre 21 e 67 kb, denominado *SCCmec*. Este elemento se integra na extremidade 3' do gene *rlmH*, conhecido como *orfX*, que codifica para uma metiltransferase ribossomal. (22-23)

Existem pelo menos 13 elementos *SCCmec* descritos, que além do gene que confere resistência à meticilina (*mecA*), pode conter outros genes que conferem resistências a outros antibióticos; contém também genes regulatórios (*mecI* – repressor do gene *mecA* e *mecR1*, indutor do gene *mecA*), sequência de inserção e genes *ccr* que codificam as recombinases responsáveis pela excisão e mobilidade do elemento. Dois isolados de MRSA carregando diferentes elementos *SCCmec* são consideradas linhagens diferentes, mesmo que pertençam ao mesmo tipo de sequência por MLST ou pulsotipo. (4,7)

Os clones não são específicos de cada região no globo, porém apresentam prevalência em algumas regiões em relação aos demais isolados por um período de tempo e são nomeados correspondentemente às essas regiões. (7) A análise de uma grande coleção de isolados de MRSA do sul da Europa, Estados Unidos e América do Sul revelou que quase 70% dos isolados que dominaram internacionalmente até o início dos anos 2000 pertenciam a cinco grandes clones pandêmicos: ibérico (ST247-*SCCmecIA*), clone epidêmico brasileiro (BEC) (ST239-*SCCmecIIIA*), húngaro (ST239-*SCCmecIII*), Nova York/Japão (ST5-*SCCmecII*) e o clone pediátrico (ST5-*SCCmecIV*). (25)

Nos hospitais brasileiros, o clone ST239-*SCCmecIII* foi o mais prevalente em meados da década de 1980, mas posteriormente foi substituído pelo clone ibérico (ST247-*SCCmecIA*) em 1992 a 1993 e, posteriormente, pelo BEC (ST239-*SCCmecIIIA*) (7). Estudos recentes relatam aumento expressivo de isolados do clone Pediátrico (ST5/*SCCmecIV*) e Nova Iorque/Japão (ST5-*SCCmecII*). (26)



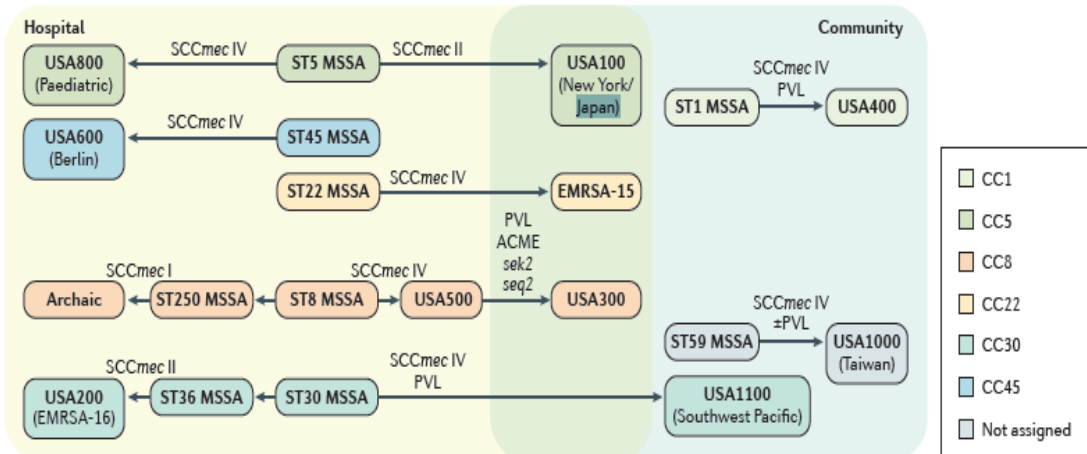


Figura 4 - Clones MRSA mais frequentes. Os tipos de sequência (STs) de *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA) são agrupados em complexos clonais (CCs) por sua semelhança com um perfil alélico fundador. Os STs possuem diferentes propriedades moleculares que permitem monitorar a distribuição geográfica de diferentes clones. Os STs de MSSA podem evoluir para MRSA adquirindo o cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*), dos quais existem diferentes tipos (representados por algarismos romanos). Os nomes de clones comumente usados estão entre parênteses.

Fonte: LEE *et al.* (24)

### 2.3.2 Resistência as oxazolidinonas

A resistência à linezolida é incomum, no entanto, o número de isolados resistentes à linezolida vem gradualmente ao longo dos anos. A resistência as oxazolidinonas geralmente é contribuída pelas mutações pontuais no gene cromossômico 23S rRNA, embora a alteração da base nitrogenada G2576T seja a predominante, outras alterações (G2505A, U2500A, G2447U, C2534U e G2603U) também foram relatadas; Mutações nas proteínas ribossomais L3, L4 e L22 codificadas pelos genes *rpIC*, *rpID* e *rpIV* também contribuem para a resistência à linezolida. (27-28)

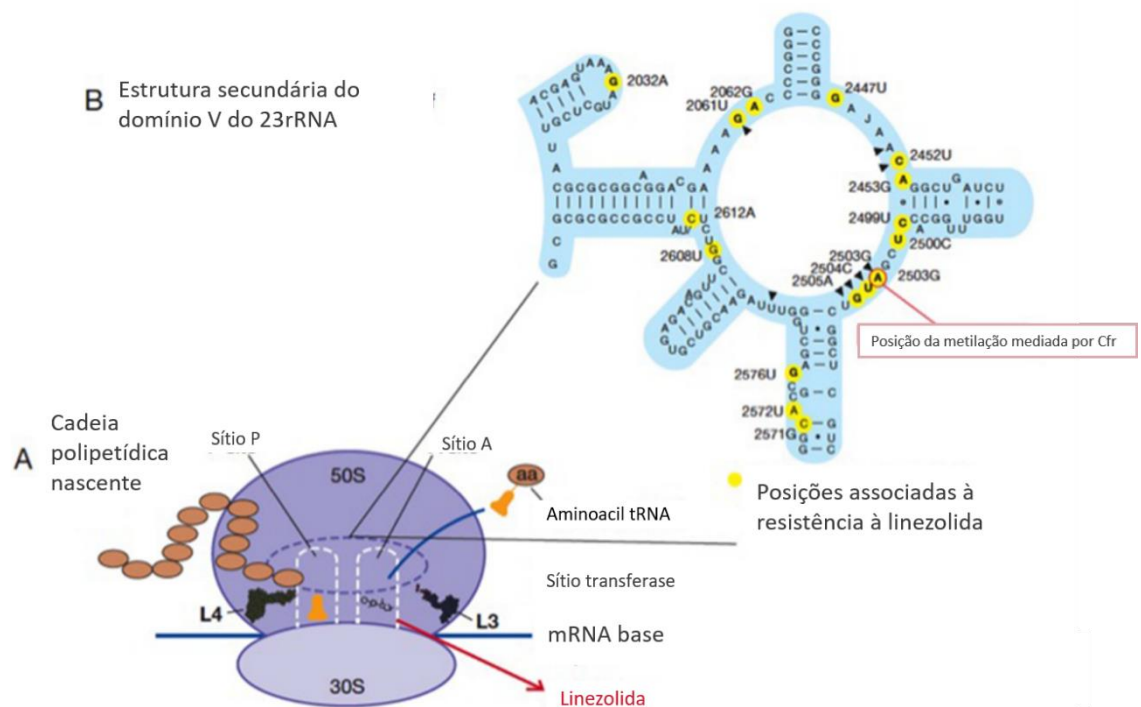


Figura 5 - Representação esquemática do mecanismo de ação e resistência à linezolida. (A) Linezolida interfere com o posicionamento de aminoacil-tRNA por interações com o centro peptidil-transferase (PTC). As proteínas ribossomais L3 e L4 associadas à resistência são destacadas. (B) Representação do domínio V do rRNA 23S mostrando mutações associadas à resistência à linezolida. A posição A2503, que é o alvo da metilação do *cfr*, é destacada.

Fonte: Adaptada de MUNITA *et al.* (29)

Por outro lado, a aquisição dos genes *chloramphenicol-florfenicol resistance* (gene *cfr*) ((*cfr*, *cfr(B)*, *cfr(D)*), *optrA* e gene de resistência *phenicol-oxazolidinone-tetracycline* (gene *poxtA*) mediados por plasmídeos, também podem causar resistência as oxazolidinonas. O gene e suas variantes *cfr(B)* e *cfr(D)* também foram relatados na resistência a oxazolidinonas por codificarem a rRNA metiltransferase, que modifica o resíduo de adenina na posição 2503 do domínio V no rRNA 23S. O gene *optrA* codifica a proteína *ATP-binding cassette F* (ABC-F) e medeia a resistência a oxazolidinonas protegendo o ribossomo bacteriano. (30-31)

Estudos demonstram que a TDZ possui maior potência *in vitro* do que a LNZ. A mutação G2576T é conhecida por gerar resistência contra a linezolida, e a presença de *optrA* é conhecida por gerar resistência contra a tedizolida. (15,29)

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é estudar as alterações fenotípicas da linhagem *Staphylococcus aureus* SA43 após exposição *in vitro* e a longo prazo às oxazolidinonas linezolidina e tedizolidina.

#### 3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são:

1. Realizar uma evolução dirigida com oxazolidinonas expondo a bactéria aos antimicrobianos a longo prazo;
2. Verificar alterações na susceptibilidade às oxazolidinonas ao após evoluções dirigidas;
3. Verificar alterações na susceptibilidade a outros antibióticos disponíveis após evoluções dirigidas;
4. Comparação do *fitness* da linhagem antes e após evolução.
5. Sequenciamento de linhagens resistentes.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Comitê de Ética

O presente projeto foi submetido para avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), por intermédio da Plataforma Brasil, localizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). O CEP analisou e dispensou a necessidade de liberação sob a justificativa de não envolver pesquisa em humanos. O número do parecer gerado foi 3.534.903 e CAAE 18878619.8.0000.0065 (ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa).

### 4.2 Linhagem *S. aureus* SA43

*S. aureus* SA43 é um isolado clínico de MRSA obtido de infecção de corrente sanguínea em agosto de 2009 no Hospital Risoleta Tolentino Neves (Belo Horizonte, Brasil). Previamente analisado pelo grupo, SA43 foi caracterizado molecularmente como ST5-SCC*meclI*, também conhecido como clone Nova Iorque-/Japão. (3,32)

### 4.3 Evolução dirigida

O experimento de evolução dirigida (ED) consiste em expor as bactérias a concentrações crescentes do antibiótico *in vitro* por um determinado número de dias consecutivos, e assim gerar pressão seletiva nas colônias.

A ED foi executada conforme Figura 6, expondo SA43 a concentrações crescentes de TZD ou LNZ *in vitro*, em paralelo e em triplicata a partir de diferentes colônias (experimentos A, B e C). Usamos 3 mL de caldo Mueller-Hinton cátion ajustado (MHCA) em tubo cônico de 15 mL, acrescido do fármaco (LNZ ou TZD) em três concentrações: CIM,  $\frac{1}{2}$ CIM e 2xCIM. Após incubação a 37°C por 24 horas, o tubo com a maior concentração de fármaco apresentando crescimento foi usado como inóculo para a próxima cultura. Após repetir o mesmo processo por 34 dias, três passagens em MHCA sem fármacos foram realizadas incubando cada uma a 37 °C por 24 horas para estabilização de cada cultura antes de retirar uma alíquota para estoque em -80 °C com 80% de glicerol.

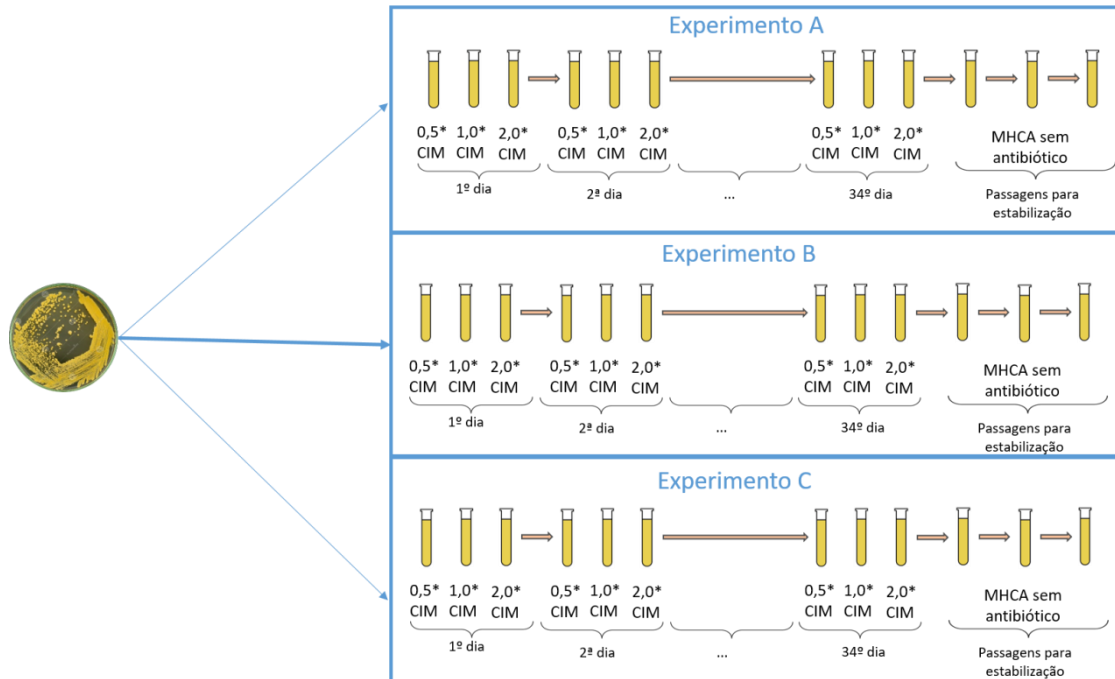


Figura 6 – Esquema experimental da evolução dirigida.  
Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.4 Eletroforese em gel de campos pulsados (PFGE)

A macrorrestrição do DNA genômico seguido de eletroforese em campos pulsados (do inglês, *Pulsed Field Electrophoresis* (PFGE)), tem como objetivo analisar visualmente os tamanho e quantidade de bandas e, conseqüentemente, a similaridade das amostras.

Este procedimento foi baseado no estudo de Tenover e colaboradores (1995) com algumas modificações. (33) A partir do estoque celular armazenado em  $-80^{\circ}\text{C}$ , crescemos o caldo em 5 mL de meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI) a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Transferimos 1,2 mL de cada cultura para microtubos de centrifugação de 1,5 mL e separamos o precipitado por centrifugação (13200 rpm por 1 minuto a  $4^{\circ}\text{C}$ ). Realizamos duas etapas de lavagem com 1 mL de tampão T10E50; após a última lavagem, suspendemos as células em 0,5mL de tampão T10E50 e 15  $\mu\text{L}$  de solução de lisostafina à 1 mg/mL.

Para elaboração dos *plugs*, adicionou-se 0,6 mL de agarose *Low Melting 2%* (SeaPlaque Agarose, Lonza cat 501000), na proporção de 20 mg por 1 mL de água DEPC). O conteúdo foi então transferido para molde refrigerado em gelo, envolto em plástico filme e mantido em gelo por 30 minutos. Após a solidificação dos *plugs*, transferiu-se os mesmos para microtubos de centrifugação de 2 mL, adicionou-se 1

mL de solução de sarcosil 1% e incubamos a 37 °C por 1 hora. Adicionou-se então 100 µL de solução de Proteinase K a 10 mg/mL e os tubos foram incubados à 50 °C por aproximadamente 18 horas. Em seguida, descarta-se o tampão de lise e condicio-se os *plugs* em 1 mL de T10E1. Nesta etapa os tubos podem ser mantidos refrigerados por tempo indeterminado sem ocorrer degradação. (34)

Para confecção do gel de agarose usado na corrida de eletroforese, condiciona-se pedaços de 5x5 mm do *plug* contendo o DNA bacteriano lisado em 198 µL de T10E1 e 2 µL de PMSF (Sigma, P7626-1 g) a 100 mM por 30 minutos a 50°C. Foram realizadas 3 lavagens dos *plugs* com 0,5 mL de tampão T10E1 sob agitação por 20 minutos e 0 °C. Após a última lavagem, transferiu-se os *plugs* para microtubos de centrifugação novos e acrescentou-se 160 µL do *mix* da reação enzimática contendo 2 µL de Smal (*Jena Biosciences*, Jena, Alemanha), 20 µL tampão Universal (10X *Universal Buffer* (*Jena Biosciences*, Jena, Alemanha) e 138 µL de água DEPC seguido de incubação a 30 °C por 18 horas.

Adiciou-se mais 0,8 µL de Smal seguido de banho-Maria a 30°C por mais duas horas. Após este período, acrescentou-se mais 4 µL de proteinase K a 10 mg/mL em cada tubo e que foram incubados em estufa a 37°C por uma hora. Descartou-se o tampão dos tubos e os substituiu por 0,5mL de tampão T10E1 limpo. Os tubos foram condicionados em isopor contendo gelo e agitação por 30 minutos. Repetiu-se essa lavagem por mais duas vezes.

Em tubos com 1mL de tampão TBE 0,5x aquecido a 45°C, cortou-se pedaços de 5x5 mm do marcador de peso molecular que foram incubados a 45°C por 5 minutos. Retirou-se os *plugs* do tampão, foram delicadamente secos com papel absorvente e, então, alocados na parte frontal do pente do molde dos poços do gel, com um marcador de peso molecular em cada ponta e um ao centro.

O gel foi preparado com 1,8 g de agarose *Pulsed Field Certified* (*BioRad*, *Califórnia*, *EUA*) em 150 mL de TBE 0,5x. A agarose foi dissolvida em *erlenmeyer* no microondas até completa dissolução e mantido em banho Maria a 50°C até o momento de uso. Verteu-se o gel no suporte com o pente contendo os *plugs* alocado na horizontal. A solidificação ocorreu em temperatura ambiente por 30 minutos. Retirou-se vagorosamente o pente e o suporte para o gel e o posiciona no local adequado da cuba, com o sistema previamente lavado com água destilada e estabilizado em TBE 0,5x a 14°C.

Para a corrida no equipamento CHEF Mapper XA Pulsed Field Electrophoresis System (*BioRad, Califórnia, EUA*) usou-se as seguintes condições: gradiente de 6 V/cm, tempo de corrida de 22 horas, ângulo de 120°, tempo inicial de 5 segundos, tempo final de 40 segundos e rampeamento linear.

Após a corrida, o gel foi corado em solução SYBR Safe (Thermo Fischer Scientific Co., Massachusetts, EUA) 0,01% em tampão TBE 0,5x, em temperatura ambiente sem agitação. A visualização das bandas ocorreu após leitura em fotodocumentador Gel Doc™ XR + System (*BioRad, Califórnia, EUA*) com luz ultravioleta, no programa ImageLab (*BioRad, Califórnia, EUA*). Para estudo de similaridade dos padrões de bandas obtidas, a análise ocorreu visualmente.

#### **4.5 Curva de crescimento e tempo de duplicação**

Para elaboração da curva de crescimento e tempo de duplicação, baseamos a metodologia segundo Hall *et al.*, 2014 no equipamento *Spectramax M5 Microplate Reader* (*Molecular Devices, Califórnia, EUA*). (35)

Para serem utilizados como inóculos no experimento, os caldos de cultura bacteriano foram cultivados em 5 mL de MHCA a partir do estoque -80°C e incubados em estufa a  $35 \pm 1$  °C por aproximadamente 18 horas. Ajustou-se a densidade ótica em 600 nm para valores entre 0,05 e 0,1 e então inoculou-se em 6 poços diferentes (sextuplicata), para cada linhagem, de microplaca incubada em temperatura constante e leitura de D.O.<sub>600nm</sub> em períodos regulares. As leituras foram padronizadas para serem feitas a cada 20 minutos, após 5 segundos de agitação, durante 400 minutos nos quais a temperatura foi mantida a  $35 \pm 1$  °C.

Os resultados obtidos foram exportados e tabelados em planilha de Excel, onde construiu-se um gráfico de dispersão com a densidade ótica no eixo x e o tempo no eixo y, para cada uma das replicatas. Calculou-se uma linha de tendência logarítmica com valores de  $R^2$  acima de 0,99 e então utilizou-se da equação da reta para calcular o tempo de duplicação médio. Os dados de tempo de duplicação foram comparados por ANOVA de fator único.



## 4.6 Caracterização fenotípica

Após o processo de ED, para verificar possíveis resistências cruzadas, foram feitas análises do perfil de sensibilidade de outros antimicrobianos que também agem na síntese proteica, bem como membrana citoplasmática e parede celular, para verificar possíveis alterações que a ED possa ter causado em outras regiões e verificar se ocorreu resistências cruzadas previamente descritas na literatura em estudos com LNZ e TDZ, como é no caso da quinupristina/dalfopristina (QD) e sulfametoxazol/trimetoprim (SXT).

O padrão de sensibilidade foi verificado de forma quantitativa através de CIM em duplicata para para LNZ, TDZ (a fim de verificação de resistência cruzada), daptomicina e vancomicina.

Para análise qualitativa, realizamos estudos de disco difusão em triplicata experimental. Utilizamos os antibióticos para ensaios de disco difusão da OXOID (Thermo Fischer Scientific Co., Massachusetts, EUA) dos antibióticos ácido fusídico (FD), amicacina (AK), canamicina (K) ciprofloxacino (CIP), cloranfenicol (C), gentamicina (CN), QD e SXT.

Tabela 1 – Antibióticos utilizados nos experimentos de CIM e Disco Difusão e seus locais de ação

<b>Antibiótico</b>	<b>Metodologia</b>	<b>Local de ação</b>
Ácido fusídico	Disco Difusão	Síntese proteica
Amicacina	Disco Difusão	Síntese proteica
Canamicina	Disco Difusão	Síntese proteica
Ciprofloxacino	Disco Difusão	Liga-se à DNA girase da bactéria inibindo a replicação bacteriana
Cloranfenicol	Disco Difusão	Síntese proteica
Daptomicina	Microdiluição em caldo	Ligação irreversível à membrana citoplasmática
Gentamicina	Disco Difusão	Síntese proteica
Linezolida	Microdiluição em caldo	Síntese proteica (iniciação)
Quinupristina/Dalfopristina	Disco Difusão	Síntese proteica
Sulfametoxazol/Trimetopim	Disco Difusão	Inibi os sistemas enzimáticos envolvidos na síntese bacteriana do ácido tetrahidrofólico
Tedizolida	Microdiluição em caldo	Síntese proteica (iniciação)
Vancomicina	Microdiluição em caldo	Interrompe a síntese da parede celular bacteriana por ligação com alta afinidade a precursores de peptidoglicanos terminando com duas cópias de D-alanina (D-Ala)

Fonte: Elaborada pela autora.

Todos os parâmetros para ensaios de CIM e disco difusão, bem como concentrações utilizadas e roteiro para leituras dos resultados, estão de acordo com os dados padronizados pelo BrCAST/EUCAST versão 11.0 de 2021, que podem ser encontrados no site <http://brcast.org.br/>.

#### 4.7 Análise genômica

O sequenciamento completo das cepas pertinentes foi executado pelo grupo colaborador Professor Paulo Bispo (*Harvard Medical School*, Boston, Estados Unidos). O DNA genômico foi extraído de acordo com as instruções do fabricante usando o kit de sangue e tecido DNeasy (Qiagen GmbH, Alemanha). A qualidade do DNA foi verificada usando o Espectrofotômetro Nanodrop OneC (Thermo Scientific) antes da quantificação usando o fluorômetro Qubit e o kit de ensaio de alta sensibilidade dsDNA (Invitrogen). A preparação da biblioteca para o sequenciamento da Illumina foi realizada com o kit Nextera XT DNA Library Preparation (Illumina), de acordo com as especificações do fabricante. A qualidade e a quantidade de cada biblioteca de amostra foram medidas em um instrumento *TapeStation* (Agilent Technologies). Os genomas foram sequenciados como *reads* de 2×250bp em um sequenciador Illumina MiSeq (Illumina, Estados Unidos), de acordo com as especificações do fabricante com uma profundidade mínima de cobertura de 126× (variando de 126× a 242×). As *reads* de sequência foram montadas *de novo* usando CLC Genomics Workbench (CLC Bio, Cambridge, MA). Amostras com leituras de sequência abaixo de um índice de qualidade de 25 em qualquer posição e montagens que não estavam entre 2,2 a 2,9 Mb foram re-sequenciadas. Os *contigs* foram anotados usando o NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline, e os genomas foram depositados no DDBJ/EMBL/GenBank. A análise de *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) foi feita no CLC Genomics Workbench v.10.1.1 (QIAGEN).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os experimentos com LNZ e TDZ foram conduzidos em paralelo e seus resultados estão destacados nas próximas sessões.

As linhagens provenientes da ED são denominadas SA43 seguida da sigla do antibiótico utilizado na ED, a nomenclatura da triplicata experimental e o dia transcorrido após o início do experimento. Exemplo: SA43-LNZ-A1, que corresponde à ED com LNZ do experimento A e dia 1 da passagem em meio com antibiótico.

### 5.1 Linezolida

#### 5.1.1 Evolução dirigida com linezolida

Após realização da ED com LNZ verificamos a CIM de LNZ para as linhagens do primeiro e último dia (após passagens de estabilização) por microdiluição em caldo e os valores podem ser encontrados na Tabela 2. Por iniciarmos o experimento a partir de três colônias distintas – e a técnica apresentar variação de uma diluição para cima ou para baixo – os experimentos A, B e C apresentam valores diferentes entre si da CIM no primeiro dia. Os experimentos A e C apresentam valores de CIM maiores após a finalização do processo de ED, enquanto o experimento B manteve o mesmo valor.

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) de LNZ para linhagens antes e após a LNZ.

Linhagem	CIM de LNZ (mg/L)
SA43-LNZ-A1	1
SA43-LNZ-A34	4
SA43-LNZ-B1	2
SA43-LNZ-B34	2
SA43-LNZ-C1	2
SA43-LNZ-C34	4

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 7, apresentamos a CIM de LNZ para cada uma das linhagens resultantes da ED com LNZ. No eixo x encontram-se os dias dos experimentos A, B e C enquanto no eixo y temos a CIM em mg/L de LNZ. A CIM do dia 34 foi medida após as passagens de estabilização, porém seus valores não diferem dos dados encontrados no último dia de cultivo em meio com antibiótico.

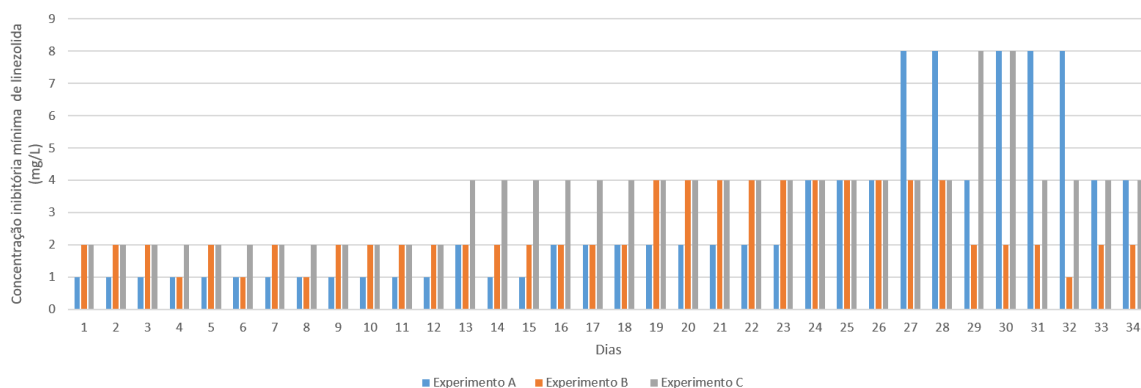


Figura 7 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) para as linhagens obtidas nos experimentos A, B e C na evolução dirigida com LNZ

Fonte: Elaborada pela autora.

Seguindo os parâmetros definidos pelo EUCAST/BrCAST versão 11.0 de 2021, a linhagem é considerada sensível para LNZ se o valor da CIM for igual ou inferior a 4 mg/L e resistente para CIM igual ou superior à 8 mg/L. Portanto, através da Figura 7, podemos constatar que linhagens resistentes foram selecionados nos experimentos A e C ao longo da ED com LNZ, porém, elas não se perpetuaram até o final da ED e isto pode ter acontecido devido ou à recombinação gênica ou pelo fato de se ter culturas com diferentes populações e as células resistentes podem não ter sido transferidas para o próximo cultivo.

Como a cada dia uma alíquota da cultura é armazenada, para verificar a estabilidade das linhagens resistentes obtidas, realizamos as etapas de estabilização – 3 dias consecutivos de cultivo em meio sem antibiótico – em todas as 7 linhagens com CIM igual a 8 mg/L. Apenas duas linhagens apresentaram conservação da CIM e, portanto, resistência à LNZ: SA43-LNZ-A28 e SA43-LNZ-A30.

### 5.1.2 Eletroforese em Gel de Campos Pulsados

O gel de PFGE resultante da ED com LNZ (Figura 8) evidenciou a ausência de microrganismos contaminantes, uma vez que o padrão de bandas gerado utilizando a enzima de macrorrestrição *Sma*I (Jena Bioscience, Jena, Alemanha) preservou-se em todos os experimentos.

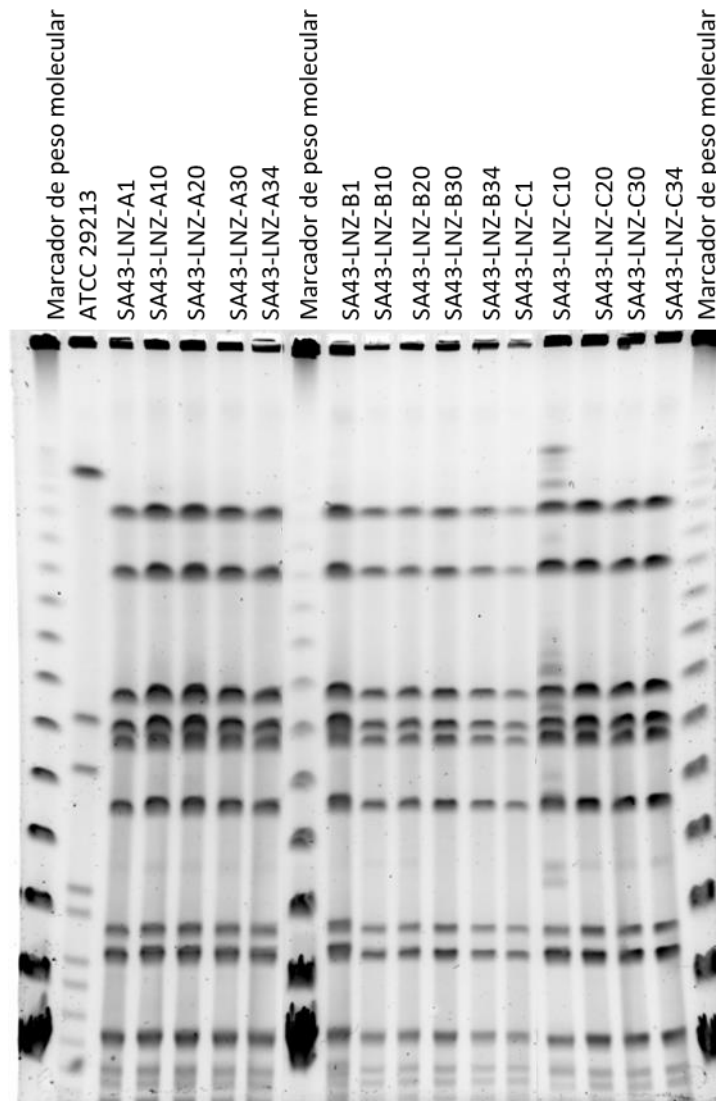


Figura 8 – Gel de PFGE de linhagens da ED com LNZ.  
Fonte: Elaborada pela autora.

### 5.1.3 Curva de crescimento e tempo de duplicação

Após elaboração da curva de crescimento das bactérias do dia 1 e do dia 34 da ED com LNZ (Figura 9), selecionamos o intervalo de tempo em que ocorre o crescimento bacteriano na fase exponencial para determinar o tempo de duplicação para cada uma.

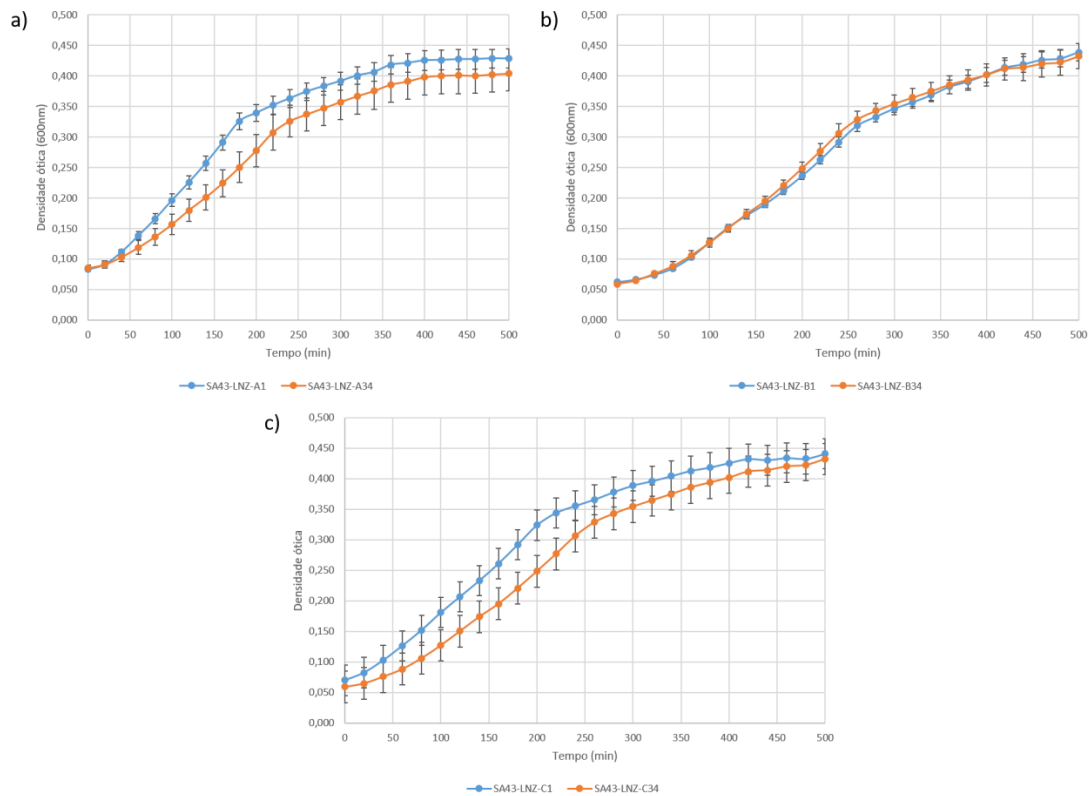


Figura 9 - Curva de crescimento da ED com LNZ nos (a) experimento A, (b) experimento B e (c) experimento C.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após a estabilização das linhagens resistentes, a curva de crescimento também foi elaborada para SA43-LNZ-A28 e SA43-LNZ-A30 (Figura 10), utilizando o mesmo intervalo de tempo (entre 20 e 180 minutos).

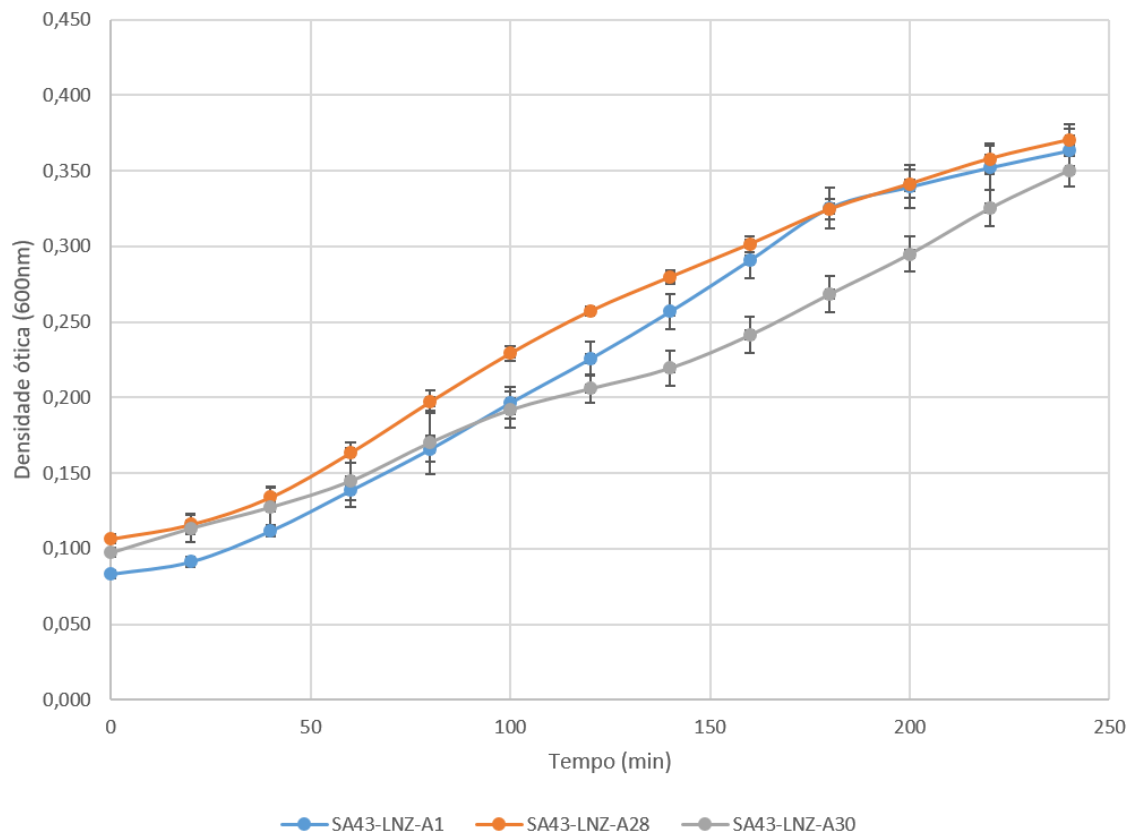


Figura 10 - Curva de crescimento das linhagens resistentes a LNZ.  
 Fonte: Elaborada pela autora.

Na Tabela 3 encontra-se o TD para cada uma das linhagens iniciais e finais resultantes da ED com LNZ, e também as linhagens SA43-LNZ-A28 e SA43-LNZ-A30 após estabilização. A análise estatística do valor de p foi calculado pelo método *One-way ANOVA* com pós teste de *Turkey*, intervalo de confiança de 95%, através do software *GraphPad Prism 8* (*GraphPad Software, San Diego-CA, EUA*).

Tabela 2 – Tempo de duplicação das linhagens antes e após ED com LNZ.

Linhagem	Tempo de duplicação (min)	Valor de p
SA43-LNZ-A1	86,58 ± 2,56	Entre 0,001 e 0,01
SA43-LNZ-A34	110,57 ± 6,33	
SA43-LNZ-B1	92,04 ± 2,42	>0,05
SA43-LNZ-B34	89,27 ± 1,58	
SA43-LNZ-C1	84,13 ± 3,17	Entre 0,001 e 0,01
SA43-LNZ-C34	107,94 ± 5,86	
SA43-LNZ-A1	86,58 ± 2,56	< 0,001
SA43-LNZ-A28	122,35 ± 11,53	
SA43-LNZ-A1	86,58 ± 2,56	< 0,001
SA43-LNZ-A30	142,23 ± 21,96	

Valores de referência do Software GraphPad Prism: Valor de p: < 0,001 – extremamente significativa, entre 0,001 e 0,01 – muito significativa, entre 0,02 e 0,05 significativa e >0,05 sem significância.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os experimentos A e C apresentaram aumento significativo no TD após a ED. O experimento B não sofreu alterações no TD. As linhagens resistentes resultantes do experimento A apresentaram o maior incremento no TD. O aumento no TD sugere possíveis alterações no *fitness* bacteriano.

#### 5.1.4 Caracterização fenotípica

O perfil de susceptibilidade a vários antimicrobianos foi determinado para comparar a resposta da linhagem antes e depois da ED, sendo por microdiluição em caldo ou disco difusão dependendo do antimicrobiano (Tabela 4 e 5).



Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) por microdiluição em caldo de linhagens da ED com LNZ.

Linhagem	Concentração inibitória mínima (mg/L) e definição de sensibilidade							
	Daptomicina		Linezolida		Tedizolida		Vancomicina	
SA43-LNZ-A1	0,250	S	1,0	S	0,250	S	1	S
SA43-LNZ-A34	0,125	S	4,0	S	0,500	S	1	S
SA43-LNZ-B1	0,250	S	2,0	S	0,250	S	1	S
SA43-LNZ-B34	0,250	S	2,0	S	0,500	S	2	S
SA43-LNZ-C1	0,250	S	2,0	S	0,250	S	2	S
SA43-LNZ-C34	0,250	S	4,0	S	0,500	S	2	S
SA43-LNZ-A28	0,125	S	8,0	R	1,000	R	1	S
SA43-LNZ-A30	0,125	S	8,0	R	1,000	R	2	S
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,125	S	0,5	S	0,125	S	1	S

R (Resistente) e S (Susceptível) segundo valores de ponto de corte segundo EUCAST/BrCAST versão 11.0 de 2021

Fonte: Elaborada pela autora.

Não foram observadas alterações fenotípicas para linezolida, tedizolida, daptomicina e vancomicina para nenhuma linhagem após os 34 dias de ED com LNZ. As linhagens resistentes, SA43-LNZ-A28 e SA43-LNZ-A30 tiveram incremento na CIM de LNZ e TDZ, sendo então classificadas como resistentes para estes antibióticos.

Tabela 4 – Perfil de sensibilidade por disco difusão de linhagens da ED com LNZ.

Linhagem	Disco Difusão							
	FD	AK	K	CIP	C	CN	QD	SXT
SA43-LNZ-A1	S	R	R	R	S	S	S	S
SA43-LNZ-A34	S	R	R	R	S	S	S	S
SA43-LNZ-B1	S	R	R	R	S	S	S	S
SA43-LNZ-B34	S	R	R	R	S	S	S	S
SA43-LNZ-C1	S	R	R	R	S	S	S	S
SA43-LNZ-C34	S	R	R	R	S	S	S	S
SA43-LNZ-A28	S	R	R	R	S	S	R	S
SA43-LNZ-A30	S	S	R	R	S	S	R	S
ATCC 29213	S	S	S	S	S	S	S	S

R (Resistente) e S (Sensível) segundo valores de ponto de corte segundo EUCAST/BrCAST versão 11.0 de 2021. FD, Ácido fusídico; AK, amicacina; K, canamicina; CIP, ciprofloxacino, C, cloranfenicol; CN, gentamicina; QD, quinupristina/dalfopristina e; SXT, sulfametoxazol/Trimetoprim.

Fonte: Elaborada pela autora.

Não houve alterações no padrão fenotípico das linhagens resultantes na evolução dirigida. As linhagens SA43-LNZ-A28 e SA43-LNZ-A30 passaram de sensíveis para resistentes aos antibióticos tedizolida, com CIM igual a 1 mg/L, e quinupristina/dalfopristina. A linhagem SA43-LNZ-A30 passou de resistente para sensível ao antibiótico amicacina.

### 5.1.5 Caracterização genotípica

Devido as alterações no padrão de sensibilidade obtido para as linhagens que apresentaram resistência ao longo da ED com LNZ, as cepas SA43-LNZ-A1, SA43-LNZ-A28 e SA43-LNZ-A34 foram submetidas ao sequenciamento do genoma.

Após sequenciamento, buscamos SNPs que resultaram em mutação não sinônima ou que pudessem alterar regiões promotoras revelando assim a causa da mudança no fenótipo. Os genomas foram inseridos no NCBI com os seguintes números de acesso: *Staphylococcus aureus* SA43 (JALAAO000000000), *Staphylococcus aureus* SA43 LNZ A28 (JALAAP000000000) e *Staphylococcus aureus* SA43 LNZ A34 (JALAAQ000000000). O genoma da linhagem após a ED, ou

no dia da obtenção das resistentes, foi comparado com o genoma do dia 1 de cada experimento e os SNPs encontrados estão na Tabela 6.

Quando comparamos as cepas SA43-LNZ-A1 e SA43-LNZ-A28 obtemos uma variação de nucleotídeo de base única (SNV, do inglês, “*single nucleotide variant*”) que altera uma guanina para adenina na posição 455 na região codificante do gene *rpIC*, que leva a substituição de aminoácido glicina para um ácido aspártico na posição 152. Entre SA43-LNZ-A1 e SA43-LNZ-A34 ocorre a mesma variação de base nitrogenada e consequente substituição de aminoácido. *rpIC* codifica a proteína L3 do ribossomo e mutações neste gene estão relacionadas a resistência à linezolida em estudos prévios, nosso resultado corrobora com esta informação. (27 – 28)

Tabela 5 - Resultado da comparação dos genomas obtidos após sequenciamento.

	Localização	Tipo	Base nitrogenada	Aminoácido	Gene, produto
<b>A1 - A28</b> <b>A28 - A1</b>	SA43_LNZ_A1_contig_71 mapping	SNV	455G>A	Gly152Asp	<i>rpIC</i> , proteína L3
<b>A28 – A1</b>	SA43_LNZ_A28_contig_279 mapping	SNV	999T>C	-	<i>yfcC</i> , antiporter
<b>A1 – A34</b> <b>A34 - A1</b>	SA43_LNZ_A1_contig_71 mapping	SNV	455G>A	Gly152Asp	<i>rpIC</i> , proteína L3
<b>A34 – A1</b>	SA43_LNZ_A34_contig_81 mapping	SNV	-	-	23S rRNA

Fonte: Elaborada pela autora.

Quando afrouxamos os parâmetros de comparação verificamos algumas alterações: o gene *yfcC* de SA43\_LNZ\_A34 está no final do *contig* 466 faltando os últimos 193 nucleotídeos. Quando comparamos SA43\_LNZ\_A34 com SA43\_LNZ\_A1, as 54 mutações no gene *yfcC* que ocorrem entre os nucleotídeos 1005 e 1071 em SA43-LNZ-A28 não estão presentes. A proteína YfcC codificada em SA43-LNZ-A28 apresenta substituição de 5 aminoácidos quando comparada à proteína completa de SA43\_LNZ\_A1: I344V, K353Q, S354Y, E391K, L405I. O gene *yfcC* que codifica uma proteína antiportadora e seu envolvimento com resistência à oxazolidinonas nunca foi

descrito. Nosso grupo ainda precisa verificar o papel de mutações nesse gene na resistência à tedizolida e à quinupristina/dalfopristina. Comparando o gene que codifica 23S rRNA de SA43-LNZ-A28 com o de SA43-LNZ-A34, observa-se a mutação A2637C somente em SA43-LNZ-A34. Estas mutações serão verificadas por sequenciamento Sanger.

Estas divergências no genoma de SA43-LNZ-A28 indica que ela foi uma linhagem selecionada, porém como a ED foi realizada em cultura líquida, há sempre uma mistura de células e talvez, células SA43-LNZ-A28 resistentes à tedizolida não tenham se perpetuado ou incluídas no próximo cultivo da ED.

Quando comparamos SA43-LNZ-A1 e SA43-LNZ-A28 obtemos uma variação de nucleotídeo de base única (SNV, do inglês, “*single nucleotide variant*”) que altera uma guanina para adenina na posição 455 na região codificante do gene *rplC*, que leva a troca de aminoácido glicina para um ácido aspártico na posição 152. Entre as SA43-LNZ-A1 e SA43-LNZ-A34 ocorre a mesma variação de base nitrogenada e consequente troca de aminoácido. A mutação no gene *rplC* está relacionada a resistência à linezolida em estudos prévios, nosso resultado corrobora com esta informação. Não houve variações entre os genomas de SA43-LNZ-A28 e SA43-LNZ-A34.

## 5.2 Tedizolida

### 5.2.1 Evolução dirigida com tedizolida

Após realização da ED com TDZ verificamos a CIM de TDZ para as linhagens do primeiro e último dia (após passagens de estabilização) por microdiluição em caldo e os valores podem ser encontrados na Tabela 7. Novamente, o experimento apresenta variações na CIM para as linhagens iniciais dos experimentos A, B e C, por partir de três colônias distintas e a técnica apresentar variação de uma diluição para cima ou para baixo. Todos os experimentos apresentaram valores de CIM similares antes e após a finalização do processo de ED, demonstrando que para exposição *in vitro*, a TDZ possui uma estabilidade maior do que a LNZ.

Tabela 6 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) de TDZ para linhagens antes e após a ED.

Linhagem	CIM TDZ (mg/L)
SA43-TDZ-A1	0,50
SA43-TDZ-A34	0,50
SA43-TDZ-B1	0,50
SA43-TDZ-B34	0,50
SA43-TDZ-C1	0,25
SA43-TDZ-C34	0,50

Fonte: Elaborada pela autora.

Determinamos também a CIM para cada dia dos experimentos A, B e C ao longo do processo de ED (Figura 11).

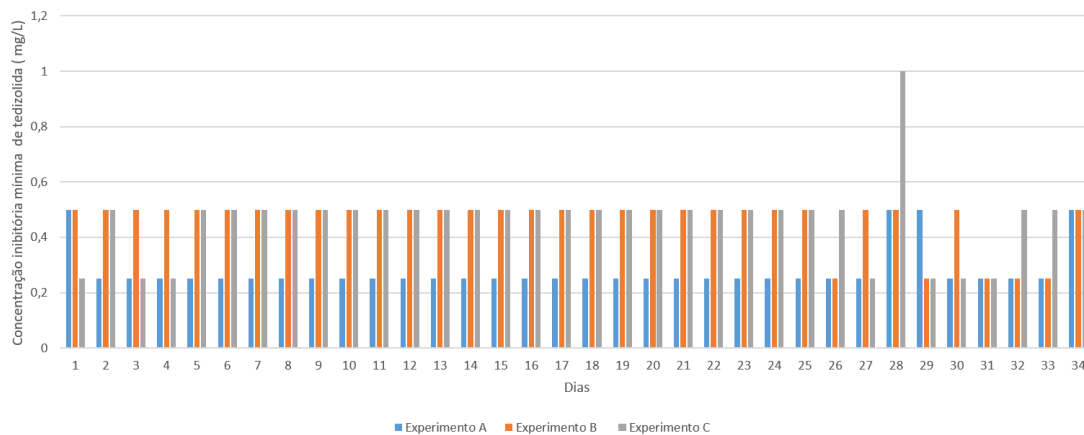


Figura 11 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) para as linhagens obtidas nos experimentos A, B e C na evolução dirigida com TDZ.

Fonte: Elaborada pela autora.

Observamos mais uma vez a presença de linhagem resistente, no experimento C, segundo os valores de referência do EUCAST/BrCAST, que define resistência para CIM igual ou superior a 1 mg/L. Realizamos o processo de estabilização em meio MHCA sem antibiótico por três dias e medimos a CIM de

todas as passagens (Figura 12). Ao longo das passagens de estabilização, a linhagem SA43-TDZ-C28 não preservou a resistência a tedizolida, podendo ter ocorrido recombinação gênica, e sua CIM regrediu para 0,5 mg/L, ou seja, novamente sensível.

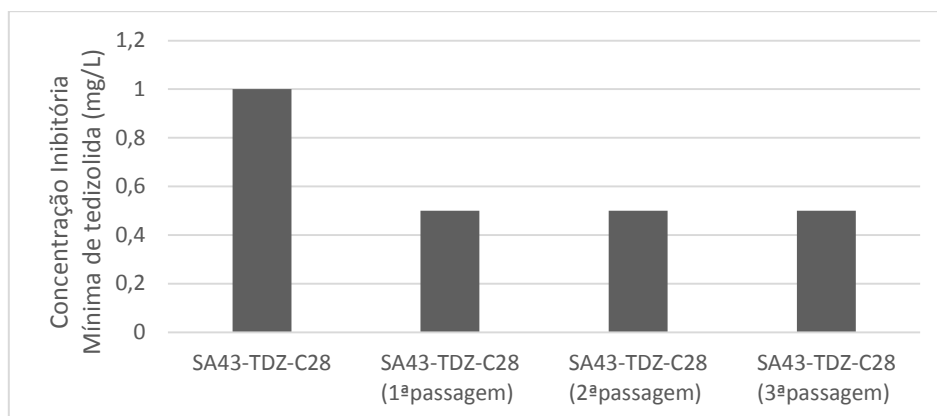


Figura 12 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) de TDZ para SA43-TDZ-C28  
Fonte: Elaborada pela autora.

### 5.2.2 Eletroforese em Gel de Campos Pulsados

Após corrida em gel de eletroforese (Figura 13) com enzima *SmaI* (Jena Bioscience, Jena, Alemanha) verificamos que há preservação do padrão de bandas, portanto concluímos que não houve contaminação em nenhum dos experimentos por outros microrganismos ao longo da ED com TDZ.

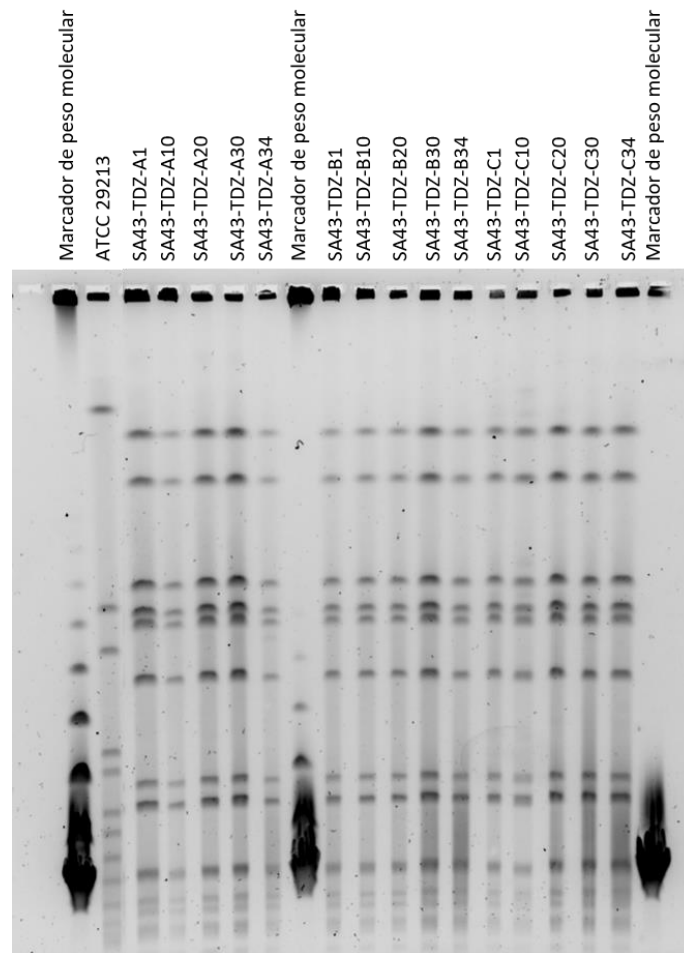


Figura 13 – Gel de PFGE de linhagens da ED com TDZ.  
Fonte: Elaborada pela autora.

### 5.2.3 Curva de crescimento e tempo de duplicação

De maneira análoga ao realizado com a LNZ, obtivemos as curvas de crescimento das linhagens da ED com TDZ (Figura 14).

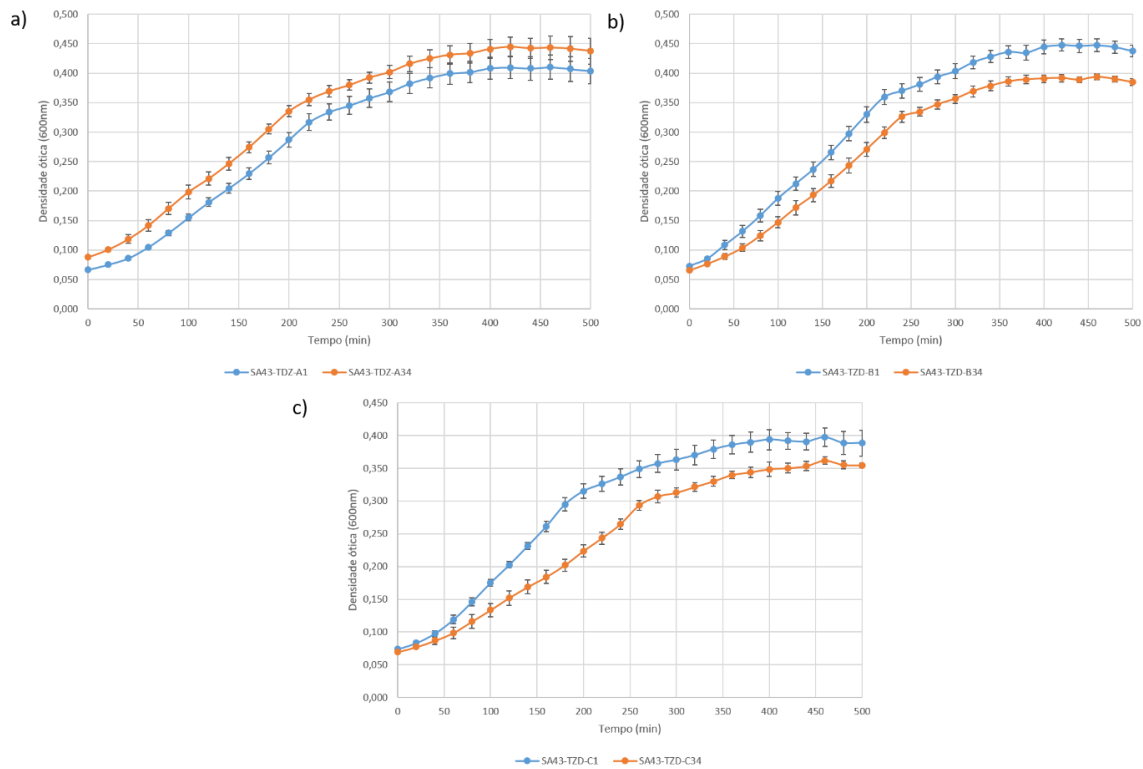


Figura 14 - Curva de crescimento de linhagens da ED com TDZ no (a) experimento A, (b) experimento B e (c) experimento C.

Fonte: Elaborada pela autora.

E os tempos de duplicação encontram-se na Tabela 8:

Tabela 7 – Tempo de duplicação das linhagens antes e após ED com TDZ.

Linhagem	Tempo de duplicação (min)	Valor de p
SA43-TZD-A1	86,94 ± 2,59	< 0,001
SA43-TZD-A34	96,51 ± 2,29	
SA43-TZD-B1	86,94 ± 2,59	>0,05
SA43-TZD-B34	92,29 ± 2,78	
SA43-TZD-C1	85,42 ± 1,14	< 0,001
SA43-TZD-C34	110,77 ± 5,27	

Valores de referência do Software GraphPad Prism: Valor de p: < 0,001 – extremamente significativa, entre 0,001 e 0,01 – muito significativa, entre 0,02 e 0,05 significativa e >0,05 sem significância.

Fonte: Elaborada pela autora.

O experimento B não apresentou alterações significativas (valor de p maior do que 0,05), porém os experimentos A e C tiveram aumento no tempo de duplicação.



Este aumento sugere um maior gasto energético envolvido na duplicação da linhagem após a evolução dirigida, e, conseqüentemente, no *fitness* bacteriano.

#### 5.2.4 Tipagem fenotípica

A CIM para daptomicina, linezolida, tedizolida e vancomicina foi determinada antes e após a ED com TDZ (Tabela 9). Não houve alterações fenotípicas para estes antibióticos, sendo todas as linhagens sensíveis segundo os valores de referência da versão 11.0 do EUCAST/BrCAST de 2021.

Tabela 8 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) por microdiluição em caldo de linhagens da ED com TDZ.

Linhagem	Concentração inibitória mínima (mg/L) e definição de sensibilidade							
	Daptomicina		Linezolida		Tedizolida		Vancomicina	
SA43-TDZ-A1	0,250	S	1,0	S	0,500	S	2	S
SA43-TDZ-A34	0,250	S	1,0	S	0,500	S	1	S
SA43-TDZ-B1	0,250	S	1,0	S	0,500	S	1	S
SA43-TDZ-B34	0,250	S	1,0	S	0,500	S	2	S
SA43-TDZ-C1	0,250	S	0,5	S	0,250	S	2	S
SA43-TDZ-C34	0,250	S	2,0	S	0,500	S	2	S
ATCC 29213	0,125	S	0,5	S	0,125	S	1	S

Classificação em R (Resistente) e S (Sensível) segundo valores de ponto de corte segundo EUCAST/BrCAST versão 11.0 de 2021.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para os antibióticos ácido fusídico, amicacina, canamicina, ciprofloxacino, cloranfenicol, gentamicina, quinupristina/dalfopristina e sulfametoxazol/trimpetoprim, avaliados por disco difusão (Tabela 10), também não foram percebidas alterações fenotípicas entre as linhagens prévia e pós ED, o que indica grande estabilidade *in vitro* para exposições prolongas a TDZ.

Tabela 9 - Perfil de sensibilidade por disco difusão de linhagens da ED com TDZ.

Disco Difusão								
Linhagem	FD	AK	K	CIP	C	CN	QD	SXT
SA43-TDZ-A1	S	R	R	R	S	S	S	S
SA43-TDZ-A34	S	R	R	R	S	S	S	S
SA43-TDZ-B1	S	R	R	R	S	S	S	S
SA43-TDZ-B34	S	R	R	R	S	S	S	S
SA43-TDZ-C1	S	R	R	R	S	S	S	S
SA43-TDZ-C34	S	R	R	R	S	S	S	S
ATCC 29213	S	S	S	S	S	S	S	S

Classificação em R (Resistente) e S (Sensível) segundo valores de ponto de corte segundo EUCAST/BrCAST versão 11.0 de 2021. FD, Ácido fusídico; AK, amicacina; K, canamicina; CIP, ciprofloxacino, C, cloranfenicol; CN, gentamicina; QD, quinupristina/dalfopristina e; SXT, sulfametoxazol/Trimetoprim

Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar de nosso estudo não obter resistência à tedizolida na ED com este fármaco, Roch *et al.* fizeram uma seleção *in vitro* a partir de linhagens de fibrose cística e selecionaram resistentes a partir do 20º dia (CIM = 1mg/L) com incremento até 4 mg/L no 40º dia. (36) Nestes isolados, as mutações eram consistentes com as já observadas na clínica, afetando os genes: *rpIC*, *rpID*, *rpIV* e o gene do 23S rRNA. Estes pesquisadores precisaram de um longo período de ED para se obter isolados resistentes concluindo que a chance de obter resistência a este fármaco é muito baixa.

Por outro lado, Shen *et al.* conseguiram um isolado resistente à tedizolida após 10 dias de seleção usando a linhagem clínica MRSA N315, resultando na mutação A1345G em *rpoB*, correspondente à substituição de aminoácidos D449N. Mutações neste gene nunca havia sido correlacionada com a resistência a oxazolidinonas. (37) CIMs de linezolida, cloranfenicol, retapamulina e quinupristina/dalfopristina aumentaram 2 log<sub>2</sub> diluições, sugerindo o surgimento do chamado fenótipo de resistência 'PhLOPSa'.

## 6 CONCLUSÕES

Os experimentos de evolução dirigida foram executados com êxito, tanto para linezolidina quanto para tedizolidina, uma vez que não foram observadas contaminações ao longo do experimento como pode ser observado no gel de PFGE.

Nenhuma das oxazolidinonas estudadas selecionaram resistentes ao final da exposição prolongada *in vitro*, permanecendo sensíveis ao final do estudo.

Houve aumento no tempo de duplicação da SA43 após ED na maioria dos casos, sugerindo possíveis mudanças no fitness bacteriano.

Apesar de algumas culturas terem apresentado resistência à LNZ e TDZ ao longo da evolução, as mesmas não se perpetuaram até o período final do experimento de evolução dirigida.

As linhagens derivadas da evolução dirigida com LNZ não sofreram alterações estáveis a todos os fármacos testados. Somente linhagens SA43-LNZ-A28 e SA43-LNZ-A30 tornaram-se resistentes para tedizolidina e quinupristina/dalfopristina. A linhagem SA43-LNZ-A30 passou a ser sensível para amicacina.

SA43-LNZ-A28 apresentou mutação em *yfcC*, coincidindo com a resistência a tedizolidina, linezolidina e quinupristina/dalfopristina, mas estas células não se mantiveram ao longo da ED; o papel de *yfcC* neste fenótipo ainda precisa ser elucidado.

O incremento da CIM de LNZ pode ter ocorrido com mutação no gene *rpIC* e do gene do 23S rRNA na SA43-LNZ-A34 ao final da ED.

Este estudo sugere que tanto TDZ quanto LNZ são bastante eficazes contra a linhagem *S. aureus* SA43 e que as chances de se selecionar resistência mesmo após exposição prolongada aos fármacos LNZ e TDZ em concentrações subinibitórias é baixa.



## REFERÊNCIAS

- 1 MONSERRAT-MARTINEZ, A.; GAMBIN, Y.; SIERECKI, E. Thinking outside the bug: molecular targets and strategies to overcome antibiotic resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 6, p. 1255, 2019.
- 2 WILLEKENS, R. *et al.* Early oral switch to linezolid for low-risk patients with staphylococcus aureus bloodstream infections: a propensity-matched cohort study. *Infectious Diseases Society of America*, v. 69, n.3, p. 381-387, 2019.
- 3 DABUL, A. N. G.; CAMARGO, I. L. B. C. Molecular characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus resistant to tigecycline and daptomycin isolated in a hospital in Brazil. *Epidemiology & Infection*, v. 142, n. 3, p. 479-483, 2014.
- 4 ITO, TERUYO, *et al.* Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant staphylococcus aureus. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 45, n. 5, p. 1323–1336, 2001.
- 5 CDC. *Antibiotic resistance threats in the United States*. 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2021.
- 6 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Prevenção de infecções por microrganismos multirresistentes em serviços de saúde*. Brasília: Anvisa, 2021. 103 p.
- 7 LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. Methicillin-resistant staphylococcus aureus: molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 31, p. 1-103, 2018.
- 8 CHAMBERS, H F. D.; FRANK, R. Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology*, v. 7, p. 629-641, 2009.
- 9 RYBAK, J. M.; ROBERTS, K. Tedizolid phosphate: a next-generation oxazolidinone. *Infectious Diseases and Therapy*, v. 4, n. 1, p. 1-14, 2015.
- 10 LIVERMORE, D. M. Linezolid in vitro: mechanism and antibacterial spectrum. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 51, p. ii9–ii16, 2003. DOI: 10.1093/jac/dkg249.
- 11 ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. ChemSpider. *Search and share chemistry*. Disponível em: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.66579.html>. Acesso em: 22 fev. 2022.
- 12 HAMEL, J. C. *et al.* Linezolid, critical characteristics. *Infection*, v. 28, n. 1, p. 60-64, 2000.
- 13 HASHEMIAN, S. M.; FARHADI, T.; GANJPARGAR, M. Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 12, p. 1759-1767, 2018. DOI: 10.2147/DDDT.S164515.
- 14 PERRY, C. M.; JARVIS, B. Linezolid, a review of its use in the management of serious Gram-positive infections. *Drugs*, v. 61, n. 4, p. 525-551, 2001.

- 15 IQBAL, K.; MILIOUDI, A.; WICHA, S. G. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tedizolid. *Clinical Pharmacokinetics*, p. 1-15, 2021. DOI: 10.1007/s40262-021-01099-7.
- 16 FLANAGAN, S. *et al.* Nonclinical and pharmacokinetic assessments to evaluate the potential of tedizolid and linezolid to affect mitochondrial function. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 59, n. 1, p. 178-215, 2015.
- 17 WANG, L. *et al.* Comparison of anti-microbial and anti-biofilm activity among tedizolid and radezolid against linezolid-resistant enterococcus faecalis isolates. *Infection and Drug Resistance*, p. 4619-4627, 2021. DOI: 10.2147/IDR.S331345.
- 18 BOUZA, E.; MUNÓZ, P.; BURILLO, A. The role of tedizolid in skin and soft tissue infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 31, n. 2, p. 131-140, 2018.
- 19 WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed*. 2017. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Acesso em: 06 jan. 2022.
- 20 MADIGAN, M. *et al.* Brock microbiology of microorganisms. 13 th ed. San Francisco: Pearson Education, 2011. Cap. 26, p. 756-784.
- 21 LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. Staphylococcus aureus and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.
- 22 CHAMBERS, HENRY F. Penicillin-Binding Protein–Mediated Resistance in Pneumococci and Staphylococci. *Journal of Infectious Diseases*, v. 179, n. 2, p. S353-S359, 1999.
- 23 FUDA, C. C.S.; FISHER, J. F.; MOBASHERY, S. b-Lactam resistance in Staphylococcus aureus: the adaptive resistance of a plastic genome. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 62, n. 22, p. 2617–2633, 2005.
- 24 LEE, ANDIE S. *et al.* Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Nature Reviews Diseases Primer*, v. 24, n. 4, p. 1-23, 2018.
- 25 ENRIGHT, M. C. *et al.* The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, n. 11, p. 7687-7692, 2002.
- 26 SANTOS, S. C. G. *et al.* Molecular epidemiology of Staphylococcus aureus in Brazil: high frequency of international epidemic/pandemic clones, CA-MRSA and perspectives. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 4, p. 35734-35751, 2021.
- 27 RUIZ-RIPA, L. *et al.* Mechanisms of linezolid resistance among clinical Staphylococcus spp. in Spain: spread of methicillin- and linezolid-resistant S. epidermidis ST2. *Microbial Drug Resistance*, v. 27, n. 2, 2021.
- 28 YOO, I. Y. *et al.* Linezolid resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Korea: high rate of false resistance to linezolid by VITEK 2 system. *Annals of Laboratory Medicine*, v. 40, n. 1, p. 57, 2020.
- 29 MUNITA, J. M. *et al.* Failure of high-dose daptomycin for bacteremia caused by daptomycin-susceptible Enterococcus faecium harboring LiaSR substitutions. *Clinical Infectious Diseases*, v. 59, p. 1277-1280, 2014.

- 30 GUERIN, F. *et al.* Molecular and functional analysis of the novel cfr(D) linezolid resistance gene identified in *Enterococcus faecium*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 75, n. 7, 2020.
- 31 KANG, HEE Y. *et al.* Emergence of cfr-mediated linezolid resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from pig carcasses. *Antibiotics*, v. 9, n. 11, p. 769, 2020.
- 32 DABUL, A. N. G. *et al.* Resistance in in vitro selected tigecycline-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 5 is driven by mutations in mepR and mepA genes. *Microbial Drug Resistance*, v. 24, n. 5, p. 519, 2017.
- 33 BANNERMAN, T. L. *et al.* Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, p. 551-555, 1995.
- 34 MAGALHÃES, V. D. *et al.* Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 64, n. 2, p. 155-161, 2005.
- 35 HALL, B. G. *et al.* Growth rates made easy. *Molecular Biology and Evolution*, v. 31, n. 1, p. 232-238, 2013.
- 36 ROCH, M. *et al.* Tedizolid is a promising antimicrobial option for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections in cystic fibrosis patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 75, n. 1, p. 126-134, 2020.
- 37 SHEN, T. *et al.* Identification of a novel tedizolid resistance mutation in rpoB of MRSA after in vitro serial passage. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 6, n. 2, p. 292, 2021.
- 38 SHAW, K. J.; POPPE, S.; SCHAADT, R. In vitro activity of TR-700, the antibacterial moiety of the prodrug TR-701, against linezolid-resistant strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, n. 12, p. 4442-4447, 2008.
- 39 JIANG, J.; HOU, Y.; DUAN, M. Design, synthesis and antibacterial evaluation of novel oxazolidinone derivatives nitrogen-containing fused heterocyclic moiety. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 32, 2021. DOI: 10.1016/j.bmcl.2020.127660.
- 40 TORRES, C., ALONSO, C. A. E RUIZ-RIPA, L. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. *Microbiology Spectrum*, v. 6, n. 4, 2018. DOI: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0032-2018.
- 41 DESHPANDE, L. M.; CASTANHEIRA, M.; FLAMM, R. K. Evolving oxazolidinone resistance mechanisms in a worldwide collection of enterococcal clinical isolates: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 73, n. 9, p. 2314-2322, 2018.
- 42 MOURE, Z., LARA, N., MARIN, M. Interregional spread in Spain of linezolid-resistant *Enterococcus* spp. isolates carrying the oprA and poxtA genes. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 55, n. 6, p. 105977, 2020.
43. LI, P.; YANG, Y.; DING, L. Molecular investigations of linezolid resistance in enterococci OptrA variants from a hospital in Shanghai. *Infection and Drug Resistance*, v. 13, p. 2711-2716, 2020. DOI: 10.2147/IDR.S251490.





## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

USP - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - FMUSP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Evolução dirigida de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) com linezolida e tedizolida e o impacto frente à sensibilidade a diversos antimicrobianos e à formação de biofilme

**Pesquisador:** Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 18878619.8.0000.0065

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.534.903

#### Apresentação do Projeto:

Infecções causadas por *Staphylococcus aureus* são recorrentes no ambiente hospitalar e casos de isolados multirresistentes causam grande preocupação. O tratamento de tais infecções, muitas vezes, torna-se um obstáculo devido a interações medicamentosas e problemas de toxicidade das drogas disponíveis no mercado. Linezolida e tedizolida são antimicrobianos da classe das oxazolidinonas aprovados no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em junho de 2000 e dezembro de 2017, respectivamente, introduzidos para tratamento de infecções de pele e anexos causadas por microrganismos Gram-positivos, como enterococos resistentes à vancomicina (VRE, do inglês Vancomycin Resistant Enterococci) e *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA, do inglês Methicillin Resistant *S. aureus*). Acredita-se que a exposição em concentrações subinibitórias aos antibióticos linezolida e tedizolida possa selecionar mutantes resistentes a estes antibióticos e que estes mutantes possam também ter seu perfil de sensibilidade a outros antimicrobianos alterado. O objetivo do presente projeto é selecionar linhagens de *S. aureus* resistente à linezolida e à tedizolida *in vitro*, e buscar por determinantes de resistência já descritos, em tais linhagens. Assim, será possível comparar o desenvolvimento de resistência às duas oxazolidinonas disponíveis no mercado.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

**Endereço:** DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36  
**Bairro:** PACAEMBU **CEP:** 01.246-903  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 3.534.903

Expor um MRSA de uma linhagem isolada no Brasil à linezolida e à tedizolida, antibióticos da classe das oxazolidinonas, em concentrações subinibitórias para verificar se mutantes resistentes são isolados e se isso ocorre dentro de 30 dias de exposição. Verificar os mecanismos de resistência envolvidos.

Objetivo Secundário:

Objetivos secundários são observar se a exposição da bactéria à linezolida e tedizolida in vitro, a longo prazo, altera a resposta da bactéria também a outros antibióticos de importância clínica e se influencia na formação de biofilmes.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Manipulação de agente (*S. aureus*) com risco moderado para o manipulador e baixo para a comunidade; há sempre um tratamento preventivo disponível.

Benefícios:

De maneira simples e eficaz espera-se obter informações sobre mecanismos de resistência relacionados ao uso de oxazolidinonas em uma linhagem brasileira de *Staphylococcus aureus*.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Estudo bem desenhado e relevante por estudar o processo de resistência do *S. aureus* a antibióticos utilizando uma amostra brasileira, de modo a representar o que é encontrado nos nossos hospitais

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Dispensado de TCLE, pois no projeto os autores trabalharão com uma amostra bacteriana clínica previamente isolada e identificada pelo hospital e que foi caracterizada pelo mesmo grupo em um estudo epidemiológico molecular já publicado. O estudo contará apenas com a bactéria isolada de um paciente em 2009, mas não influenciará o tratamento do paciente que foi hospitalizado e preservará sua identidade. Além disso não há material humano envolvido.

**Recomendações:**

Sugerimos considerar cadastro da amostra bacteriana e seu genoma no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen). Desconsiderem a sugestão, caso o procedimento já tenha sido realizado.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto não implica em análise por este Comitê de Ética em Pesquisa por não envolver pesquisa em humanos.

**Endereço:** DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36  
**Bairro:** PACAEMBU **CEP:** 01.246-903  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)3893-4401 **E-mail:** cep\_fm@usp.br

USP - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 3.534.903

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1382209.pdf	12/08/2019 11:06:59		Aceito
Outros	projeto_assinado_pelo_pesquisador.pdf	12/08/2019 11:06:33	LETICIA ZENATTI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa_Leticia_Zenatti.pdf	25/06/2019 11:29:23	LETICIA ZENATTI	Aceito
Folha de Rosto	capa_assinada.pdf	25/06/2019 11:26:22	LETICIA ZENATTI	Aceito
Brochura Pesquisa	IlanaCamargoprojeto.pdf	18/06/2019 16:56:43	Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo	Aceito

**Situação do Parecer:**

Retirado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 27 de Agosto de 2019

Assinado por:

**Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

**Bairro:** PACAEMBU

**CEP:** 01.246-903

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3893-4401

**E-mail:** cep.fm@usp.br