



RESISTÊNCIA AO CEFTIOFUR EM *ESCHERICHIA COLI*: RELAÇÃO ENTRE O REGULADOR ROB E OS MECANISMOS DE EFLUXO

Alex Costa de Sousa¹; Wendy Johana Velasco García² Octávio Luiz Franco³

¹Medicina – Universidade Católica de Brasília;

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia – Universidade Católica de Brasília;

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia – Universidade Católica de Brasília.

E-mail: alex.csousa@a.ucb.br; wendy.garcia@a.ucb.br; ocfranco@p.ucb.br

RESUMO

A resistência antimicrobiana constitui um problema relevante na mastite bovina por *Escherichia coli*, comprometendo a eficácia terapêutica e a produtividade leiteira. Entre os mecanismos relacionados à resistência, destacam-se as bombas de efluxo, reguladas por proteínas como Rob, envolvida na ativação de genes associados ao transporte e à resistência. Este estudo objetivou analisar a expressão do gene *rob* em linhagens de *E. coli* resistentes ao ceftiofur, verificando sua associação com a indução da resistência. A resistência foi caracterizada pelo ensaio de concentração inibitória mínima. Para investigação da expressão gênica, foram elaborados *primers* para quantificação de *rob* por RT-qPCR, acompanhada de genes de referência. Os resultados preliminares demonstram diferenças fenotípicas de sensibilidade ao ceftiofur e alteração molecular em *rob*, mas ainda não permitem associar a resistência à sua expressão. As etapas de RT-qPCR e análise da expressão relativa permitirão avaliar a modulação de *rob* e sua relação com a resistência ao ceftiofur.

Palavras-chave: Resistência Antimicrobiana; Rob; Bombas de Efluxo.

INTRODUÇÃO

A resistência aos antimicrobianos reduz a eficácia dos tratamentos e favorece a persistência de bactérias capazes de sobreviver à exposição a esses agentes. Em bactérias Gram-negativas, pode resultar de alterações na permeabilidade da membrana, modificação do alvo, inativação enzimática e aumento da atividade dos sistemas de efluxo. As bombas de efluxo transportam diferentes compostos para fora da célula e podem contribuir para a resistência a múltiplas classes de antimicrobianos. Na mastite bovina, a resistência antimicrobiana representa um desafio para o tratamento de infecções por *Escherichia coli*, podendo comprometer a produção e a qualidade do leite e gerar perdas econômicas decorrentes da redução da produção, do descarte de leite e dos custos de tratamento e manejo (Goulart & Mellata, 2022). A pressão seletiva associada ao uso de antibióticos favorece a seleção de bactérias resistentes, enquanto os sistemas de efluxo constituem uma importante estratégia de adaptação. Entre esses sistemas, as bombas da superfamília RND destacam-se em bactérias Gram-negativas por reconhecerem e exportarem diferentes substratos em resposta a alterações ambientais e à presença de antimicrobianos (Novelli & Bolla, 2024).

Em *Escherichia coli*, Rob é uma proteína reguladora da família AraC/XylS, envolvida na ativação de genes relacionados à adaptação celular, ao transporte e à resistência a diferentes compostos. Sua estrutura inclui regiões associadas ao reconhecimento de DNA e à modulação de sua atividade (Shi et al., 2022). Rob também possui participação em redes regulatórias responsivas a estímulos químicos e relacionadas ao transporte e à adaptação bacteriana (Binsfeld et al., 2025). Embora *rob* esteja relacionado à regulação de respostas associadas à resistência e ao efluxo, ainda não está estabelecido se a indução da resistência ao ceftiofur nas linhagens estudadas está



acompanhada por alteração em sua expressão. A identificação de uma alteração em *rob* nas linhagens resistentes também levanta a possibilidade de associação entre a modificação genética e o fenótipo observado.

Determinar se a indução da resistência está acompanhada por alteração na expressão de *rob* permitirá avançar da caracterização fenotípica para uma interpretação molecular do processo. Essa análise poderá indicar se *rob* participa da adaptação observada ou se a diferença de MIC ocorre independentemente de sua modulação transcricional, contribuindo para compreender a participação de reguladores associados ao efluxo na resistência bacteriana. Para isso, propõe-se integrar a caracterização da resistência ao ceftiofur à caracterização molecular de *rob* e à sua expressão gênica, combinando a determinação de MIC, a identificação e a avaliação estrutural da alteração encontrada em *rob*, e a quantificação de seu transcrito por RT-qPCR.

OBJETIVO

O objetivo do projeto envolve analisar a expressão do gene *rob* em *Escherichia coli* resistente ao ceftiofur, verificando se a indução da resistência está associada a alterações na expressão do gene regulador relacionado ao sistema de efluxo AcrAB-TolC. Como etapas necessárias, pretende-se caracterizar o perfil de sensibilidade das linhagens ao ceftiofur, caracterizar a alteração molecular identificada em *rob* e comparar a expressão de *rob* entre as condições experimentais por RT-qPCR.

MÉTODO

As linhagens utilizadas neste estudo foram obtidas a partir de isolados de *Escherichia coli* provenientes de vacas com mastite bovina. A partir da linhagem parental, induziu-se a resistência ao ceftiofur por exposição das bactérias ao antimicrobiano, o que permitiu a seleção de variantes adaptadas à pressão seletiva. Desse processo, foram obtidas as linhagens L1 e L3, posteriormente utilizadas para comparação com a linhagem parental na caracterização do fenótipo de resistência.

Inicialmente, a resistência das linhagens foi caracterizada por meio do ensaio de concentração inibitória mínima (MIC) com ceftiofur. Foram avaliadas concentrações de ceftiofur, na faixa de 0,125 a 32 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, em triplicata, permitindo comparar as respostas das linhagens e determinar a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano. Os resultados dessa caracterização são apresentados na seção de Resultados.

Em paralelo, foi realizada a caracterização molecular da variante identificada no gene *rob*, incluindo o levantamento da alteração genética e a comparação entre as formas de referência e mutante. A análise estrutural foi realizada por *AlphaFold2*, sendo utilizada como ferramenta complementar para comparar as estruturas preditas das formas de referência e mutante, sem considerar, isoladamente, a diferença estrutural como evidência de alteração funcional.

Para a investigação da expressão gênica, foram realizados o desenho e a análise dos oligonucleotídeos utilizando as ferramentas *Primer3Plus* e *OligoAnalyzer*. Foram selecionados os genes de referência *idnT*, *gyrA*, *gapA*, *rrsA*, *rpoD* e *degS* para a quantificação da expressão do gene *rob* por RT-qPCR. Foi realizada a extração do RNA das amostras, seguida de sua quantificação e avaliação da qualidade.

RESULTADOS

A caracterização preliminar demonstrou diferença clara na sensibilidade ao ceftiofur entre as linhagens. L1 apresentou MIC de 8 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ e L3 de 16 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, enquanto a linhagem parental apresentou MIC de 1 $\mu\text{g/mL}^{-1}$. Portanto, L1 e L3 apresentaram MICs 8 e 16 vezes superiores à



parental, respectivamente, sustentando a presença de um fenótipo de maior tolerância ao antimicrobiano.

Também foi identificada uma mutação F163L (TTC→CTC) no gene *rob*, decorrente de uma substituição T→C na posição 29.895, registrada no contig RA|rob_2|NODE_13_length_87418_cov_34.73225587418|29895. A partir dessa alteração, foi realizada a modelagem estrutural das formas de referência e mutante. Os modelos apresentaram alta confiança predita, constituindo evidência inicial para a etapa de caracterização molecular.

O material genético da linhagem parental, analisado nas condições com e sem antibiótico, apresentou concentrações determinadas por Qubit entre 246 e 357 ng/mL⁻¹, correspondentes a valores convertidos de 49,2 a 71,4 µg/mL⁻¹. A avaliação da qualidade por espectrofotometria apresentou razões A260/280 entre 0,24 e 0,36. Devido aos baixos valores obtidos para essa razão, será realizada uma nova extração de RNA, a fim de garantir material genético com qualidade adequada para as análises posteriores de expressão gênica.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que a indução da resistência ao ceftiofur promoveu alterações fenotípicas relevantes nas linhagens de *Escherichia coli*, evidenciadas pelo aumento da MIC nas linhagens L1 e L3 em comparação à linhagem parental. A identificação da mutação F163L no gene *rob* e a caracterização estrutural das formas de referência e mutante ampliaram a caracterização molecular das linhagens resistentes e forneceram subsídios para investigar a possível participação desse regulador no fenótipo observado.

Dessa forma, a integração entre os resultados fenotípicos e moleculares obtidos estabelece uma base para a continuidade da investigação dos mecanismos envolvidos na resistência ao ceftiofur. A análise da expressão de *rob* por RT-qPCR permitirá avaliar se a indução da resistência também está associada à modulação de sua expressão, contribuindo para compreender a participação de Rob e do sistema de efluxo AcrAB-TolC na resposta adaptativa de *E. coli* ao antimicrobiano.

REFERÊNCIAS

- Binsfeld, C., Olayo-Alarcon, R., Pérez Jiménez, L., Wartel, M., Stadler, M., Mateus, A., Müller, C., & Brochado, A. R. (2025). Systematic screen uncovers regulator contributions to chemical cues in *Escherichia coli*. *PLOS Biology*, 23(7), e3003260. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3003260>
- Goulart, D. B., & Mellata, M. (2022). *Escherichia coli* mastitis in dairy cattle: Etiology, diagnosis, and treatment challenges. *Frontiers in Microbiology*, 13, 928346. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.928346>
- Novelli, M., & Bolla, J.-M. (2024). RND efflux pump induction: A crucial network unveiling adaptive antibiotic resistance mechanisms of Gram-negative bacteria. *Antibiotics*, 13(6), 501. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13060501>
- Shi, J., Wang, F., Li, F., Wang, L., Xiong, Y., Wen, A., Jin, Y., Jin, S., Gao, F., Feng, Z., Li, J., Zhang, Y., Shang, Z., Wang, S., Feng, Y., & Lin, W. (2022). Structural basis of transcription activation by Rob, a pleiotropic AraC/XylS family regulator. *Nucleic Acids Research*, 50(10), 5974–5987. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac433>

Financiamento: Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) e pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF).