



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Hanalydia de Melo Machado

Análise do transcriptoma de isolados de *Neisseria gonorrhoeae*: Investigação sobre o perfil de sensibilidade à ceftriaxona

Florianópolis

2020

Hanalydia de Melo Machado

Análise do transcriptoma de isolados de *Neisseria gonorrhoeae*: Investigação sobre o perfil de sensibilidade à ceftriaxona

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Biociências

Orientador: Prof. Ricardo Ruiz Mazzon, Dr.

Coorientadora: Prof^a. Maria Luiza Bazzo, Dra.

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Machado, Hanalydia de Melo

Análise do transcriptoma de isolados de *Neisseria gonorrhoeae*: Investigação sobre o perfil de sensibilidade à ceftriaxona / Hanalydia de Melo Machado ; orientador, Ricardo Ruiz Mazzon, coorientadora, Maria Luiza Bazzo, 2020.

124 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. *Neisseria gonorrhoeae*. 3. Resistência bacteriana. 4. Transcriptoma. 5. Expressão gênica. I. Mazzon, Ricardo Ruiz . II. Bazzo, Maria Luiza . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Hanalydia de Melo Machado

Análise do transcriptoma de isolados de *Neisseria gonorrhoeae*: Investigação sobre o perfil de sensibilidade à ceftriaxona

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Nilton Erbet Lincopan Huenuman, Dr.
Universidade de São Paulo

Profa. Patrícia Hermes Stoco, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Biociências

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Ricardo Ruiz Mazzon, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2020

AGRADECIMENTOS

Nestes dois anos que passaram em um abrir e fechar de olhos, aprendi que não é fácil fazer pesquisa no Brasil, mas com a ajuda e parceria de pessoas especiais todo esse processo fica menos difícil e muito recompensador.

Eu agradeço imensamente à Prof^a. Maria Luiza Bazzo, que desde a ideia deste projeto sempre apoiou seu desenvolvimento, acreditou que eu fosse capaz de executá-lo e proporcionou todos os meios para que ele fosse concluído; agradeço por todos os ensinamentos, incentivos, conselhos e por me inspirar com seu profissionalismo e amor pela ciência;

Prof. Ricardo Ruiz Mazzon, agradeço por me aceitar como aluna de mestrado mesmo sem me conhecer e por me orientar no vasto universo da genética bacteriana... muito obrigada por todos os ensinamentos e pela paciência nos meus momentos de ausência;

Prof. Guilherme Toledo e Silva, sua ajuda foi fundamental para a execução deste trabalho, muito obrigada por toda a disposição desde o início em me auxiliar nas análises;

Colegas e amigos do LBMMS: vocês fazem os dias de trabalho pesado serem leves... é muito bom compartilhar o dia com vocês, obrigada pela companhia e pelo ombro amigo tão necessário quando as coisas não vão bem;

Agradeço especialmente a Jéssica Motta Martins e ao Marcos André Schorner pela ajuda na bancada e em todos os trabalhos do gonolab.

Martin, meu companheiro desde 2010, este ano completaremos 10 anos juntos. Já são quase 5 convivendo diariamente, enfrentando todos os nossos problemas, nossas angústias e crescendo juntos. Só nós sabemos o que passamos neste último ano... não foi nada fácil, mas tenho certeza de que superamos porque estávamos juntos. Muito obrigada pela paciência, por cuidar de mim, por entender meus momentos introspectivos, meu estresse e por me oferecer um hambúrguer vegano quando eu estava cansada e com fome. Você é minha metade e eu te amo todos os dias. Amo estar na nossa casa com você e com nossos filhos-gatos.

Agradeço à minha mãe, minha irmã, meu padrasto e minha vó: vocês são essenciais na minha vida e seu apoio permitiu que eu chegasse até essa etapa. Amo muito vocês!

Sogra, sogra, cunhadas e cunhado: vocês são pessoas muito especiais na minha vida, obrigada por tudo.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina e o Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências que me proporcionaram uma formação acadêmica de alto nível.

Agradeço aos membros titulares da banca, Prof. Nilton Erbet Lincopan Huenuman, Profª. Patrícia Hermes Stoco, e aos membros suplentes, Profª. Thaís Marques Sincero e Prof. Diogo Robl, pela disponibilidade em avaliar este trabalho.

“In a dark place we find ourselves, and a little more knowledge lights our way”.

Yoda

RESUMO

Neisseria gonorrhoeae (NG) é o agente etiológico da gonorreia, infecção sexualmente transmissível que afeta cerca de 78 milhões de pessoas por ano. Desde a implementação do tratamento, o gonococo desenvolveu rapidamente diversos mecanismos de resistência às múltiplas classes de antimicrobianos utilizadas para tratar a infecção. Atualmente, a ceftriaxona (CRO) é o fármaco utilizado no tratamento de primeira linha recomendado pela Organização Mundial da Saúde, apesar de já existir casos de resistência descritos. Considerando a possibilidade da infecção gonocócica tornar-se intratável, existe a necessidade de compreender mecanismos moleculares e fenotípicos relacionados a resistência antimicrobiana, principalmente à CRO. Neste estudo, sequenciamos alguns genes (*mtrR*, *penA*, *ponA* e *porB*) de 16 isolados com diferentes MIC para CRO e realizamos RNA-Seq para avaliar os mecanismos de resistência. Para realizar a análise do transcriptoma, um isolado clínico de NG (MIC CRO 0.125mg/L) foi cultivado em placas de meio GC (R) e em placas com meio GC acrescido da concentração subinibitória de CRO (0.06mg/L) (RC) e um isolado com MIC CRO 0.0005mg/L foi cultivado em placas de meio GC (S). Foi realizado o sequenciamento de RNA Illumina (Novaseq 100bp *paired-end*) em triplicatas biológicas. A análise dos dados do RNA-Seq foi realizada no sistema Rockhopper. A análise das mutações nos genes sequenciados foi feita na plataforma NGSTAR. Os padrões encontrados para os isolados com MIC CRO (0,03 – 0,125mg/L) foram os seguintes: *mtrR*: -35A del, *ponA*: L421P, *penA*: mosaico, *porB*: G120K / A121D. Os isolados com MIC < 0,004mg/L não apresentaram mutações em sua maioria. Os padrões de mutação encontrados nos isolados com redução de sensibilidade são idênticos ao de isolados que possuem resistência à CRO (MIC \geq 0,250mg/L), demonstrando a falta de diferenciação genotípica em cepas com sensibilidade distinta à CRO. Ao analisar os dados de RNA-Seq, foi possível identificar 244 genes diferencialmente expressos entre o isolado S e o isolado R. Entre os 20 genes com maior diferença na expressão, 7 estão relacionados a proteínas associadas ao fago, 5 são RNAs antissenso e 4 estão relacionados ao sistema de modificação-restrição do tipo III. Na comparação entre o isolado RC e o isolado R, foi possível observar 116 genes diferencialmente expressos, e entre os 20 genes com maior diferença na expressão encontramos 10 RNAs antissenso e 3 genes de proteínas hipotéticas. Foi possível observar que o sistema de restrição-modificação do tipo III pode ter relevância no fenótipo de resistência à CRO, bem como a transcrição de genes associados ao fago, presentes no transcriptoma dos 3 experimentos, o que carece de validação experimental. Além disso, a presença de CRO parece induzir uma resposta ao dano do DNA em NG, mediada por DinB e RecA. Ainda, verificamos que os componentes genômicos de resistência não são exclusivamente responsáveis por determinar a resistência à CRO. Observamos numerosas proteínas hipotéticas e a presença de RNAs antissenso nos experimentos sugerindo regulações transcricionais. Devido à ausência de informação revisada do genoma de NG, não foi possível realizar o enriquecimento de dados do conjunto de genes diferencialmente expressos, destacando um ponto nevrálgico das análises *in silico*.

Palavras-chave: *Neisseria gonorrhoeae*. Transcriptoma. Resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

Neisseria gonorrhoeae (NG) is the etiological agent of gonorrhoea, a sexually transmitted infection that affects about 78 million people per year. Since the implementation of the treatment, gonococcus rapidly developed resistance mechanisms to the multiple classes of antimicrobials used to treat the infection. Nowadays, ceftriaxone (CRO) is the drug used as a first-line treatment recommended by the World Health Organization (WHO), although resistance to this drug was already described. Owing to the possibility of the gonococcal infection becoming untreatable, there is a need to understand the molecular and phenotypic mechanisms related to antimicrobial resistance mainly to ceftriaxone. In this study, we sequenced some genes (*mtrR*, *penA*, *ponA* and *porB*) and performed RNA sequencing to evaluate resistance mechanisms. To perform the transcriptome analysis, the NG isolate (MIC CRO 0.125mg/L) (R) was cultured in both GC medium plates and GC medium plates with CRO subinhibitory concentration (0.06mg/L) (RC) and a isolate with MIC CRO 0.0005mg/L was culture in GC medium plates (S). Illumina RNA sequencing was performed (Novaseq 100bp paired-end) in biological triplicates. RNA-Seq data analysis was performed in Rockhopper system. The SNP patterns found for MIC CRO isolates (0.03 - 0.125mg / L) were as follows: *mtrR*: -35A del, *ponA*: L421P, *penA*: mosaic, *porB*: G120K / A121D. The isolates with MIC <0.004mg /L did not present mutations mostly. The mutation patterns found in isolates with reduced sensitivity are identical to those of isolates that have resistance to CRO (MIC \geq 0.250mg/L), showing the lack of genotypic differentiation in strains with unequal susceptibility to CRO. By analyzing RNA-Seq data, it was possible to identify 244 genes differentially expressed between isolate S and isolate R. Among the 20 genes with major difference in expression, 7 are related to phage-associated proteins, 5 are antisense RNAs and 4 are related to the type III modification-restriction system. In the comparison between the RC isolate and the R isolate, it was possible to observe 116 differentially expressed genes, and among the 20 genes with the greatest difference in expression, we found 10 antisense RNAs and 3 hypothetical protein genes. It was possible to observe that the type III restriction-modification system may have relevance in the CRO resistance phenotype, as well as the transcription of genes associated with the phage, present in the transcriptome of the 3 experiments, which lacks experimental validation. In addition, the presence of CRO appears to induce a response to DNA damage in NG, mediated by DinB and RecA. Furthermore, we found that genomic resistance components are not exclusively responsible for determining resistance to CRO. We observed numerous hypothetical proteins and the presence of antisense RNAs in the experiments suggesting transcriptional regulations. Due to the lack of revised information on the NG genome, it was not possible to enrich data on the set of differentially expressed genes, highlighting fragile point of *in silico* analysis.

Keywords: *Neisseria gonorrhoeae*. Transcriptome. Antimicrobial resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	17
Figura 2. Representação da estrutura das membranas de NG.....	18
Figura 3. Esquema representativo da invasão de NG em células epiteliais	21
Figura 4. Linha do tempo: Introdução dos antimicrobianos e emergência da resistência em NG	23
Figura 5. Exemplo esquemático de modificação do alvo do antimicrobiano por meio de mutação.....	26
Figura 6. Fluxograma metodológico do estudo	35
Figura 7. Qualidade e concentração do RNA: réplica da condição S	54
Figura 8 . Média de qualidade da biblioteca 2S_1	55
Figura 9. HeatMap dos 20 genes com maior diferença de expressão entre os experimentos.....	59
Figura 10. Modelo estrutural predito para produto do gene NGO1069	69
Figura 11. Modelo estrutural predito para produto do gene NGO1197	70
Figura 12. Modelo estrutural predito para produto do gene NGO1215	72
Figura 13. Qualidade e concentração do RNA: réplica da condição S	95
Figura 14. Qualidade e concentração do RNA: réplica da condição S	95
Figura 15. Qualidade e concentração do RNA: réplica da condição R.....	96
Figura 16. Qualidade e concentração do RNA: réplica da condição R.....	96
Figura 17. Qualidade e concentração do RNA: réplica da condição R.....	97
Figura 18. Qualidade e concentração do RNA: réplica da condição RC	97
Figura 19. Qualidade e concentração do RNA: réplica da condição RC	98
Figura 20. Qualidade e concentração do RNA: réplica da condição RC	98
Figura 21. Média do Score Phred por base dos <i>reads</i> referentes a biblioteca 2S_2..	99
Figura 22. Média do Score Phred por base dos <i>reads</i> referentes a biblioteca 3S_1	100
Figura 23. Média do Score Phred por base dos <i>reads</i> referentes a biblioteca 3S_2	100
Figura 24. Média do Score Phred por base dos <i>reads</i> referentes a biblioteca 4S_1	101
Figura 25. Média do Score Phred por base dos <i>reads</i> referentes a biblioteca 4S_2	101
Figura 26. Média do Score Phred por base dos <i>reads</i> referentes a biblioteca 4R_1	102
Figura 27. Média do Score Phred por base dos <i>reads</i> referentes a biblioteca 4R_2	102

Figura 28. Média do Score Phred por base dos <i>reads</i> referentes a biblioteca 5R_1	103
Figura 29. Média do Score Phred por base dos <i>reads</i> referentes a biblioteca 5R_2	103
Figura 30. Média do Score Phred por base dos <i>reads</i> referentes a biblioteca 6R_1	104
Figura 31. Média do Score Phred por base dos <i>reads</i> referentes a biblioteca 6R_2	104
Figura 32. Média do Score Phred por base dos <i>reads</i> referentes a biblioteca 2RC_1	105
.....	105
Figura 33. Média do Score Phred por base dos <i>reads</i> referentes a biblioteca 2RC_2	105
.....	105
Figura 34. Média do Score Phred por base dos <i>reads</i> referentes a biblioteca 3RC_1	106
.....	106
Figura 35. Média do Score Phred por base dos <i>reads</i> referentes a biblioteca 3RC_2	106
.....	106
Figura 36. Média do Score Phred por base dos <i>reads</i> referentes a biblioteca 4RC_1	107
.....	107
Figura 37. Média do Score Phred por base dos <i>reads</i> referentes a biblioteca 4RC_2	107
.....	107

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Pontos de corte da CIM para Ceftriaxona e Cefixima definidos pelo CLSI	36
Quadro 2. Isolados selecionados e respectiva concentração inibitória mínima para Ceftriaxona e Cefixima	36
Quadro 3. Iniciadores utilizados para PCR e sequenciamento	38
Quadro 4. Reagentes e suas respectivas concentrações utilizadas na PCR.....	38
Quadro 5. RNAs antissenso e suas características encontradas no programa INTA-RNA	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes escolhidos de acordo com logFC e respectivas sequências dos iniciadores com tamanho de produto de amplificação.....	45
Tabela 2. Mutações nos genes <i>penA</i> , <i>ponA</i> , <i>mtrR</i> e <i>porB</i> e concentração inibitória mínima de ceftriaxona nos 16 isolados e nas duas cepas de referência (WHO O e WHO Y). 49	49
Tabela 3. STs dos 16 isolados e das cepas de referência WHO O e WHO Y.	52
Tabela 4. Dados obtidos no programa Trimomatic.....	55
Tabela 5. Dados do mapeamento no genoma de referência de NG FA1090.....	56
Tabela 6. Lista dos 20 genes que apresentaram maior diferença de expressão entre as condições S <i>versus</i> R.....	63
Tabela 7. Lista dos 20 genes que apresentaram maior diferença de expressão entre as condições R <i>versus</i> RC.....	70
Tabela 8. Descrição dos iniciadores, eficiência e concentração na reação.....	81
Tabela 9. Genes diferencialmente expressos com informações da base de dados Gene Ontology na comparação R <i>versus</i> S	109
Tabela 10. Genes diferencialmente expressos com informações da base de dados Gene Ontology na comparação R <i>versus</i> RC	111
Tabela 11. Lista com os 244 genes diferencialmente expressos na comparação do isolado R com o isolado S	113
Tabela 12. Lista dos 116 genes diferencialmente expressos na comparação do experimento R e RC.....	120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA DNA complementar

DNA do inglês *desoxiribonucleic acid*

FC do inglês *fold-change*

FDR do inglês *False discovery rate*

gDNA DNA genômico

HIV do inglês *Human immunodeficiency virus*

IST Infecção sexualmente transmissível

MIC do inglês *Minimum inhibitory concentration*

nmol Nanomol

M Molar

mM Milimolar

NGS do inglês *Next generation sequencing*

NG *Neisseria gonorrhoeae*

nM Nanomolar

OMS Organização Mundial de Saúde

nt Nucleotídeos

Pb Pares de base

PCR do inglês *polymerase chain reaction*

PE do inglês *Paired-end*

pmol Picomol

PPG Programa de Pós-Graduação

RIN do inglês *RNA integrity number*

RNA do inglês *ribonucleic acid*

RNA-seq do inglês *RNA sequencing*

RT-qPCR do inglês *Reverse transcription quantitative real time polymerase chain reaction*

SNP do inglês *Single nucleotide polymorfism*

UFSC Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	NEISSERIA GONORRHOEAE	17
2.2	GONORREIA.....	19
2.3	PATOGÊNESE	20
2.4	DIAGNÓSTICO	21
2.5	EPIDEMIOLOGIA.....	22
2.6	TRATAMENTO e resistência antimicrobiana.....	23
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVO GERAL	33
3.1.1	Objetivos Específicos	33
4	METODOLOGIA.....	35
4.1	SELEÇÃO DOS ISOLADOS	35
4.1.1	Sequenciamento Sanger.....	37
4.1.1.1	<i>Extração de DNA.....</i>	37
4.1.1.2	<i>Reação em cadeia da polimerase (PCR)</i>	37
4.1.1.3	<i>Sequenciamento.....</i>	39
4.1.1.4	<i>NG-MAST.....</i>	39
4.1.1.5	<i>NG-STAR.....</i>	40
4.2	RNA-SEQ	40
4.2.1	Desenho do experimento de RNA-Seq	40
4.2.2	Extração de RNA	41
4.2.3	Sequenciamento do RNA.....	42
4.2.4	Análise dos dados do RNA-Seq	43

4.3	RT-QPCR.....	44
4.3.1	Transcrição Reversa	46
4.3.2	Eficiência dos iniciadores	46
4.3.3	Genes Normalizadores.....	47
4.3.4	Quantificação relativa do mRNA.....	48
5	RESULTADOS e DISCUSSÃO	49
5.1	SEQUENCIAMENTO SANGER	49
5.2	BIOANALYZER.....	53
5.3	FASTQC	54
5.4	TRIMOMATIC	55
5.5	MAPEAMENTO E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS GENES	
	56	
5.6	PADRONIZAÇÃO RT-QPCR.....	78
6	CONCLUSÃO.....	83
	REFERÊNCIAS.....	85
	APÊNDICE A – Resultados Bioanalyzer	95
	APÊNDICE B – Resultados FASTQC	99
	APÊNDICE C – Resultados Gene Ontology	109
	APÊNDICE D – Listas de genes diferencialmente expressos.....	113

1 INTRODUÇÃO

Neisseria gonorrhoeae (NG) caracteriza-se por ser o agente etiológico da gonorreia e o único patógeno verdadeiro do gênero *Neisseria*, o qual inclui o patógeno oportunista *Neisseria meningitidis* e outras espécies comensais que colonizam a nasofaringe humana, tais como *Neisseria lactamica* e *Neisseria cinerea* (MCSHEFFREY; GRAY-OWEN, 2014).

NG é um patógeno exclusivamente humano, e quando infecta homens, a uretrite causa secreção uretral e disúria na maioria dos casos. A incubação ocorre, tipicamente, em um período de 2-5 dias após a exposição. A maioria dos estudos aponta que apenas a minoria dos homens infectados permanecerá assintomática. A epididimite aguda pode caracterizar uma complicação da gonorreia urogenital e casos mais raros incluem edema peniano e prostatite (MORGAN; DECKER, 2016).

Em mulheres, a gonorreia urogenital apresenta-se assintomática em mais de 85% dos casos (DETELS et al., 2011) e a manifestação mais comum é a cervicite com secreção vaginal, sangramento, prurido e disúria. O período de incubação varia entre 5 e 10 dias após exposição. Dor abdominal e dispaneuria são sintomas que sugerem o envolvimento do trato genital superior. A doença inflamatória pélvica (DIP) é a complicação mais comum observada em mulheres (10-20%), e pode evoluir para endometrite, salpingite, abscessos tubo-ovarianos, adesões peritoneais e pélvicas, e em aproximadamente 15% dos casos, leva à infertilidade (MAYOR; ROETT; UDUHIRI, 2012; MORGAN; DECKER, 2016).

Na prática clínica, o tratamento para a gonorreia é, na maioria das vezes, recomendado empiricamente, na primeira visita clínica, utilizando-se de antimicrobianos recomendados de acordo com diretrizes de tratamento. Como o diagnóstico da gonorreia é baseado na microscopia de Gram, ou, em alguns casos, em testes moleculares, testes de sensibilidade antimicrobiana são realizados raramente, e, portanto, os resultados não estão disponíveis para utilização clínica (UNEMO; DEL RIO; SHAFER, 2016).

NG tem competência natural de transferir genes completamente ou parcialmente durante seu ciclo de vida, e pode, efetivamente, modificar seu genoma por meio de todos os tipos de mutação. Esses mecanismos são utilizados para se adaptar rapidamente e sobreviver nos ambientes frequentemente hostis nos diferentes sítios do hospedeiro humano. O gonococo adquiriu ou desenvolveu todos os tipos de mecanismos fisiológicos de resistência aos antimicrobianos recomendados no tratamento: destruição ou modificação do antimicrobiano por meio de enzimas; modificação ou proteção do alvo que reduz a afinidade pelos

antimicrobianos; diminuição do influxo dos antimicrobianos e aumento do efluxo dos antimicrobianos (UNEMO; SHAFER, 2014).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças de Atlanta (CDC) anunciou em 2012, que NG havia se tornado um “*Superbug*”, e dessa forma, uma ameaça urgente à saúde pública. Alguns isolados resistentes à ceftriaxona, recomendação atual de tratamento, já foram isolados desde 2011 de pacientes no Japão, França e Austrália (SUAY-GARCÍA; PÉREZGRACIA, 2017).

Em abril de 2018, foi relatado na Inglaterra o primeiro caso de NG resistente a todos os antimicrobianos recomendados. O tratamento dessa infecção gonocócica foi realizado empiricamente, utilizando o carbapenêmico Ertapenem intravenoso durante 3 dias (PUBLIC HEALTH ENGLAND, 2018).

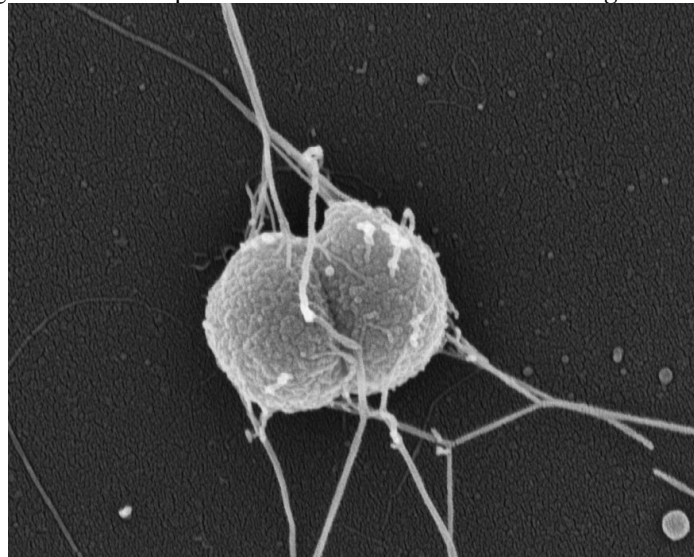
No caso do gonococo, os mecanismos de resistência à ceftriaxona ainda não estão bem esclarecidos (GONG et al., 2016; ZHAO et al., 2009). Dessa forma, novas abordagens que buscam explorar e reconhecer as diferentes respostas ao estresse microbiano e os sistemas de defesa envolvidos, são necessárias para esclarecer a resistência aos antibióticos (BELENKY et al., 2015; DWYER; KOHANSKI; COLLINS, 2009). A abordagem por meio do RNA-Seq é essencial para entender a estrutura das vias de transcrição que regulam a resistência aos antimicrobianos e como isso implica um circuito regulatório complexo a fim de ativar a resposta de acordo com os diferentes estímulos percebidos (PAIS et al., 2016).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NEISSERIA GONORRHOEAE

Neisseria gonorrhoeae (Zopf 1885) Trevisan 1885 (Figura 1) é um diplococo gram-negativo, oxidase-positivo, fastidioso, não flagelado, não formador de esporos, não encapsulado e capnofílico, pertencente ao grupo filogenético betaproteobacteria e à família *Neisseriaceae* (CHEN et al., 1989; PENNA; HAJJAR; BRAZ, 2000). As colônias possuem aspecto marrom-rosado e são translúcidas, com consistência lisa e margens definidas de 0,5-1 mm de diâmetro (ROSENBERG; DELONG; THOMPSON, 2019).

Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura de *Neisseria gonorrhoeae*

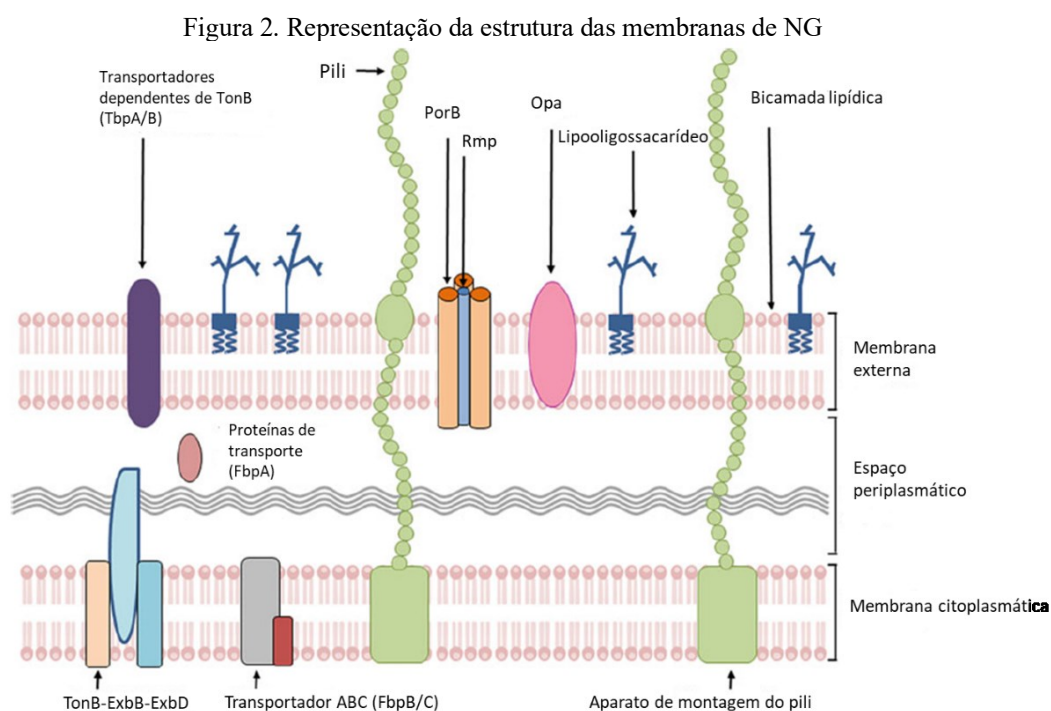


Fonte: eurekaalert.org Acesso em: 18/01/2020.

Caracteriza-se por ser o agente etiológico da gonorreia e o único patógeno verdadeiro do gênero *Neisseria*, o qual inclui o patógeno oportunista *Neisseria meningitidis*, e outras espécies comensais que colonizam a nasofaringe humana, tais como *N. lactamica* e *N. cinerea* (BERNARDINI et al., 2004). As espécies do gênero *Neisseria*, são, em geral, bem adaptadas aos seus nichos: mucosas humanas. Esta característica afetou a capacidade bioquímica desses microrganismos de modo a restringir o número de fontes de carbono que podem metabolizar além de terem perdido a capacidade de sintetizar nutrientes que estão disponíveis nos tecidos infectados. Dessa forma, é possível utilizar esses aspectos para distinguir *NG* de outras espécies de *Neisseria*. O gonococo é naturalmente resistente aos antimicrobianos colistina,

vancomicina e trimetoprim e produz ácido apenas por meio do metabolismo oxidativo da glicose, diferente das outras espécies do gênero que podem utilizar maltose, lactose, sacarose ou frutose (MCSHEFFREY; GRAY-OWEN, 2014).

A parede celular do gonococo é similar as outras bactérias gram-negativas e consiste em uma membrana citoplasmática interna, uma camada média contendo peptidoglicana e o espaço periplasmático e uma membrana externa, contendo uma mistura complexa de fosfolípidos, lipooligossacarídeos e proteínas, organizados como uma bicamada lipídica assimétrica, conforme ilustrado na figura 2 (CHRISTODOULIDES, 2019).



Fonte: Adaptado do Livro *Neisseria gonorrhoeae: Methods and Protocols*, 2019.

O lipopolissacarídeo (LPS) de *Neisseria gonorrhoeae* (NG) não possui o componente polissacarídeo O repetido, clássico do LPS, sendo comumente referido como lipooligossacarídeo (LOS). O lipídeo A hidrofóbico, componente da LOS gonocócica, tem uma estrutura principal, mas pode variar de acordo com o número de fosfoésteres e cadeias acil presentes (MCSHEFFREY; GRAY-OWEN, 2014).

2.2 GONORREIA

A gonorreia, infecção sexualmente transmissível (IST), possui descrições encontradas em escritas chinesas de mais de 4000 anos e citações na literatura egípcia, grega e hebraica do período. No entanto, apenas em 1879, Albert Neisser descreveu o microrganismo encontrado em esfregaços corados de exsudatos purulentos observados em casos de cervicite aguda, uretrite e oftalmia neonatal. Em 1882 foi realizado o primeiro cultivo do gonococo por Leistikow (JUDSON, 1990).

O gonococo é um patógeno exclusivamente humano, e quando infecta homens, a uretrite causa secreção uretral e disúria na maioria dos casos. A incubação ocorre, tipicamente, em um período de 2-5 dias após a exposição. A maioria dos estudos aponta que apenas a minoria dos homens infectados permanecerá assintomática. A epididimite aguda pode caracterizar uma complicação da gonorreia urogenital e casos mais raros incluem edema peniano e prostatite (MORGAN; DECKER, 2016).

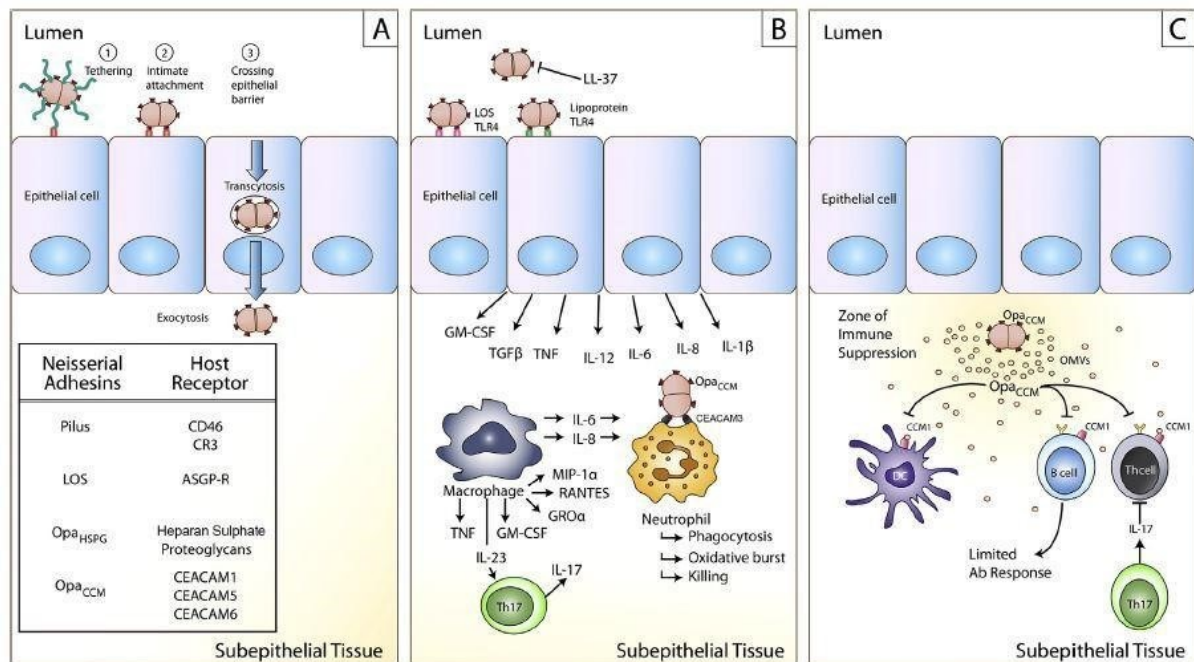
Em mulheres, a gonorreia urogenital apresenta-se assintomática em mais de 85% dos casos (DETELS et al., 2011) e a manifestação mais comum é a cervicite com secreção, sangramento, prurido e disúria. O período de incubação varia entre 5 e 10 dias após exposição. Dor abdominal e dispneúria são sintomas que sugerem o envolvimento do trato genital superior. A doença inflamatória pélvica (DIP) é a complicação mais comum observada em mulheres (10-20%), e pode evoluir para endometrite, salpingite, abscessos tubo-ovarianos, adesões peritoneais e pélvicas, e em aproximadamente 15% dos casos, leva à infertilidade (MAYOR; ROETT; UDUHIRI, 2012; MORGAN; DECKER, 2016).

Eventualmente, alguns indivíduos podem desenvolver infecções disseminadas com complicações sistêmicas (LOHANI et al., 2016). A infecção gonocócica anorectal e de orofaringe podem ser adquiridas por pessoas praticantes de sexo oral receptivo, relação anal, ou mesmo por contaminação pelo contato com secreções cervicais/uretrais. Além disso, essas infecções são frequentemente assintomáticas e permanecem como reservatórios da infecção (UNEMO; SHAFER, 2014). Adultos também podem apresentar conjuntivite, no entanto, a exposição do recém-nascido com secreções infectadas durante o parto é a forma mais frequente de conjuntivite gonocócica (NG; MARTIN, 2005).

2.3 PATOGÊNESE

A patogênese de NG é caracterizada pelo início da infecção com a adesão das células bacterianas no ápice da mucosa epitelial do hospedeiro, por ligação dos *pilus* do gonococo, aos receptores CD46 e/ou ao receptor de complemento 3 (CR3). A retração do *pilus* possibilita o contato do gonococo com as células epiteliais. A adesão é mediada pelos LOS de NG, ligando a bactéria aos receptores asialoglicoproteína (ASGP-R) e proteínas associadas à opacidade das colônias (Opa), que se ligam à família de moléculas de adesão relacionadas ao antígeno carcinoembriônico (CEACAM). Esse processo ativa a transcitose da bactéria através das células epiteliais e sua saída para o espaço subepitelial (figura 3-A). Em decorrência dessas etapas, os tecidos do hospedeiro detectam NG e mobilizam uma resposta imune. As células epiteliais reconhecem o gonococo via receptores Toll-Like e podem eliminar o gonococo por meio da secreção do peptídeo antimicrobiano LL-37. A resposta imune é perpetuada pelas citocinas e quimiocinas liberadas pelas células epiteliais infectadas e pelos macrófagos, os quais secretam IL-17, que leva a uma resposta de células Th17 na infecção gonocócica. Em resposta às quimiocinas e aos fatores bacterianos, os neutrófilos são recrutados para o tecido. Essas células se ligam a NG utilizando como “armadilha” o receptor CEACAM3, que resulta na fagocitose e morte bacteriana (figura 3-B). No entanto, NG possui mecanismos para evadir e suprimir a resposta imune do hospedeiro. O gonococo libera vesículas de membrana exterior (OMVs), derivadas de sua própria membrana externa. As OMVs contêm proteínas Opa que podem se ligar ao receptor CEACAM1 expressos na superfície das células do sistema imune. As proteínas Opa que se ligam à CEACAM1 inibem a função das células dendríticas, células B e células T auxiliares. Além disso, a resposta Th17 induzida pelo gonococo suprime a resposta adaptativa das células T (figura 3-C) (MCSHEFFREY; GRAY-OWEN, 2014).

Figura 3. Esquema representativo da invasão de NG em células epiteliais



Legenda: A: representação da transcitose da bactéria através das células epiteliais e sua saída para o espaço subepitelial; B: recrutamento de neutrófilos para o tecido que se ligam a NG utilizando como “armadilha” o receptor CEACAM3, ocasionando fagocitose e morte bacteriana; C: liberação de OMVs por NG com proteínas que se ligam ao receptor CEACAM1 expressos na superfície das células do sistema imune e podem inibir a função das células dendríticas, células B e células T auxiliares. Fonte: Mcsheffrey; Gray-Owen, 2014.

NG é capaz de captar ferro da transferrina e lactoferrina humana por meio de vias distintas, mas paralelas, de expressão de receptores de alta afinidade para cada glicoproteína. Estes receptores consistem em duas proteínas repressoras de ferro de membrana externa: as proteínas ligadoras de transferrina ou lactoferrina A (TbpA/LbpA) e B (TbpB/LbpB). Além disso, o ferro pode ser adquirido da hemoglobina utilizando o receptor de hemoglobina HmbR e também de complexos de haptoglobina utilizando o receptor bipartite HpuAB (ROSENBERG; DELONG; THOMPSON, 2019).

2.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico etiológico da gonorreia é estabelecido pela identificação do gonococo nas secreções genitais, retais, faríngeas e oculares. A cultura e os testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs) são métodos utilizados para detecção do patógeno, bem como a visualização microscópica da bactéria, realizada a partir da coloração de Gram em um esfregaço da secreção. No entanto, a microscopia tem baixa sensibilidade em amostras de

homens e mulheres assintomáticos e na identificação das infecções retais e endocervicais. No caso da infecção faríngea, a microscopia apresenta baixa especificidade e sensibilidade, uma vez que a faringe é colonizada por *Neisserias* comensais. A cultura é um teste de baixo custo que permite o isolamento e identificação da espécie NG, por meio das provas da catalase (+), oxidase (+), e açúcares (glicose+). Além disso, atualmente é o único teste que possibilita determinar o perfil de sensibilidade antimicrobiana e promover o monitoramento da evolução da resistência aos antimicrobianos (MARRAZZO; HANDSFIELD; SPARLING, 2010; BIGNELL; UNEMO, 2013; UNEMO; SHAFER, 2014).

Na prática clínica, o tratamento para a gonorreia é, na maioria das vezes, recomendado empiricamente, na primeira visita clínica, utilizando-se de antimicrobianos recomendados em diretrizes de tratamento. Como o diagnóstico etiológico da gonorreia é realizado, principalmente, com base na microscopia de Gram, ou em testes moleculares, os testes de sensibilidade antimicrobiana são realizados raramente, não disponíveis para utilização clínica (UNEMO; DEL RIO; SHAFER, 2016).

2.5 EPIDEMIOLOGIA

A cada dia, estima-se mundialmente mais de um milhão de novos casos de infecções sexualmente transmissíveis curáveis em pessoas com idade entre 15-49 anos. Assim, o número total de casos por ano chega a 376 milhões. Desses, 87 milhões são causados por *Neisseria gonorrhoeae*, colocando a gonorreia como a segunda infecção sexualmente transmissível mais prevalente no mundo. Além das complicações que podem ser ocasionadas por infecções gonocócicas não tratadas, a gonorreia aumenta o risco de adquirir e transmitir a infecção pelo HIV (ROWLEY et al., 2019).

No Brasil, o ministério da saúde estima a ocorrência de mais de nove milhões de casos por ano no grupo com faixa etária entre 15-49 anos, no entanto, essa estimativa possui uma limitação, pois é proveniente de dados obtidos em pequenos estudos com diferentes subpopulações em sete estados brasileiros entre os anos de 2002 a 2012, ao invés de ser embasada em dados de notificação epidemiológica (COSTA-LOURENÇO et al., 2017).

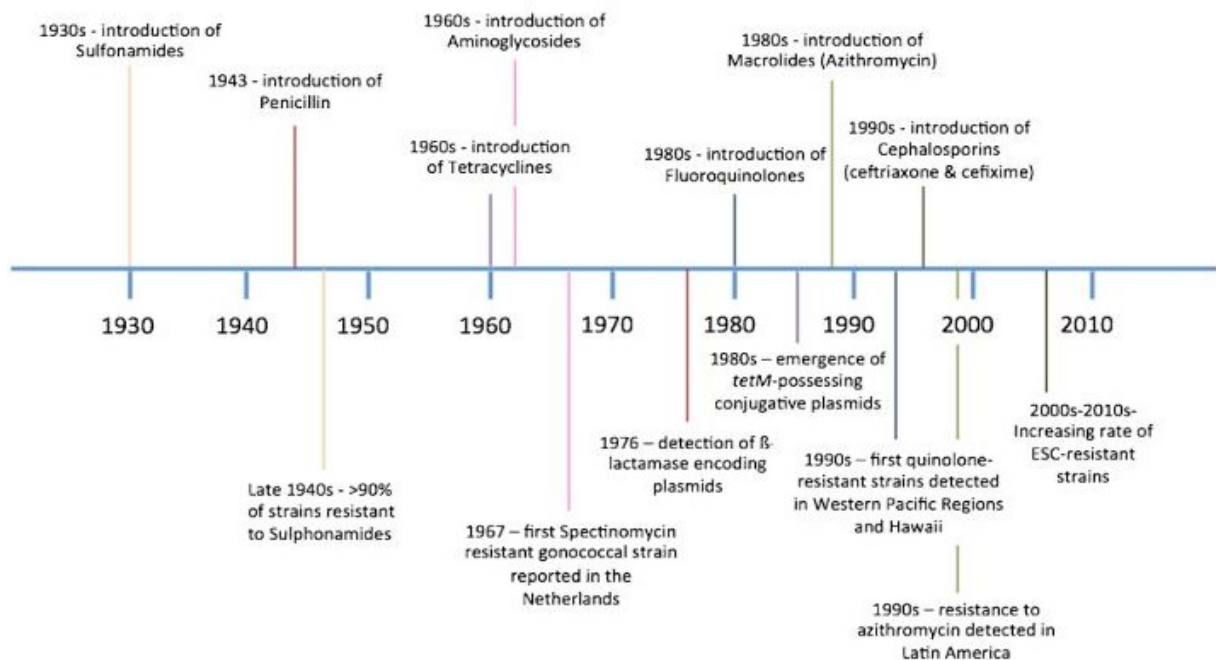
O controle da gonorreia na saúde pública depende totalmente do tratamento antimicrobiano apropriado em conjunto com esforços diretos e generalizados sobre prevenção, uso do diagnóstico etiológico, processo de notificação de parcerias sexuais e vigilância epidemiológica (UNEMO; SHAFER, 2011).

2.6 TRATAMENTO E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

NG possui competência natural de transferir genes completamente ou parcialmente durante seu ciclo de vida, e pode, efetivamente, modificar seu genoma por meio de todos os tipos de mutação. Esses mecanismos são utilizados para se adaptar rapidamente e sobreviver nos ambientes frequentemente hostis dos diferentes sítios do hospedeiro humano. O gonococo adquiriu ou desenvolveu os mecanismos fisiológicos de resistência aos antimicrobianos recomendados no tratamento: destruição ou modificação do antimicrobiano por meio de enzimas; modificação ou proteção do alvo que reduz a afinidade pelos antimicrobianos; diminuição do influxo dos antimicrobianos e aumento do efluxo dos antimicrobianos (UNEMO; SHAFER, 2014).

Esses fatores contribuem para que o tratamento da gonorreia seja complicado, sendo preconizada a terapia com dois antimicrobianos diferentes. A evolução dos mecanismos de resistência e a frequência que a bactéria os incorpora demanda atenção dos países às diretrizes para o tratamento da infecção gonocócica que precisam ser atualizadas frequentemente em resposta às mudanças nos padrões de sensibilidade antimicrobiana de NG. O aumento da resistência à maioria dos antimicrobianos que tratavam infecções gonocócicas tem sido reportado mundialmente, conforme observado na figura 4 (WHO, 2015, 2016).

Figura 4. Linha do tempo: Introdução dos antimicrobianos e emergência da resistência em NG



Fonte: Suay-García; Pérez-Gracia, 2017.

A ausência de diagnóstico e tratamento permite a continuidade da transmissão da infecção gonocócica, além de promover a transmissão de outras ISTs (UNEMO; SHAFER, 2011). Atualmente, a OMS preconiza a utilização de ceftriaxona 500mg intramuscular mais 1g de azitromicina via oral para o tratamento da infecção gonocócica urogenital não complicada (WHO, 2016).

Durante os anos 1930, a terapia de escolha para tratamento da gonorreia foram as sulfonamidas. Porém, depois de 15 anos, foram reportados 75% de falha em tratamentos com esses medicamentos. Essa classe de antimicrobianos atua como um substrato competitivo pela enzima dihidropteroato sintetase (DHPS), na síntese de ácido fólico. A resistência do gonococo é alcançada pelo aumento da produção do substrato utilizado ou pela síntese de uma DHPS com mutação que diminui a afinidade pelo antimicrobiano (COSTA-LOURENÇO et al., 2017).

A penicilina foi utilizada com sucesso por décadas, porém, sua concentração inibitória mínima (CIM) começou a aumentar, e nos anos de 1980, a dose de penicilina para tratamento da gonorreia estava 24 vezes maior que a inicial. Por ser um antimicrobiano betalactâmico, a penicilina inibe a síntese da parede celular ao ligar-se nas enzimas transpeptidases, conhecidas como proteínas de ligação à penicilina (PBP) no periplasma. Os mecanismos de resistência à penicilina no gonococo estão relacionados à diminuição da sensibilidade pelo acúmulo de mutações cromossômicas em diferentes genes relacionados à biossíntese da parede celular (*penA* e *penA1*) ou em estruturas que afetam a concentração periplasmática do fármaco (*penB*, *penC* e *mtrR*) (COSTA-LOURENÇO et al., 2017).

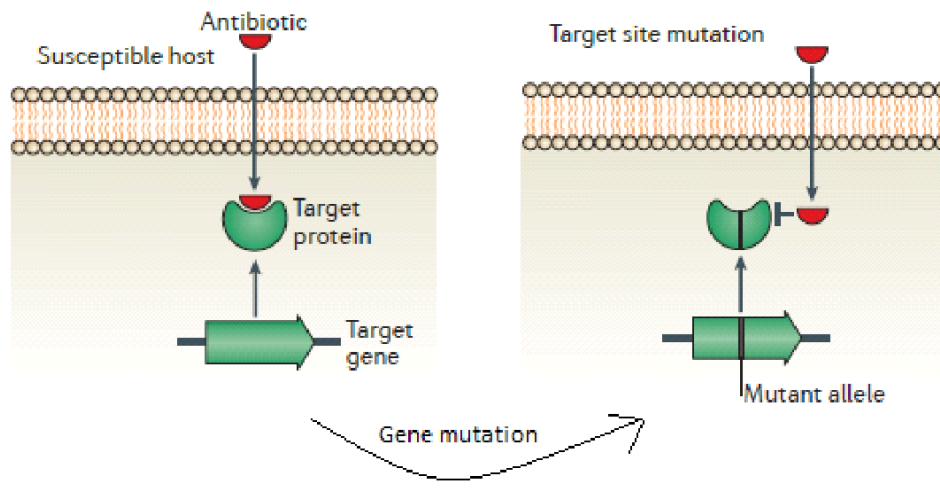
A tetraciclina era um antimicrobiano alternativo para quem possuía alergia à penicilina; seu mecanismo afeta a síntese de proteínas bacteriana ao ligar-se na subunidade 30S do ribossomo. Porém, com a emergência de cepas resistentes que continham o plasmídeo *tetM* (responsável pela resistência fenotípica, que protege o ribossomo da ligação com a tetraciclina) esse antimicrobiano foi removido dos protocolos de tratamento em meados dos anos 1980 (RICE et al., 2017).

Muitos determinantes de resistência originaram-se do acúmulo de mutações cromossômicas e apenas dois genes oriundos de plasmídeos conhecidos foram descritos: resistência à penicilina associada ao *blaTEM*, e a resistência à tetraciclina, associada ao *tetM* (HILL; MASTERS; WACHTER, 2016).

Os microrganismos podem adquirir resistência *de novo* por meio da adaptação evolutiva, ou via transferência horizontal de genes determinantes de resistência entre as bactérias. A resistência pode ser mantida de três maneiras: (1) a resistência não afeta o *fitness* bacteriano e permanece na população na ausência da pressão seletiva ocasionada pelos antimicrobianos; (2) os custos fisiológicos podem ser compensados por meio de mutações em sítios secundários; (3) o acúmulo de mutações que ocasionam resistência a diferentes antimicrobianos, permite que essas mutações não selecionadas isoladamente permaneçam na população (MELNYK; WONG; KASSEN, 2015).

A resistência às quinolonas, que têm como principal representante o ciprofloxacino, pode ocorrer devido a rotas bioquímicas diferentes, as quais podem coexistir na mesma bactéria em determinado tempo, produzindo um efeito adicional e frequente, aumentando os níveis de resistência (HARRISON et al., 2016). O gonococo desenvolveu resistência ao ciprofloxacino por meio de mutações que reduzem a afinidade da ligação do antimicrobiano à DNA girase (Figura 2), codificada pelos genes *gyrA* e *gyrB*, e topoisomerase IV, codificada pelos genes *parC* e *parE*. O alvo primário é o gene *gyrA*, no entanto, isolados com maiores níveis de resistência possuem adicionalmente, polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene *parC* (UNEMO; DEL RIO; SHAFER, 2016). As quinolonas bloqueiam a liberação da abertura da dupla fita de DNA, e ao fazê-la, inibem a atividade enzimática, bem como estabilizam complexos catalíticos e assim, o DNA serve como uma barreira para o movimento da forquilha de replicação, levando à quebra da dupla fita de DNA, caracterizando a atividade bactericida do antimicrobiano (HOOPER; JACOBY, 2015). As alterações promovidas por mutações em *gyrA* e *parC*, que conferem resistência ao ciprofloxacino, diminuem as oportunidades das moléculas de quinolona formarem e estabilizarem o complexo de clivagem quinolona-DNA girase (MUNITA et al., 2016).

Figura 5. Exemplo esquemático de modificação do alvo do antimicrobiano por meio de mutação



Fonte: Adaptado de Blair et al., 2014.

As cefalosporinas de espectro estendido (ESCs) ceftriaxona e cefixima, são recomendadas como medicamentos de primeira linha para o tratamento da infecção gonocócica mundialmente (WHO, 2016). Esses antimicrobianos, assim como as penicilinas, pertencem ao grupo dos beta-lactâmicos, e interferem na síntese da parede celular da bactéria, inibindo a síntese da camada de peptidoglicano, um processo que é dependente da proteína ligadora de penicilina (PBP), que atua como enzima nesse processo. As ESCs exercem sua ação antimicrobiana ao se ligarem e inativarem as PBPs, ocasionando lise osmótica na bactéria (KLEIN; CUNHA, 1995). A resistência às ESCs em NG é mediada pelo cromossomo bacteriano e ocorre por meio da aquisição gradual de pelo menos três determinantes de resistência: *penA*, o qual codifica para uma variante mosaico da PBP2, que funciona durante a divisão celular e ocasiona alterações aminoacídicas; *mtrR*: mutações no promotor e/ou na sequência de codificação do gene repressor *mtrR* causam uma superexpressão do sistema de bomba de efluxo MtrCDE, o que aumenta a expressão da bomba de efluxo MtrC-MtrD-MtrE; e *penB*, que codifica para mutações na porina de membrana externa PorB1b e diminuem o influxo de antimicrobianos no espaço periplasmático. Enquanto todos os determinantes de resistência mencionados contribuem para a resistência às ESCs, a remodelagem do alvo letal das ESCs, a PBP2, é a mais importante. Os alelos mosaico de *penA* codificam variantes alteradas de PBP2 com até 63 substituições de aminoácidos que surgem de múltiplos eventos de recombinação entre o gene *penA* do gonococo e alelos *penA* de espécies comensais e

oportunistas de *Neisseria* (*N. sicca*, *N. cinerea*, *N. perflava*, *N. flavescens*, and *N. meningitidis*). As ESCs são substratos análogos à cadeia C-terminal acyl-D-Ala-D-Ala do peptídeo glicano, que elimina as bactérias por inibir covalentemente as transpeptidases PBP que realizam as ligações cruzadas do peptídeo glicano (VINCENT et al., 2018). Alguns estudos de isolados com sensibilidade reduzida à ESCs, sugerem que os polimorfismos em *ponA* (que codifica PBP1) e *pilQ*, (codifica a proteína PilQ secretina formadora de poro no pili tipo IV) envolvidos em resistência de alto nível às penicilinas, não estão fortemente relacionados ao aumento das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) das ESCs. A mutação L421P na PBP1 diminui as taxas de acilação dos antimicrobianos beta-lactâmicos e reduz a afinidade da proteína pela penicilina, resultando em alto nível de resistência à penicilina. Essa mutação também foi observada em isolados com redução de sensibilidade às cefalosporinas de terceira geração. Apesar da descrição de diversos mecanismos de resistência relacionados às ESCs, é possível afirmar que um determinante dessa resistência ainda é desconhecido (ZHAO et al., 2009; OHNISHI et al., 2011; GONG et al., 2016).

A persistência dos determinantes de resistência também sugere que esses fatores não causam impactos negativos na aptidão biológica do gonococo. Na verdade, a resistência aos antimicrobianos pode ser relacionada com o aumento da aptidão bacteriana, demonstrado com o sistema de efluxo MtrCDE, o qual contribui para a virulência e sobrevivência do gonococo durante a infecção. Essa bomba de efluxo pode reconhecer e expelir não apenas antimicrobianos hidrofóbicos como penicilina, ESCs, macrolídeos, tetraciclina e ciprofloxacino, mas também, componentes antimicrobianos da resposta imune inata do hospedeiro, como peptídeos antimicrobianos, sais biliares e progesterona, permitindo que a bactéria sobreviva na célula hospedeira (HILL; MASTERS; WACHTER, 2016). Até o momento, cinco bombas de efluxo gonocócicas que exportam diversos tipos de substratos foram descritas. Dessas, a mais estudada é a MtrCDE, a qual pertence à família divisão-nodulação-resistência de diversas bactérias gram-negativas. MtrCDE captura e exporta agentes estruturalmente diversos mas geralmente anfipáticos como agentes antimicrobianos, incluindo macrolídeos, beta-lactâmicos, peptídeos antimicrobianos catiônicos, corantes e detergentes. A contribuição da bomba de efluxo MtrCDE na resistência antimicrobiana (AMR) expressada pelo gonococo pode ser aumentada por mutações cis- ou trans- ativas que resultam na superexpressão do operon *mtrCDE* (ROUQUETTE-LOUGHLIN et al., 2018).

Diversos casos de isolados com diminuição da sensibilidade às ESCs têm sido reportados. A diminuição na sensibilidade e a resistência às ESCs têm sido associadas a mutações em diferentes genes (GIANECINI et al., 2016, 2017). Essas mutações resultam em baixa afinidade pelas ESCs e conseqüente diminuição na sensibilidade a esses antimicrobianos, o que levanta a possibilidade das infecções gonocócicas tornarem-se intratáveis (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012; LEWIS, 2014; WI et al., 2017).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças de Atlanta (CDC) anunciou em 2012, que *NG* havia se tornado um “*Superbug*” e uma ameaça urgente à saúde pública. *NG* resistentes à ceftriaxona já foram isoladas desde 2011 de pacientes no Japão, França e Austrália (OHNISHI et al., 2011; UNEMO et al., 2012; NAKAYAMA et al., 2016; SUAY-GARCÍA; PÉREZ-GRACIA, 2017).

Em abril de 2018, foi relatado na Inglaterra o primeiro caso de *NG* resistente a todos os antimicrobianos recomendados. O tratamento dessa infecção gonocócica foi realizado empiricamente, utilizando o carbapenêmico Ertapenem intravenoso durante 3 dias (PUBLIC HEALTH ENGLAND, 2018).

Em 2015, no Brasil, foi realizado o primeiro estudo de vigilância da resistência de *NG* aos antimicrobianos pelo grupo GASP Brasil (*Gonococcal Antimicrobial Surveillance Program*) o qual incluiu sete centros coletores de secreção uretral masculina distribuídos nas cinco regiões do Brasil. Foram enviados ao laboratório referência 584 isolados clínicos de *NG* e destes 550 foram viáveis e incluídos no estudo. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pelo método de ágar diluição para os antimicrobianos: penicilina, tetraciclina, azitromicina, ceftriaxona e cefixima. Os resultados demonstraram altos níveis de resistência à tetraciclina, penicilina, ciprofloxacino, alguns isolados resistentes à azitromicina, e, apesar de não observar isolados resistentes às ESCs, alguns isolados já demonstraram CIM elevada para esses antimicrobianos (BAZZO et al., 2018).

Diante dessas características observamos a mudança gradativa entre a recomendação de um antimicrobiano seguido de sua descontinuidade, que em pouco tempo tornaram-se indisponíveis para o tratamento da gonorreia. No Brasil, o protocolo clínico de diretrizes terapêuticas (PCDT) recomendava, até 2016, a utilização de ciprofloxacino e azitromicina para tratamento da infecção gonocócica anogenital em maiores de 18 anos. Após o primeiro estudo de vigilância da resistência de *NG* aos antimicrobianos realizado no Brasil no qual foi observado a circulação de isolados resistentes ao ciprofloxacino em todo o território nacional,

o Ministério da Saúde publicou uma nota informativa recomendando o uso da ceftriaxona no tratamento da infecção pelo gonococo e desaconselhando o uso do ciprofloxacino (BRASIL, 2017). Em 2019, o Ministério da Saúde em 2019 publicou a atualização do Protocolo Clínico de Diretrizes Terapêuticas (PCDT) para as ISTs, no qual definiu o novo tratamento para a síndrome do corrimento uretral com base nos estudos realizados por Bazzo e colaboradores (2018) e de acordo com a terapia dupla preconizada pela OMS; além disso, o PCDT traz recomendações alternativas no caso de infecções complicadas, em outros sítios anatômicos ou em casos de alergia à algum medicamento (BRASIL, 2019).

Em 2016, a Reunião Mundial sobre Saúde das Nações Unidas aprovou a estratégia do setor global de saúde da OMS 2016-2021 sobre infecções sexualmente transmissíveis, a qual possui como alvos: a prevenção, diagnóstico e controle da infecção por *NG*, a diminuição do impacto da resistência aos antimicrobianos (AMR) por meio de recursos aprimorados, sustentados e baseados em evidências (UNEMO, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

A resistência do gonococo aos antimicrobianos é um fenótipo complexo que resulta de uma à múltiplas mudanças genéticas que frequentemente ocorrem em sinergia e resultam no aumento dos níveis de resistência aos antimicrobianos, além de elementos genéticos desconhecidos que também podem desempenhar um papel nesse cenário (HARRISON et al., 2016).

O genoma de *NG* tem aproximadamente 2 milhões de bases. Em comparação com outros microrganismos, é praticamente metade do tamanho do genoma da *Escherichia coli*. Isso reflete na estreita adaptação da sobrevivência de *NG* em seu nicho, a mucosa humana. Além de causar a restrita capacidade metabólica de *NG*, essa adaptação alterou programas genéticos básicos na célula bacteriana. O mais importante relativo à essa modificação, é o controle alterado do sistema SOS, o qual mobiliza o reparo do DNA que promove recombinação de vias em resposta ao stress ambiental e, além disso, o gonococo possui dois reguladores especializados na resposta do stress por peróxido: o regulador transcricional do tipo LysR chamado OxyR, que controla negativamente a expressão da catalase, e PerR, um metaloregulador da família Fur de reguladores que controla a resposta ao stress dependente de manganês às espécies reativas de oxigênio (MCSHEFFREY; GRAY-OWEN, 2014).

A recente emergência de cepas multirresistentes de *NG* apelam pelo desenvolvimento de novas terapias anti-gonocócicas. Uma abordagem direta é a

identificação de novas proteínas que possam ser alvos por desempenhar funções essenciais na célula bacteriana. Uma abordagem clássica e comum é a predição *in silico* de vias metabólicas baseadas em sequências genômicas, bem como análise de transcriptoma e proteoma para ajudar a identificar potenciais novos alvos terapêuticos (REMMELE et al., 2014).

Dessa forma, para que seja possível compreender os diferentes mecanismos de resistência de *NG*, é necessário que se conheça a fundo os mecanismos genéticos e celulares do gonococo. O sequenciamento do transcriptoma via RNA-Seq tem permitido uma vasta identificação do genoma e de pequenos RNAs não codificantes (ncRNAs) no gonococo, demonstrando sua importante contribuição na fisiologia de *Neisseria* sp. A atual expansão da variedade de tecnologias baseadas em sequenciamento de alta performance está adicionando novos dados na arquitetura do genoma e na regulação da expressão gênica de *Neisseria* sp. em detalhes e em ritmo crescente (HARRISON et al., 2017).

O RNA-Seq utiliza a metodologia de sequenciamento de nova geração. No geral, uma “população” de RNA (total ou selecionado) é convertido a uma biblioteca de fragmentos de cDNA com adaptadores ligados em uma ou nas duas extremidades. Cada molécula, com ou sem amplificação, é sequenciada com alto rendimento de modo a obter pequenas sequências de uma extremidade (*single-end*) ou de ambas as extremidades (*paired-end*). As leituras ou *reads* normalmente possuem 30-400 bp, dependendo da tecnologia de sequenciamento utilizada. Após o sequenciamento, os *reads* resultantes são alinhados a um genoma ou a transcritos de referência, ou ainda, pode ser realizada a montagem *de novo*. O RNA-Seq oferece vantagens sobre outras tecnologias, principalmente por não ser limitado à detecção de transcritos com sequência genômica correspondente, o que permite detecção de novos transcritos, e além disso, devido sua cobertura e resolução, permite encontrar variações em sequências como SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2010).

A aplicação da análise do transcriptoma baseado em sequenciamento de genoma total (WGS) provavelmente irá desempenhar um papel importante na descoberta de determinantes de resistência (ABRAMS; TREES, 2017). Além disso, algumas evidências sugerem que AMR é um fenômeno *multilocus* que pode resultar da combinação de efeitos de mutações em diferentes genes (DAY; GANDON, 2012).

A epigenética refere-se às mudanças herdáveis nas expressões gênicas as quais não alteram o código genético. A maioria dos estudos dos mecanismos epigenéticos em bactérias

têm sido focados na função da metilação no DNA e RNA e efeitos correspondentes na regulação celular, virulência e resistência aos antimicrobianos. Avanços nesse campo serão de grande impacto no entendimento da AMR do gonococo (CASADESUS; LOW, 2006).

No caso do gonococo, os mecanismos de resistência à ceftriaxona ainda não estão bem esclarecidos (ZHAO, 2013; GONG et al., 2016). Dessa forma, novas abordagens que buscam explorar e reconhecer as diferentes respostas ao estresse microbiano e os sistemas de defesa envolvidos, são necessárias para combater a resistência aos antimicrobianos (DWYER; KOHANSKI; COLLINS, 2009; DWYER et al., 2014; BELENKY et al., 2015). A abordagem por meio do RNA-Seq é essencial para entender a estrutura das vias de transcrição que regulam a resistência aos antimicrobianos e como isso implica um circuito regulatório complexo a fim de ativar a resposta mais apropriada de acordo com os diferentes estímulos percebidos (PAIS et al., 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o perfil transcricional de isolado clínico de *Neisseria gonorrhoeae* com sensibilidade reduzida à ceftriaxona nas condições de presença e ausência do antimicrobiano em comparação com isolado sensível.

3.1.1 Objetivos Específicos

Verificar o perfil transcricional de uma linhagem sensível a ceftriaxona na ausência do antimicrobiano e comparar com o perfil da linhagem com sensibilidade reduzida na mesma condição;

Analisar o perfil transcricional da linhagem com sensibilidade reduzida na presença e ausência do antimicrobiano em busca de elementos diferencialmente expressos em resposta ao antimicrobiano;

Determinar a sequência dos genes classicamente relacionados à resistência aos beta-lactâmicos entre as linhagens sensíveis e linhagens com redução de sensibilidade em busca de componentes genômicos da resistência;

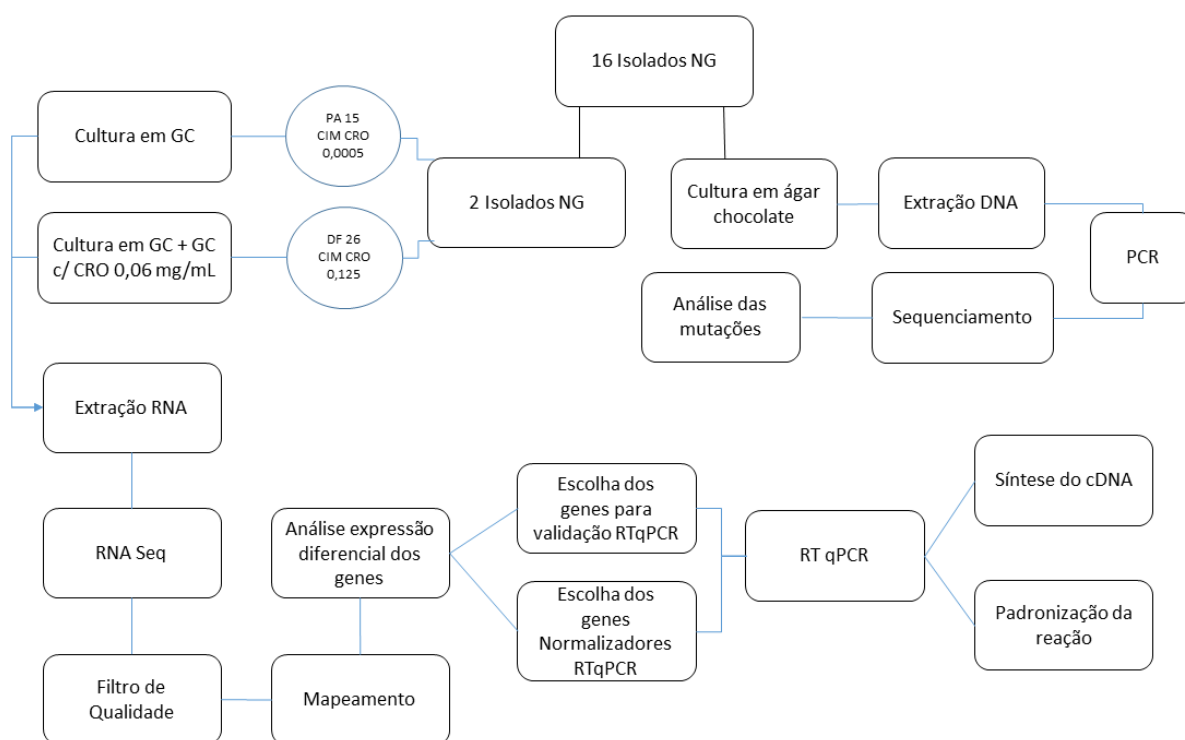
Correlacionar a expressão dos genes envolvidos na resistência às diferentes classes de antimicrobianos;

Identificar novos reguladores transcricionais ou pequenos RNAs regulatórios envolvidos na determinação de resistência à ceftriaxona.

4 METODOLOGIA

Neste trabalho foram utilizados isolados de NG para realização de sequenciamento por eletroforese capilar de alguns genes relacionados à resistência a ceftriaxona e para extração de RNA e posterior sequenciamento de nova geração (RNA-seq). Além disso, foram escolhidos alguns genes que se destacaram na diferença de expressão no RNA-Seq para padronização de RT-qPCR. O fluxograma da metodologia está ilustrado na figura 6.

Figura 6. Fluxograma metodológico do estudo



Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

4.1 SELEÇÃO DOS ISOLADOS

Os isolados utilizados neste estudo compõem o banco de bactérias do Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS/UFSC) e foram previamente identificados e caracterizados em estudos anteriores com metodologias fenotípicas e moleculares (BAZZO et al., 2018). Os critérios utilizados para os pontos de corte para interpretação das CIMs foram determinados pelo CLSI 2018 (*Clinical and Laboratory*

Standards Institute) conforme Quadro 1 (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2017).

Quadro 1. Pontos de corte da CIM para Ceftriaxona e Cefixima definidos pelo CLSI

	CLSI Sensível	CLSI Resistente
Ceftriaxona	CIM ≤ 0.25mg/L	-
Cefixima	CIM ≤ 0.25mg/L	-

Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

Para realização das análises moleculares com metodologia de sequenciamento de DNA a partir de produto de PCR, foram selecionados 9 isolados com a maior CIM e 7 isolados com a menor CIM para o antimicrobiano ceftriaxona e cefixima, totalizando 16 isolados clínicos, conforme Quadro 2. Além dessas, foram utilizadas como controle positivo nas reações de PCR as cepas de referência WHO O e WHO Y (UNEMO et al., 2016).

Quadro 2. Isolados selecionados e respectiva concentração inibitória mínima para Ceftriaxona e Cefixima

Isolado	CIM CRO (mg/L)	CIM CFX (mg/L)
DF26	0,125	0,250
SP11	0,125	0,125
BH23	0,06	0,125
MA80	0,06	0,125
DF68	0,06	0,125
DF19	0,06	0,125
BH09	0,06	0,125
SA15	0,06	0,125
FL50	0,03	0,125
PA12	0,004	0,008
SA24	0,002	0,002
DF57	0,002	0,002
BH30	0,002	0,004
MA05	0,001	0,008
FL42	0,001	0,004
PA15	0,0005	0,002
WHO O	0,03	0,016
WHO Y	1	2

Legenda: CRO: Ceftriaxona; CFX: Cefixima. Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

4.1.1 Sequenciamento Sanger

4.1.1.1 Extração de DNA

Os isolados selecionados foram descongelados em Placas de ágar Thayer-Martin, incubados a $35\pm 1^\circ\text{C}$ com atmosfera umidificada e enriquecida com 5% de CO_2 por 20-24h e repicados em placas de ágar Chocolate para crescimento das colônias e extração de DNA pelo seguinte protocolo de fervura: foi realizada uma suspensão bacteriana, de aproximadamente 2,0 McFarland em 1mL PBS 1X (pH 7,3) em microtubo RNase, DNase e Pirogênio *free* (Axygen, EUA) de 1,5 mL. Em seguida, os microtubos foram centrifugados a 2000 g por 5 min e o sobrenadante foi descartado. No mesmo microtubo foi adicionado 1 mL de PBS e homogeneizado em vórtex. Após homogeneização, realizou-se a incubação a 100°C durante 10 minutos. Após incubação, o lisado foi centrifugado em velocidade máxima ~ 20000 g por 1 minuto. Duzentos microlitros do sobrenadante foram aliquotados em um novo microtubo de 1,5 mL e armazenados a -20°C até utilização.

4.1.1.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Após extração do DNA bacteriano, foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando iniciadores (Quadro 3) e protocolo (Quadro 4) descritos por Liao e colaboradores (2011), na pretensão de verificar SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) relacionados à diminuição da sensibilidade e resistência à ceftriaxona nos genes *porB*, que codifica a porina, *mtrR*, que codifica para o repressor da bomba de efluxo *mtrC-D-E*; *penA*, que codifica para a proteína ligadora de penicilina 2 e *ponA* que codifica para a proteína ligadora de penicilina 1; o gene *tbpb* foi utilizado para identificação do *sequence typing* (ST). Na PCR foram utilizados os reagentes GoTaq DNA polimerase, MgCl_2 e Buffer (Promega, EUA), dNTPs (Ludwig biotec, Brasil) e iniciadores sintetizados pela empresa Exxtend biotecnologia (Brasil).

Quadro 3. Iniciadores utilizados para PCR e sequenciamento

Primer	Sequência	Locus	Regiões sequenciadas
porB-S	CCGGCCTGCTTAAATTTCTTA	<i>PorB</i> (NG-MAST)	nt 350–1086
porB-A	TATTAGAATTTGTGGCGCAG		
tbpB-S	CGTTGTTCGGCAGCGCGAAAAC	<i>tbpB</i> , (NG-MAST)	nt 1098–1686
tbpB-A	TTCATCGGTGCGCTCGCCTTG		
mtrR-S	AACAGGCATTCTTATTTTCAG	<i>mtrR</i> incluso região promotora	Região promotora do nt 21 ao 2120
mtrR-A	TTAGAAGAATGCTTTGTGTC		
penA-S	CGATATGATCGAACCTGG	<i>penA</i>	aminoácidos 340–570
PenA-A	ACAATCTCGTTGATACTCG		
ponA-S	CGCGGTGCGGAAAACCTATATCGAT	<i>ponA</i>	aminoácidos 330–650
ponA-A	AGCCCGGATCGGTTACCATACGTT		

Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

Quadro 4. Reagentes e suas respectivas concentrações utilizadas na PCR

Reagentes	Volume	Concentração
H ₂ O	29 µL	-
Tampão 5X	10 µL	1X
MgCl ₂ (25mM)	3 µL	1,5 mM
dNTPs (25mM)	0,5 µL	0,25 mM
Iniciador senso (10uM)	2,5 µL	0,5 uM
Iniciador antissenso (10uM)	2,5 µL	0,5 uM
Taq DNA Pol (5U/µL)	0,5 µL	2,5 U
DNA	2 µL	-
Volume total	50 µL	-

Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

Os ciclos de amplificação foram programados da seguinte forma: 1 min a 94°C para desnaturação, 30 ciclos nas temperaturas 94°C, 55°C e 72°C durante 1 minuto cada, e um ciclo final de 72°C por 10 minutos, realizados em termociclador Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, EUA).

Após amplificação, foi realizada eletroforese em gel de agarose (1,5% + 1uL de Brometo de etídio) com TBE 1X (Tris-Boro-Edta), em corrida de 200 volts durante 10 minutos, a fim de confirmar a amplificação. A revelação do gel foi realizada no ImageQuant™ LAS 500 (General Electrics, EUA). Ao confirmar a amplificação, foi realizada a purificação dos produtos de PCR utilizando PureLink PCR Purification Kit, Life Technologies (Thermo Fisher Scientific, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Em seguida, foi realizada a dosagem do produto amplificado por meio do espectrofotômetro NanoVue (General Eletrics, EUA).

4.1.1.3 Sequenciamento

O sequenciamento *Sanger* foi realizado utilizando os mesmos primers da PCR descrita anteriormente. O serviço de sequenciamento foi contratado e realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares LTDA. Para isso, foi necessário distribuir as amostras amplificadas previamente em placa de 96 poços (Applied Biosystems, EUA) na quantidade de 30 a 60 ng de DNA. Para cada amostra, foram utilizados dois poços para cada iniciador, um para adição do iniciador senso e outro para o iniciador antissenso, ambos adicionados em concentração de 5 pmol. Esse procedimento foi realizado para os 5 genes, totalizando 10 poços por amostra. Após adição das amostras e iniciadores, a placa foi selada com filme óptico e acondicionada em caixa de isopor contendo 2 gelos recicláveis de 250 mL congelados, para envio à empresa.

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, EUA) no equipamento ABI Prism377 DNA sequencer (Applied Biosystems, EUA). Os dados do sequenciamento foram recebidos por e-mail nos formatos .ABI e .txt para cada amostra sequenciada.

Para análise desses resultados foram utilizados os programas Chromas (versão 2.6.6), com o intuito de verificar a qualidade do eletroferograma. Para montagem dos contigs foram utilizados os programas Phred-Phrap-Consed (na plataforma Galaxy Stingrey) e Cap3 (<http://seq.cs.iastate.edu/cap3.html> acesso em 10/09/2018).

4.1.1.4 NG-MAST

Para análise de clonalidade entre os isolados, os dados obtidos no sequenciamento das regiões previamente descritas dos genes *porB*, trimada em 490 pb iniciando na região conservada TTGAA e *tbpB* trimado em 390 bp a partir da região CGTCTGAA foram depositados na base de dados do *Neisseria gonorrhoeae* Multi Antigen Sequence Typing – NG-MAST (<http://www.ng-mast.net/> acesso em 03/07/2019) para aquisição do código do alelo e posterior identificação do *Sequence Typing* (ST). Ambos os genes são utilizados para análise epidemiológica devido suas características altamente polimórficas, que permitem identificar com precisão os isolados circulantes na população (MARTIN et al., 2004).

4.1.1.5 NG-STAR

A análise de SNPs relacionados aos determinantes de resistência relativos à resistência à ceftriaxona nos genes *porB*, *ponA*, *penA* e *mtrR* foi realizada após submissão das sequências na base de dados NGSTAR (www.ngstar.canada acesso em 03/09/2019), que fornece um método de classificação padronizado para sete genes associados à AMR de NG.

4.2 RNA-SEQ

4.2.1 Desenho do experimento de RNA-Seq

Para realização do sequenciamento de RNA (RNA-Seq) foram escolhidos dois isolados: um isolado com sensibilidade reduzida para ceftriaxona (maior CIM, nesse caso, 0,125 mg/L – isolado DF26) e um isolado com a menor CIM para ceftriaxona (0,0005 mg/L – isolado PA15), buscando analisar diferenças transcricionais entre esses isolados e comparar com fenótipo observado. Além disso, para compreender mecanismos de resposta à exposição ao antimicrobiano, o isolado com sensibilidade reduzida foi submetido em cultura com concentração subinibitória de ceftriaxona (0,06 mg/L).

Antes da etapa de cultura dos isolados, foi realizada a produção dos meios de cultura de ágar base GC (Difco, BD®) suplementado com 1% de Vitox (Oxoid, RU), seguindo as recomendações do fabricante, e além desses, foram produzidas placas de GC em concentração de 0,06 mg/L ceftriaxona (Sigma-Aldrich, EUA), de acordo com protocolo de ágar diluição do GASP.

Os isolados escolhidos para o sequenciamento de RNA, daqui em diante denominados como: S (CIM CRO 0,0005 mg/L) e R (CIM CRO 0,125 mg/L) foram descongelados em meio ágar Chocolate (Laborelin, Brasil) e incubados a 35±1°C em atmosfera umidificada enriquecida com CO₂ (5%) durante 20-24h. Em seguida, foram repicados no meio ágar base GC produzido: O isolado S foi repicado em placas de GC e o isolado R foi repicado em placas de GC e GC+CRO (0,06 mg/L). O experimento do isolado submetido à cultura com ceftriaxona será denominado RC. As placas foram incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente e o repique foi realizado em quadruplicata, totalizando 12 placas.

4.2.2 Extração de RNA

Para extração e purificação do RNA total, foi utilizado o kit RNAsy minikit (Qiagen, Alemanha) em conjunto com o RNAsprotect® Bacteria Reagent (Qiagen, Alemanha). A extração e purificação foi realizada seguindo os protocolos 1 e 7 do RNAsprotect® Bacteria Reagent Handbook, no qual quantidade de células bacterianas utilizadas foi estimada com os padrões do Denscheck® (Biomérieux, França) (DO500/600) de 2,0 McFarland e a solução de lisozima (Sigma-Aldrich, EUA) foi preparada em concentração de 15 mg/mL. Para evitar a contaminação com gDNA, foi utilizado o QIAGEN RNase-Free DNase Set (QIAGEN, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA total obtido foi armazenado à -70°C para posterior utilização.

Após a extração, foi necessário realizar a verificação da concentração e integridade do RNA, que, apesar de ser uma molécula termodinamicamente estável, pode ser rapidamente digerido na presença de endonucleases, como as RNases. O grau de degradação, comumente associado com processos de fragmentação, deve ser avaliado em equipamentos precisos, como o Bioanalyzer Agilent 2100 de eletroforese microcapilar. O equipamento utiliza na avaliação um kit, que consiste em um dispositivo bio-analítico com base na combinação de chips microfluídicos, canais preenchidos com gel e separação dos tamanhos por voltagem induzida, e detecção em escala miniaturizada de fluorescência induzida por laser (LIF). Dessa forma, é possível avaliar a qualidade verificando o resultado da microeletroforese e a atribuição dos valores de integridade e suas categorias. Para a classificação da integridade, utilizam-se 10 categorias: 1 – RNA totalmente degradado; à 10 – RNA totalmente intacto (SCHROEDER et al., 2006).

O equipamento Bioanalyzer© (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) utilizado no estudo está alocado na CentralCROM/CCS/UFSC sob responsabilidade da Professora Dra. Tânia Pasa e foi gentilmente disponibilizado para utilização neste estudo. O kit utilizado foi o RNA 6000 Nano kit, especificado para detecção de RNA total de procariotos em escala de 25-500ng/μL. O protocolo foi executado de acordo com as recomendações do fabricante presentes no Agilent RNA 6000 Nano Kit Quick Start Guide e a análise dos dados foi realizada no 2100 Expert software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

4.2.3 Sequenciamento do RNA

O sequenciamento de RNA foi contratado para ser realizado na empresa Macrogen Inc, Korea. Das 12 amostras extraídas, foram selecionadas as três melhores réplicas para cada condição de estudo e os critérios para seleção das réplicas foram a maior integridade do RNA (RIN) e a maior concentração de RNA, totalizando nove amostras. Para o envio, foi realizada a precipitação do RNA em etanol absoluto de acordo com as seguintes recomendações da Macrogen: para cada amostra em microtubo, foram adicionados a proporção de 0.1 do volume de Acetato de sódio 3M (NaOAc, pH5.5) em cada solução de RNA e homogeneizados, seguidos da adição de 2 volumes de etanol 100% e homogeneização suave. Todos os reagentes utilizados eram de grau ultra puro para biologia molecular e água RNase free DEPC-treated, Life technologies (Thermo Fisher Scientific, EUA). Em seguida os microtubos foram acondicionados em tubos de fundo cônico de 50 mL a fim de evitar grandes movimentações durante o transporte. Como recipiente para alocar os tubos cônicos, foi utilizada uma caixa de isopor e para manutenção de temperatura, foram colocados 4 gelos recicláveis congelados em contato com os tubos contendo as amostras. Ainda, a caixa de isopor foi alocada em uma caixa de papel reforçada. O transporte foi realizado pela empresa FEDEX e foi classificado como prioridade internacional, chegando ao seu destino (Seul, South Korea) em 3 dias.

Ao receber as amostras, a Macrogen realizou a análise da qualidade do RNA total enviado utilizando o equipamento Bioanalyzer (Agilent technologies, Santa Clara, CA) a fim de verificar se existia quantidade suficiente ($>3\mu\text{g}$) e qualidade aceitável ($\text{RIN}>7.0$) para construção das bibliotecas de cDNA.

Após aprovação das amostras levando em consideração os critérios de qualidade, a empresa iniciou a produção das bibliotecas de cDNA, primeiramente, realizando a depleção do RNA ribossomal (rRNA) com o kit Ribo-Zero rRNA removal kit (Bacteria) (Illumina, EUA) e em seguida, construção das bibliotecas com o TruSeq Stranded Total RNA sample prep kit (Illumina, EUA), utilizando protocolos do fabricante. Após construção das bibliotecas, essas foram submetidas a novo controle de qualidade (CQ) no equipamento Bioanalyzer. O sequenciamento foi realizado após aprovação do CQ das bibliotecas e a plataforma de sequenciamento utilizada foi Illumina Novaseq 100bp PE (*reads* de 100pb e *paired-end*).

4.2.4 Análise dos dados do RNA-Seq

Os *reads* brutos de cada biblioteca foram recebidos em formato fastq. Inicialmente, foi realizada a etapa de análise da qualidade das *reads* para cada biblioteca, utilizando o programa FASTQC (versão 0.11.8). Em seguida, foi realizado um filtro de qualidade por base e tamanho de *read*, dessa forma, os *reads* com bases de baixa qualidade foram “trimados” e os adaptadores Illumina foram retirados das sequências utilizando o programa TRIMMOMATIC (versão 0.36) com os parâmetros leading: 5, trailing: 5, slidingwindow: 4:5, minlen: 25.

Neste trabalho optamos por realizar o mapeamento por referência, e assim, utilizamos o programa ROCKHOPPER (versão 2.0.3) e as *reads* de cada biblioteca foram mapeadas no genoma de referência NGO FA1090 (código RefSeq NC_002946.2) em 16/07/2019. O Rockhopper é um sistema com métodos elaborados especificamente para análises de dados de RNA-Seq de bactérias. O sistema inclui algoritmos que integram modelos para sRNAs (*small RNAs*) senso e antissenso, bem como predição de operons para construção do mapa do transcriptoma bacteriano. A análise é iniciada com a utilização dos *reads* oriundos do sequenciamento de alto desempenho de um ou mais experimentos, e o sistema alinha os *reads* ao genoma de referência escolhido, normaliza os dados dos diferentes experimentos sequenciados, monta os transcritos e identifica seus limites, incluindo UTRs e pequenos RNAs novos. Além disso, quantifica abundância dos transcritos, testa a expressão diferencial dos genes entre os experimentos, identifica estruturas de operons e permite visualização dos resultados em um visualizador de genomas. O sistema Rockhopper foi avaliado com dados de experimentos de RNA-Seq de cinco bactérias diferentes, incluindo *Neisseria gonorrhoeae*. O programa foi comparado com outros mapeadores comumente utilizados e seus resultados de mapeamento apresentaram-se mais satisfatórios para mapear transcriptomas bacterianos do que os outros programas disponíveis (MCCLURE et al., 2013).

Para complementar a investigação dos genes com maior diferença na expressão, foram realizadas análises *in silico* para predição de estrutura tridimensional das proteínas hipotéticas, comparação por homologia e analogia utilizando a ferramenta I-Tasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/> acesso em 22/01/2020) e o Phyre2.0 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index> acesso em 27/01/2020). Os parâmetros de cada ferramenta foram utilizados no modo *default* (ROY; KUCUKURAL; ZHANG, 2010; YANG; ZHANG, 2015; KELLEY et al., 2016).

Com relação aos RNAs preditos com maior diferença na expressão, a ferramenta INTA-RNA (<http://rna.informatik.uni-freiburg.de/IntaRNA/Input.jsp> acesso em 22/01/2020) foi utilizada para predição de alvos de interação dos RNAs preditos em mRNAs de NG. Todos os parâmetros foram utilizados como *default* (KERY et al., 2014; MANN; WRIGHT; BACKOFEN, 2017). Além das ferramentas para predição de interação e de estrutura dos RNAs preditos, foi utilizada a ferramenta de anotação funcional DAVID, a fim de simplificar os resultados obtidos e levar em consideração os termos que obtiveram sobreposição entre os 100 possíveis alvos de interação das moléculas de sRNAs (JIAO et al., 2012; WRIGHT; GEORG, 2018).

Para análise de expressão diferencial dos genes, foi utilizado o START App, um aplicativo *open-source* em linguagem de programação R que utiliza a estrutura “*Shiny*”. É uma plataforma que pode ser utilizada na web ou utilizando o programa R instalado localmente (<https://kcvi.shinyapps.io/START>). Este aplicativo permite a visualização de diversos níveis de análise de dados de RNA-Seq por meio de gráficos de acordo com as opções selecionadas pelo usuário.

4.3 RT-QPCR

Após análise dos dados obtidos no sequenciamento do transcriptoma, foi realizada a padronização da qPCR quantitativa precedida de transcrição reversa (RT-qPCR), a fim de verificar a expressão de alguns genes selecionados e futuramente utilizá-la para análise de outros isolados de NG.

A seleção ocorreu de acordo com o nível de significância da comparação entre os experimentos, sempre utilizando o nível de significância de q-valor $<0,05$. Dos 11 genes selecionados, dois eram normalizadores, nos quais o nível de expressão (FC) estava próximo de 1 nas comparações entre os experimentos. Para os genes alvos, dois estavam regulados positivamente e três negativamente ao comparar o experimento RxS, e na comparação RxRC, dois eram regulados positivamente e dois negativamente. O ponto de corte para a diferença na expressão foi $\log_{2}FC > 0,75$ (FC 1,68).

Os iniciadores senso e antissenso para cada gene foram desenhados no programa Primer3 (versão 0.4.0 disponível em <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) utilizando como referência o genoma de *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 RefSeq NC_002946.2 e as seqüências obtidas estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Genes escolhidos de acordo com logFC e respectivas sequências dos iniciadores com tamanho de produto de amplificação

Código	Nome do gene	logFC	Condição	Iniciador Senso 5' -> 3'	Iniciador Antissenso 5' -> 3'	Tamanho do produto
NGO1627	phage associated protein	7.87	UP S DOWN R	CTCCCCGGCTGTTTCTC TT	CTCCGTCCTCAATCAT ACCG	100pb
NGO0936	elongation factor P	2.95	UP S DOWN R	ACGGTATGGAAGACCA ATGC	AGGCTCGGTGTACTCG ACTT	100pb
NGO0602	MerR family transcriptional regulator	1	UP S DOWN R	ATCGGACGTGATGAAT ACGG	CCGCAAAGCGTTTGAT GT	118pb
NGO2060	signal recognition particle receptor FtsY	3.55	UP R DOWN S	GGAAACCGCAGCAAAA GTAG	CCCTTTGACGCTTTCT GCTA	91pb
NGO0093	aroK shikimate kinase	3.17	UP R DOWN S	CCCTTTGACGCTTTCTG CTA	GATTCGTGATCGCTG TCGT	107pb
NGO1989	hypothetical protein	1.66	UP RC DOWN R	CACAGGACAATGGTGG TCAG	CAAACCAACCTGCCGT TTAC	94pb
NGO2094	groES co-chaperonin GroES	1.59	UP RC DOWN R	GTCCGCTGGATGTCAA AGC	CTTCTTCGCGCATTAC CAAC	102pb
NGO0863	hypothetical protein	1.65	UP R DOWN RC	TGTTTCGACGAGCATAA CGAG	TCAGCTCATCGATGGT TTCC	90pb
NGO0083	NADH-dependent dehydratase PglD	1.33	UP R DOWN RC	CCTTCCTCATCGAACGC TAC	CGGATAGGCTTTCAGT TTGC	104pb
NGO0626	murein transglycosylase	0.4	Normalizador	ACGGACATCGGGATAT ATGG	GCCGACACCAACATTT TACC	106pb
NGO1854	rplA 50S ribosomal protein L1	0.5	Normalizador	GGTCTGATGCCAAACC CTAA	ATACCTGCCTTGTCGG TACG	107pb

Legenda: UP: regulado positivamente; DOWN: regulado negativamente. Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

A síntese dos iniciadores foi realizada pela empresa IDT technologies (EUA), em escala de 25 nmol e dessalinização por coluna. No laboratório foram ressuspensos em água RNase/DNase/Pirogênio *free* em concentração de 100 nM na solução estoque e armazenados em alíquotas de concentração 4 nM para uso.

4.3.1 Transcrição Reversa

Para realização dos ensaios de eficiência dos iniciadores e da qPCR, foi realizada a transcrição reversa do RNA total (extraído conforme citado anteriormente), por meio da utilização do kit GoTaq® 2-Step RT-qPCR System (Promega, EUA). Antes da etapa de transcrição reversa, foi realizada uma PCR para descartar a existência de DNA genômico contaminante nas amostras de RNA. O protocolo de PCR utilizado foi o mesmo citado anteriormente (Liao et al., 2011) e os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% com 1 µL de Brometo de Etídio (Sigma-Aldrich, Alemanha), em tampão Tris-boro-EDTA (TBE 1x) a 200V durante 10 minutos.

As amostras que apresentaram bandas visíveis na revelação do gel foram submetidas a tratamento com DNase utilizando o kit RQ1 RNase-Free Dnase (Promega, EUA) seguindo as recomendações do fabricante, nas quais foram adicionados a 8 µL de RNA: 1,5 µL de RQ1 DNase 10X Reaction Buffer e 1,5 µL de RQ1 DNase 1U/µg para um volume final de 15 µL. As amostras foram mantidas por 30 minutos a 37°C, quando foi acrescentado 1 µL de RQ1 DNase Stop Solution (solução de EDTA 20 mM, pH 8,0) a fim de inativar a enzima DNase. As amostras foram incubadas a 65°C por 10 minutos.

A fim de produzir cDNA a partir das amostras de RNA, foi realizada a transcrição reversa para todas as réplicas utilizando 5 µL de RNA, 1 µL de oligoDT, 1 µL de Random Primers e 3 µL de água Dnase/Rnase free. Este mix foi incubado a 70°C durante 5 minutos e após esse período foi resfriado imediatamente em gelo. Em seguida foi preparado para cada amostra um mix contendo a enzima transcriptase reversa, o qual consistiu em: 1.5 µL de Nuclease-Free Water, 4 µL de GoScript™ 5X Reaction Buffer, 2 µL de MgCl₂, 1 µL de PCR Nucleotide Mix, 0.5 µL de Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor, 1 µL de GoScript™ Reverse Transcriptase, totalizando um mix de 10 µL, o qual foi adicionado ao preparado com a amostra de RNA, resultando em um volume final de 20 µL. Os tubos contendo as reações foram incubados durante 5 minutos a 25°C, a 42°C por uma hora e finalmente, a 70°C por 15 minutos.

Para confirmar a síntese do cDNA, foi realizada uma PCR convencional com o produto da reação de transcrição reversa, utilizando protocolo descrito previamente.

4.3.2 Eficiência dos iniciadores

Para que os dados obtidos na reação de RT-qPCR sejam reprodutíveis, é necessário avaliar a eficiência dos iniciadores sintetizados, uma vez que o método do C_q comparativo é

muito sensível a variações de eficiência nas reações de qPCR, a qual, em condições ideais, deve ser de 100%. No entanto, o tamanho, estrutura secundária e conteúdo GC do amplicon podem influenciar na eficiência da reação (RAMAKERS et al., 2003).

O método do Cq comparativo assume que as eficiências de amplificação dos genes alvos e de referência são muito próximas, variando entre 1,8 e 2,0. Para avaliação da eficiência da PCR, a abordagem utilizada neste estudo foi a construção de curvas de diluição, neste caso a eficiência da reação é determinada pelo valor do slope obtido da linha de regressão, conforme equação: $E = 10(-1/\text{slope})$ (BUSTIN et al., 2009).

Nesse sentido, foi realizada a análise da eficiência dos iniciadores foi realizada utilizando um pool de amostras convertidas em cDNA, nas concentrações de 5 ng/μL, 10 ng/μL, 20 ng/μL, 40 ng/μL, 80 ng/μL, com o objetivo de realizar uma curva de diluição com cinco pontos. Todas as concentrações foram utilizadas para os 11 pares de iniciadores sintetizados e as reações foram realizadas em triplicata, em placa de 96 poços (Applied Biosystems, EUA) utilizando o termociclador Mastercycler® ep realplex Real-time PCR System (Eppendorf, Alemanha). A reação de qPCR foi realizada utilizando o kit GoTaq® 2-Step RT-qPCR System e o protocolo seguiu as instruções do fabricante, variando as concentrações de cDNA (5-80 ng/μL) e o volume de água da reação. A concentração de 200 nM dos iniciadores foi inicialmente determinada para todos os pares, no entanto, após o cálculo da eficiência dos iniciadores, foi necessário ajustar a concentração de alguns iniciadores para 100 nM.

4.3.3 Genes Normalizadores

A normalização é uma etapa essencial de um ensaio de qPCR confiável, pois este processo controla variações no rendimento da extração, na transcrição reversa e na eficiência de amplificação, permitindo comparações entre concentrações de mRNA entre diferentes amostras. A normalização envolve comparar as relações das concentrações de mRNA dos genes de interesse com as concentrações dos genes de referência. Os mRNAs dos genes de referência precisam ser expressos de forma estável, e sua abundância deve demonstrar forte correlação com a quantidade total de mRNA presente nas amostras (BUSTIN et al., 2009).

4.3.4 Quantificação relativa do mRNA

A quantificação relativa de transcritos de mRNA por RT-qPCR é um método de quantificação na qual o nível de expressão do gene de interesse é comparado entre uma amostra experimental e outra identificada como controle não tratado (calibrador). Independente do método de detecção utilizado, o número de ciclos em que a quantidade de produto amplificado é suficiente para produzir um sinal de fluorescência detectável (ciclo de quantificação - Cq), é a medida utilizada para calcular a quantidade inicial de RNA presente na amostra, apresentando com esta uma relação proporcionalmente inversa. No Cq comparativo, a média dos valores brutos de Cq do gene de interesse, tanto para amostra teste quanto para a amostra calibradora são ajustados em relação ao gene normalizador resultando no valor de $\Delta\Delta Cq$, dessa forma, é utilizado para determinação das diferenças nos valores de expressão gênica (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os valores de Cq obtidos devem ser normalizados para cada gene alvo utilizando a média geométrica dos genes de referência definidos para o estudo, conforme a fórmula de Livak (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001):

$$\Delta Cq (\text{teste}) = Cq (\text{gene alvo, teste}) - Cq (\text{normalizador, teste})$$

$$\Delta Cq (\text{calibrador}) = Cq (\text{gene alvo, calibrador}) - Cq (\text{normalizador, calibrador})$$

O cálculo da expressão gênica para cada amostra teste foi realizado pelo método do Cq comparativo ($2^{-\Delta\Delta Cq}$), onde $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq (\text{teste}) - \Delta Cq (\text{calibrador})$.

O valor de $2^{-\Delta\Delta Cq}$ representa a taxa da expressão normalizada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos nas diferentes metodologias utilizadas no estudo, os quais serão discutidos levando em consideração outros estudos publicados.

5.1 SEQUENCIAMENTO SANGER

Na tabela 2 é possível observar as mutações encontradas em cada gene sequenciado e seu respectivo alelo após inserir os *contigs* no banco de dados NG-STAR. Além disso, dados da concentração inibitória mínima de ceftriaxona para cada isolado são apresentados para correlacionar a diminuição da sensibilidade e a presença de mutações.

Tabela 2. Mutações nos genes *penA*, *ponA*, *mtrR* e *porB* e concentração inibitória mínima de ceftriaxona nos 16 isolados e nas duas cepas de referência (WHO O e WHO Y).

ISOLADO	<i>penA</i>	<i>ponA</i> /Alelo	<i>mtrR</i> /Alelo	<i>porB</i> /Alelo	CIM CRO
SP11	Mosaico tipo 67.001	L421P/1	-35A Del/1	G120K, A121N/11	0,125
DF26	Mosaico tipo 92	L421P/1	-35A Del/1	G120K, A121D/8	0,125
BH23	Mosaico tipo 67	L421P/1	-35A Del/1	G120K, A121N/10	0,06
MA80	Mosaico tipo 67	L421P/1	-35A Del/1	G120K, A121N/11	0,06
DF68	Mosaico XXXIV	L421P/1	-35A Del/1	porB1a	0,06
DF19	Não-mosaico tipo XIII	L421P/1	-35A Del, G45D/19	G120K, A121D/8	0,06
BH09	Mosaico tipo 67	L421P/1	-35A Del/1	G120K, A121N/11	0,06
SA15	Mosaico tipo 67	L421P/1	-35A Del/2	G120K, A121N/11	0,06
FL50	Não-mosaico tipo XII	L421P/1	-35A Del/1	G120K, A121D/8	0,03
PA12	Não-mosaico tipo XII	wt	15/wt	A121S	0,004
SA24	Não-mosaico/A517G	100/wt	48/wt	100/wt	0,002
DF57	Ø*	wt	wt	wt	0,002
BH30	Não-mosaico tipo XIV	100/wt	3/wt	1/wt	0,002
FL42	Não-mosaico tipo 61	100/wt	G45D/25	100/wt	0,001
MA05	Não-mosaico tipo II/A517G	100/wt	48/wt	100/wt	0,001
PA15	Não-mosaico tipo XV	100/wt	3/wt	1/wt	0,0005

WY	Mosaico tipo 42/A502P	L421P/1	-35A Del/1	G120K, A121N/11	1
WO	Não-mosaico tipo XII	L421P/1	-35A Del/1	G120K, A121D/8	0,03

Legenda: Ø* - não foi possível realizar sequenciamento do gene *penA* deste isolado, pois não houve produto de amplificação em três tentativas de PCR. Wt – *Wild type* (tipo selvagem). Fonte: desenvolvido pela autora, 2019.

De acordo com a base de dados NG-STAR, são descritas alterações em *penA*, gene que codifica para a proteína ligadora de penicilina 2 (PBP2). A maior alteração neste gene é a aquisição de sequências mosaico de outras espécies de *Neisseria*, bem como algumas substituições de aminoácidos em alelos não mosaico. A nomenclatura utilizada vai do tipo I ao XXXVIII com base nas substituições de aminoácidos. NG-STAR utiliza essa nomenclatura para a identificação dos alelos, dos tipos mosaico e não mosaico. A respeito ao determinante de resistência *penA*, o mosaico é definido pela composição de fragmentos da PBP2 de *Neisseria cinerea* e *Neisseria perflava*, o qual tem sido associado a diminuição de sensibilidade às cefalosporinas (ITO et al., 2005; OCHIAI et al., 2008; UNEMO et al., 2012; GOSE et al., 2013). As alterações na PBP2, além da aquisição de sequências de outras espécies de *Neisseria*, contemplam substituições de aminoácidos e alelos não mosaicos. A nomenclatura utilizada pelo NG-STAR leva em consideração os perfis já identificados, e caso uma nova sequência de DNA seja detectada, um número decimal é adicionado ao número do alelo, como é o caso da amostra SP11 (mosaico 67.001).

Os resultados obtidos demonstram que sete dos nove isolados com diminuição de sensibilidade apresentaram alelos mosaico, um determinante de resistência importante. No entanto, Liao e colaboradores (2011), Ochiai e colaboradores (2008) e Golparian e colaboradores (2015) reforçam que a diminuição da sensibilidade não é diretamente ocasionada por apenas este determinante, e a ausência de modificação neste gene não exclui este fenótipo. Os trabalhos citados utilizam como critério de diminuição de sensibilidade a CIM ≥ 0.125 . No presente estudo, utilizamos o critério de CIM ≥ 0.03 e nessa concentração já é possível observar os genótipos descritos como característicos de diminuição de sensibilidade a CRO.

Ao comparar os isolados clínicos com a cepa de referência WHO Y, que apresenta CIM CRO = 1, não é possível diferenciar essa cepa classificada como resistente dos isolados clínicos com diminuição de sensibilidade, visto que apresentam os mesmos padrões de mutações, conforme isolado BH09, MA80, SA15, exceto pelo tipo de mosaico apresentado no gene *penA*, descrito como mosaico tipo 42 em WHO Y, enquanto BH09, MA80 e SA15

apresentam o mosaico tipo 67. Quando comparamos os mosaicos de *penA* ou as substituições de aminoácidos em PBP2 de todas as cepas WHO com baixo nível de resistência ou resistência a CRO (cepas WHO L (CIM: 0.5); X (CIM: 2); Y (CIM: 1) e Z (CIM: 0.5) (UNEMO et al., 2016), verificamos grande variação nas modificações apresentadas para cada cepa, demonstrando que o tipo de mosaico não determina a resistência à CRO .

Tanaka e colaboradores (2006) encontraram a modificação L421P no gene *ponA* em isolados resistentes à CRO (MIC = 0.5mg/L) e levantaram a hipótese de que essa modificação poderia ser importante para a determinação da resistência à CRO (JULIET; PENNAN, 2013). Takahata e colaboradores (2006) também encontraram essa substituição associada ao aumento na CIM das ESCs (TAKAHATA et al., 2006; TANAKA et al., 2006). No entanto, Liao e colaboradores (2011) não associaram a substituição L421P com a diminuição da sensibilidade à CRO pois verificaram que tanto isolados sensíveis quanto com sensibilidade reduzida apresentaram essa modificação (LIAO et al., 2011). Curiosamente, no presente estudo, observamos que todos os isolados com a CIM de 0,3 – 0,125mg/L apresentaram a substituição, e os isolados com CIMs abaixo de 0,004 não apresentaram, em concordância com os estudos de Takahata e Tanaka.

Com relação ao determinante de resistência *mtrR*, todos os isolados com MIC entre 0,03 – 0,125mg/L possuem a deleção de uma adenina na posição 35 da região promotora do gene. Adicionalmente, o isolado DF19 possui a substituição G45D. As mutações na região promotora e/ou na sequência codificante do gene repressor - o que causa a superexpressão do sistema de efluxo MtrCDE (como a deleção da adenina da região -35 no promotor, mutação A39T ou G45D na região codificante). Zhao e colaboradores (2018) encontraram ambas alterações em isolados com redução de sensibilidade e Liao e colaboradores (2011) encontraram a alteração tanto em isolados com sensibilidade reduzida, quanto em sensíveis. Alguns autores correlacionam a deleção na região promotora com a resistência à penicilina e redução da afinidade por agentes hidrofóbicos, o que contempla diversas classes de antimicrobianos, mas não estreitamente relacionados a resistência à CRO. No entanto, estes estudos sugerem que a aquisição da substituição G45D parece estar relacionada à diminuição de sensibilidade às ESCs (LIAO et al., 2011; PENG et al., 2017; ZHAO et al., 2018).

Peng e colaboradores (2017) e Chen e colaboradores (2016) encontraram associação entre as modificações G120K e A121D no gene *porB* e o aumento da CIM para CRO, similar ao observado no presente estudo (CHEN et al., 2016; PENG et al., 2017). Ohnishi e

colaboradores (2011) observaram as mesmas modificações em isolados transformados com redução de sensibilidade à CRO (OHNISHI et al., 2011).

No que diz respeito às mutações dos isolados sensíveis com CIM 0,0005 – 0,004mg/L, a maioria apresenta-se como tipo selvagem (wt), ou seja, sem mutações, ou com apenas uma mutação, o que não leva em consideração o conjunto de modificações nos determinantes de resistência que são característicos de redução de sensibilidade ou resistência à CRO.

O fenômeno da resistência à CRO ainda é avaliado pela presença das modificações nos 4 determinantes citados: *penA*, *ponA*, *mtrR* e *penB*. No entanto, pelo menos um determinante de resistência à CRO permanece desconhecido e os mecanismos sujeitos a diminuição da sensibilidade e aquisição da resistência não estão definidos (GOLPARIAN et al., 2010; OHNISHI et al., 2011; UNEMO et al., 2012).

Sequence Type

A ferramenta NG-MAST foi utilizada para identificação do *Sequence Type* dos isolados. O resultado obtido no banco de dados está demonstrado na tabela 3.

Tabela 3. STs dos 16 isolados e das cepas de referência WHO O e WHO Y.

Isolado	ST	CIM CRO (mg/L)	CIM CFX (mg/L)
SP11	14378	0,125	0,125
DF26	14302	0,125	0,250
BH23	14849	0,06	0,125
MA80	1407	0,06	0,125
DF68	NE	0,06	0,125
DF19	2318	0,06	0,125
BH09	NE	0,06	0,125
SA15	NE	0,06	0,125
FL42	16457	0,001	0,004
FL50	225	0,03	0,125
PA12	NE	0,004	0,008
SA24	NE	0,002	0,002
DF57	NE	0,002	0,004
BH30	NE	0,002	0,004
MA05	16557	0,001	0,008
PA15	NE	0,0005	0,002
WHO O	495	0,03	0,016
WHO Y	1407	1	2

Legenda: NE: ST não encontrado. Os números de ST obtidos representam a junção dos alelos de *tbpB* e *porB*. Estão apresentados os valores de concentração inibitória mínima (CIM) para ceftriaxona (CRO) e cefixima (CFX). Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

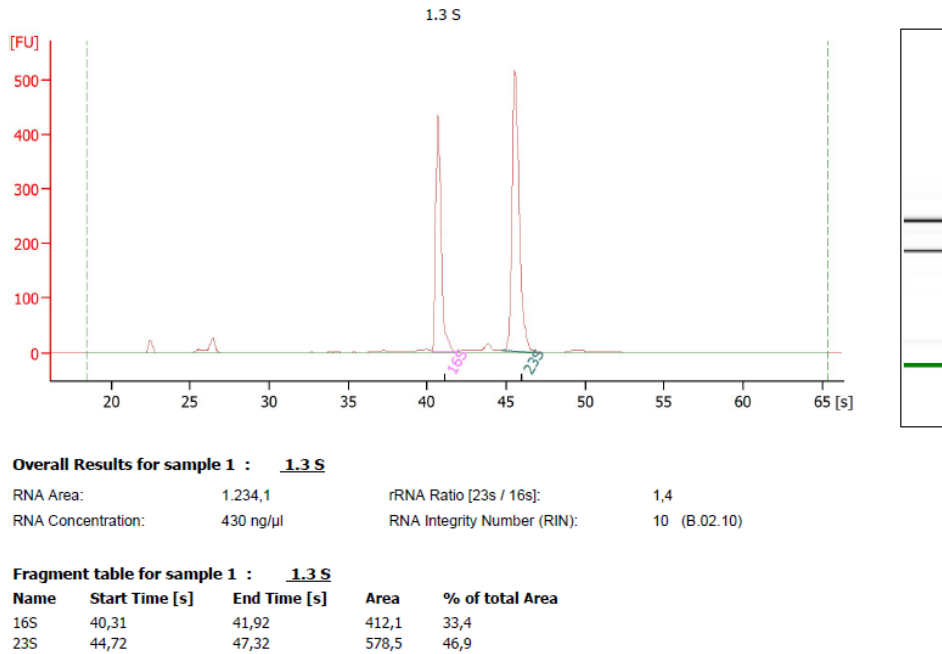
Dos 16 isolados, apenas 8 obtiveram o ST identificado. É possível inferir que se tratam de isolados inéditos, ainda não inseridos no banco de dados mundial, pois são isolados provenientes do banco de isolados de NG do primeiro estudo nacional de vigilância da resistência de NG e que não tiveram dados moleculares publicados e podem representar novos STs que estão circulando no Brasil. Essa diversidade nos STs ocorre pois o NG-MAST utiliza regiões bastante polimórficas dos genes *tbpB* e *porB*, e as populações gonocócicas provavelmente são selecionadas pela resposta imune humana e assim, são encontrados diversos números de alelos em ambos os *loci*, além da aquisição de novas mutações e recombinação em infecções gonocócicas múltiplas, o que promove uma rápida modificação na população de STs (MARTIN et al., 2004).

Deve-se destacar o isolado MA80, o qual foi classificado como ST1407 o mesmo da cepa WHO Y. Esse ST está estritamente relacionado à diminuição da sensibilidade às ESCs, multirresistente e prevalente na Europa e no Japão (UNEMO et al., 2012; GOSE et al., 2013).

5.2 BIOANALYZER

Os gráficos a seguir demonstram os resultados obtidos no equipamento Bioanalyzer e analisados pelo programa 2100 Expert software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). No total, foram extraídas e analisadas 12 amostras (3 condições em quadruplicata), no entanto, para o estudo, foram selecionadas as três (3) melhores réplicas de cada condição (3 – S, 3 – R, 3 – RC), utilizando os critérios do RIN e maior concentração de RNA, conforme figura 8. Os dados provenientes das amostras enviadas está disponível no apêndice A.

Figura 7. Qualidade e concentração do RNA: réplica da condição S



Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.


Os resultados obtidos no Bionalayzer refletem a qualidade do processo de extração do RNA, pois todas as réplicas apresentaram a integridade do RNA de pelo menos 8.5 até 10, o que demonstra a ausência de degradação ou fragmentação do RNA.

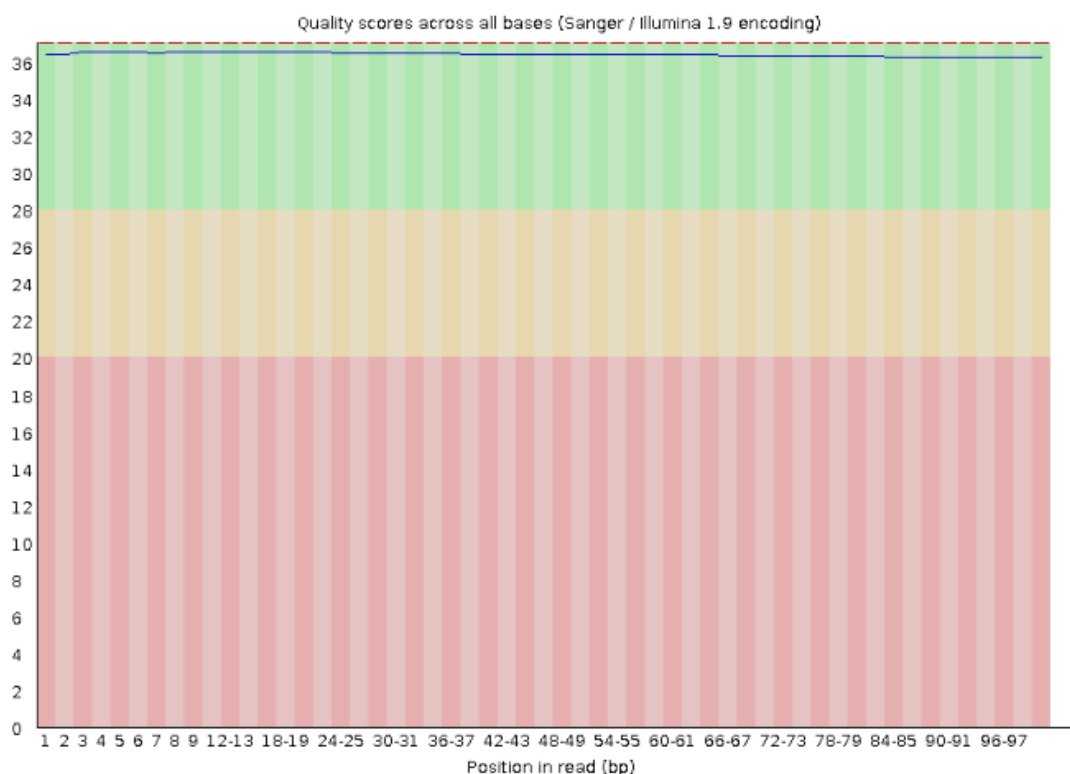
5.3 FASTQC

Junto aos arquivos .fastq provenientes do sequenciamento dos RNAs, foi enviado pela Macrogen um relatório dos dados brutos. Neste relatório são apresentados alguns índices importantes que demonstram a qualidade do sequenciamento realizado, como conteúdo GC e qualidade Phred.

Após o *download* dos arquivos .fastq das nove bibliotecas sequenciadas, o programa Fastqc foi utilizado para visualização de diversos parâmetros, principalmente da média da qualidade phred de cada base dos *reads*, as quais estão exemplificadas na figura 9:

Figura 8 . Média de qualidade da biblioteca 2S_1

 **Per base sequence quality**



Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

As bibliotecas foram sequenciadas em par (*paired-end*), assim, obteve-se um par de arquivos .fastq para cada uma, totalizando 18 arquivos. Todos os gráficos de qualidade de sequência por base estão disponíveis no apêndice B.

Os pares das nove bibliotecas apresentaram score Phred acima de 30 como média em todas as bases dos *reads*, o que é considerado um padrão de alta qualidade; um score 20-30 seriam *reads* com qualidade média e abaixo de 20 *reads* com qualidade ruim (PICARDI, 2015).

5.4 TRIMOMMATIC

Os resultados obtidos após utilização do programa Trimomatic estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Dados obtidos no programa Trimomatic

	Input read pairs	Both surviving	Forward Only surviving	Reverse only surviving	Dropped
2S	24956555	100%	0%	0%	0%
3S	25531943	100%	0%	0%	0%

4S	15625000	99.74%	0.26%	0%	0%
4R	23240084	100%	0%	0%	0%
5R	26167385	99.74%	0.26%	0%	0%
6R	19924995	99.83%	0.17%	0%	0%
2RC	21775789	99.74%	0.26%	0%	0%
3RC	25543843	99.80%	0.2%	0%	0%
4RC	25295660	99.75%	0.25%	0%	0%

Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019

Ao observar os dados da tabela 4 verificamos que mais de 99.74% dos *reads* de todas as bibliotecas apresentavam qualidade superior aos parâmetros definidos nos comandos do Trimomatic, resultando em perda mínima ou nula de *reads* sequenciados e enfatizando a qualidade do sequenciamento realizado.

5.5 MAPEAMENTO E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS GENES

Os *reads* de cada biblioteca foram mapeados no genoma de referência de NG FA1090 RefSeq NC_002946.2 e na tabela 5 é possível visualizar as estatísticas do mapeamento das bibliotecas.

Tabela 5. Dados do mapeamento no genoma de referência de NG FA1090

Nome da biblioteca	Tamanho da biblioteca	Reads alinhados com sucesso	Genes codificantes de proteínas	Regiões não anotadas
2S	24.956.555 <i>reads</i>	84%	75%	15%
3S	25.531.943 <i>reads</i>	84%	77%	15%
4S	15.584.803 <i>reads</i>	86%	79%	15%
<i>4R</i>	23.240.084 <i>reads</i>	89%	54%	39%
<i>5R</i>	26.099.195 <i>reads</i>	89%	64%	30%
<i>6R</i>	19.891.302 <i>reads</i>	89%	53%	34%
<u>2RC</u>	21.719.009 <i>reads</i>	89%	78%	18%
<u>3RC</u>	25.492.301 <i>reads</i>	89%	75%	20%

<u>4RC</u>	25.492.301 reads	89%	73%	20%
------------	------------------	-----	-----	-----

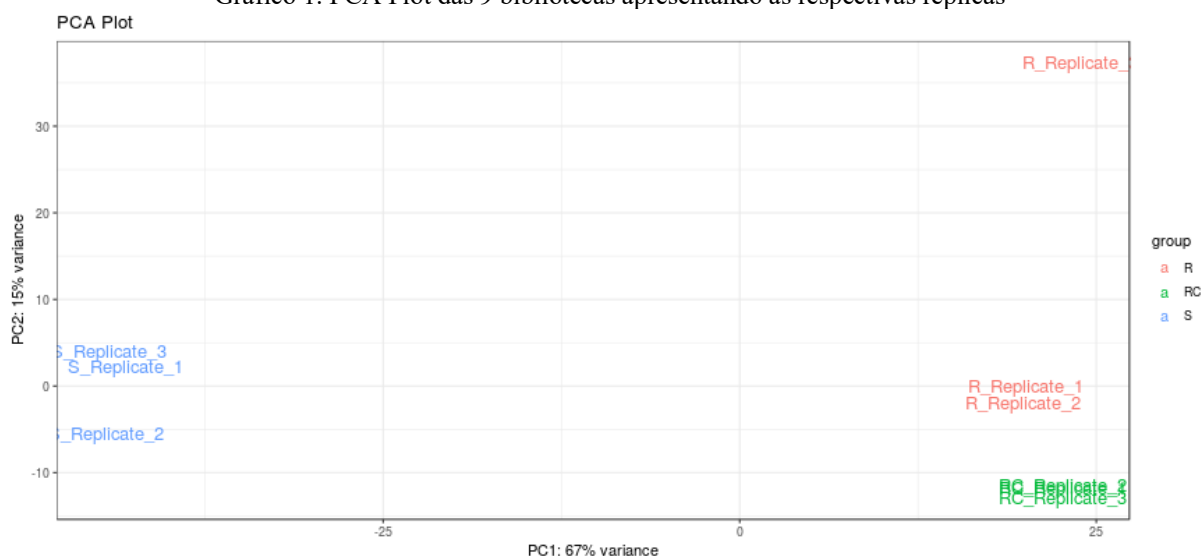
Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

As bibliotecas foram inseridas no formato *paired-end*, dessa forma, o tamanho da biblioteca corresponde à média de *reads* dos pares sequenciados. O Rockhopper utiliza uma abordagem semelhante ao Bowtie2, o qual cria um index para o genoma de referência (FA1090) baseado na transformação Burrows-wheeler. Utilizando o index, é realizada a tentativa de um alinhamento para cada *read*. Caso algum *read* não alinhe exatamente, regiões “sementes” do *read* são alinhados ao genoma. Essas regiões são restringidas a não ter menos de um terço do tamanho do *read* e alinhamentos inexatos no genoma possuem permissão de conter um número limite de erros, inserções e deleções, definido como 15% (DAOU et al., 2013; MCCLURE et al., 2013). De modo geral, mais de 84% dos *reads* foram alinhados com sucesso. De 53 a 79% deles foram alinhados em regiões descritas como codificantes de proteínas e de 15 a 39% foram alinhados em regiões do genoma que ainda não possuem anotação funcional.

Além das estatísticas gerais, o Rockhopper libera uma lista com todos os dados do mapeamento, a qual inclui o nome dos genes, localização do mapeamento, contagens brutas e comparação estatística entre as condições (S, R, RC) em RPKM (*reads per kilobase per million*). Após a aquisição dessa lista, os dados foram depositados no START App para análise de logFC dos experimentos. O START App é um aplicativo da web totalmente escrito na linguagem de programação R (código aberto) e utiliza a estrutura “Shiny”, criada para que cientistas com pouco conhecimento de programação computacional possam explorar e visualizar seus dados de RNA-Seq partindo dos dados brutos dos experimentos (NELSON et al., 2017). Dessa forma a análise gráfica foi realizada utilizando o START App.

No Gráfico 1 é possível visualizar o gráfico PCA (PCA plot). Este gráfico representa a reprodutibilidade das réplicas e a variação entre os grupos experimentais.

Gráfico 1. PCA Plot das 9 bibliotecas apresentando as respectivas réplicas



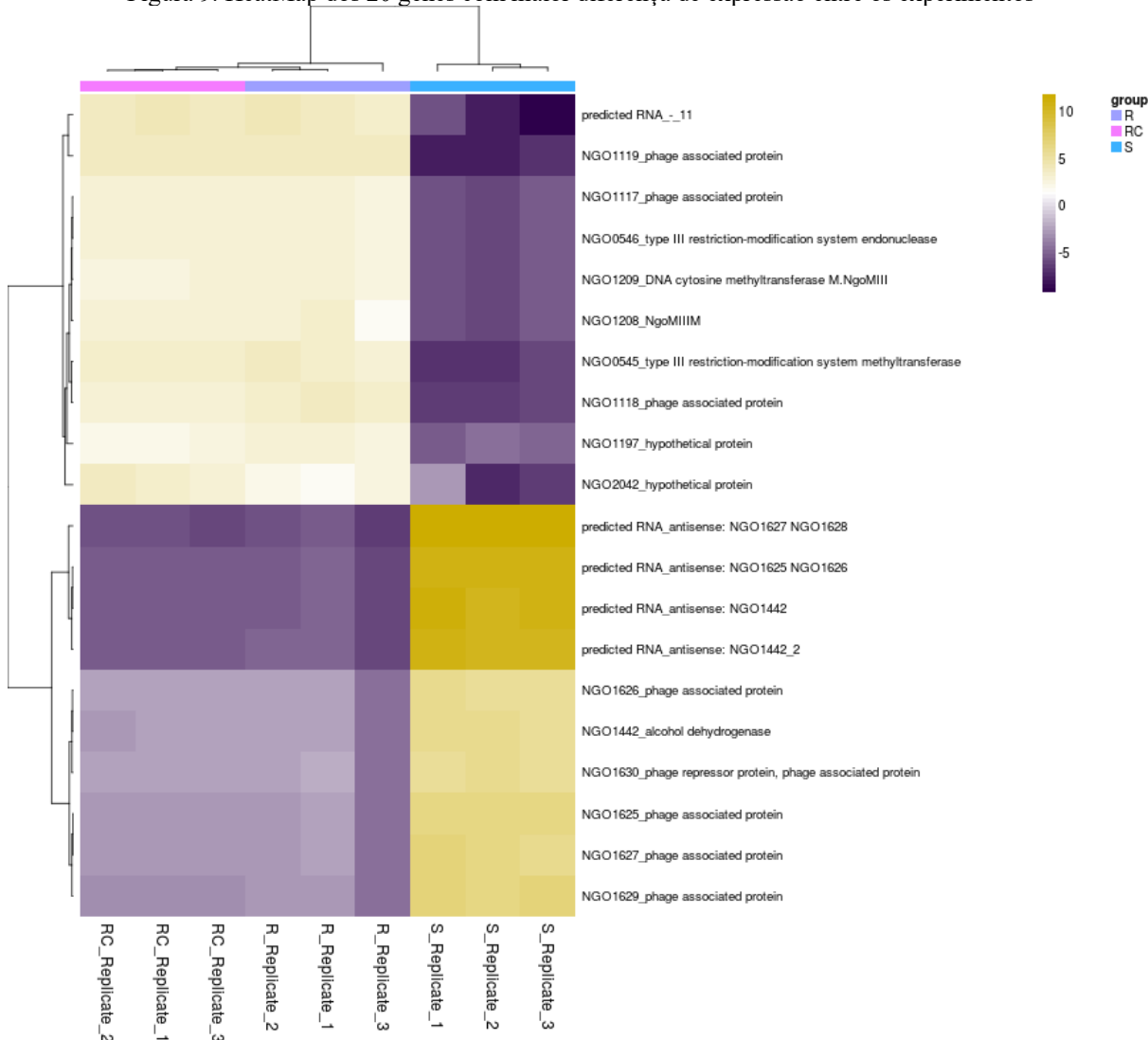
Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

A PCA (análise de componente principal) permite sumarizar e visualizar informação em um conjunto de dados de observações descritas por múltiplas e interrelacionadas variáveis quantitativas. Cada variável poderia ser considerada como uma dimensão diferente. No entanto, ao ter mais de três variáveis nos conjuntos de dados, seria difícil visualizar um hiperespaço multidimensional. Dessa forma, PCA é utilizada para extrair informações importantes de dados multivariados e expressar essa informação como um conjunto de poucas e novas variáveis chamadas de componentes principais. Essas novas variáveis correspondem a uma combinação linear das originais. O número de componentes principais é menor ou equivalente ao número de variáveis originais. Uma dada informação de um banco de dados em um determinado conjunto de dados corresponde ao total de variação que este contém. O objetivo da PCA é identificar direções (ou componentes principais) nos quais a variação dos dados é máxima. Assim, a PCA reduz a dimensionalidade de um dado multivariado a dois ou três componentes principais que podem ser visualizados graficamente com mínima perda de informação (ABDI; WILLIAMS, 2010; SON et al., 2018). No gráfico PCA apresentado, podemos verificar a proximidade entre as réplicas dos experimentos, enfatizando a reprodutibilidade do ensaio.

Em seguida podemos observar o HeatMap de 20 genes com maior diferença de expressão entre os experimentos (Figura 9). Este modo de visualização permite identificar se o gene está regulado positivamente ou negativamente em determinada amostra, como estão

distribuídas as amostras a partir dessa variável e qual a similaridade entre elas em um gradiente de cores.

Figura 9. HeatMap dos 20 genes com maior diferença de expressão entre os experimentos

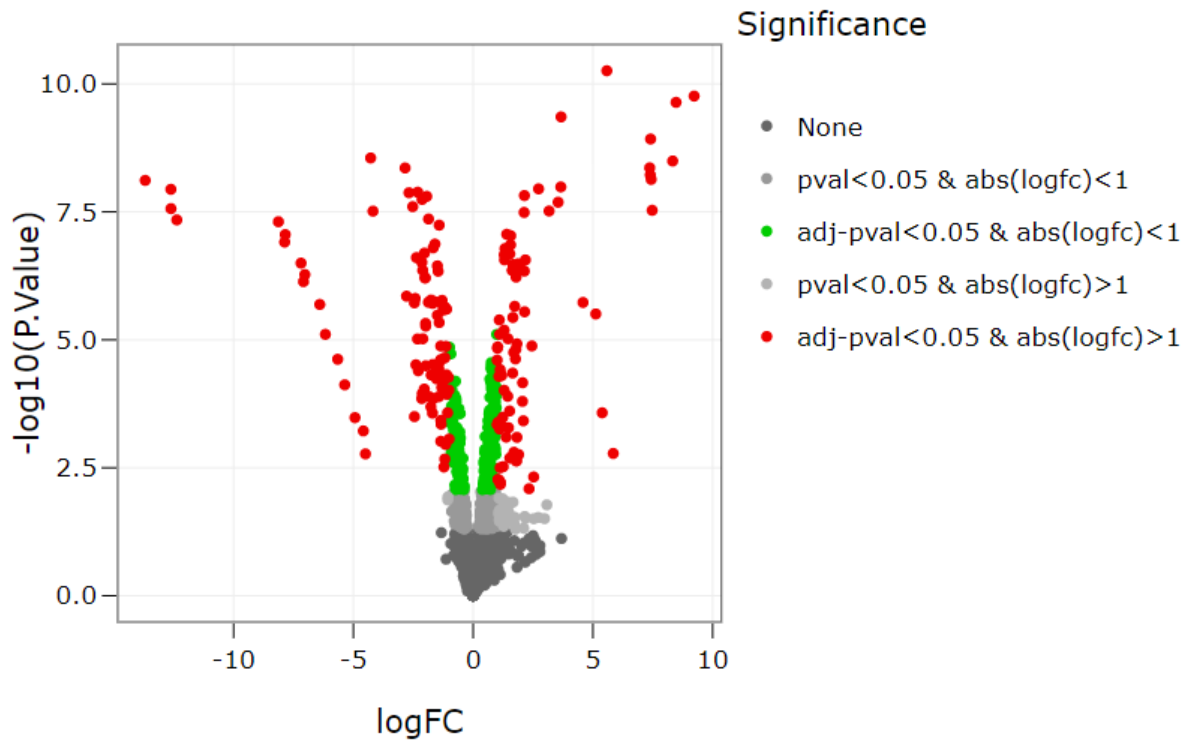


Legenda: O gradiente de cores determina o logFC de 10 a -5 dos 20 genes e compara entre os grupos de réplicas (S, R e RC). Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

No HeatMap apresentado podemos observar a distribuição dos genes elencados nas tabelas 6 e 7, agrupados por similaridade na transcrição dos genes. É possível verificar a diferença de expressão tênue quando comparamos R e RC, e evidente diferença na transcrição quando comparamos R com S.

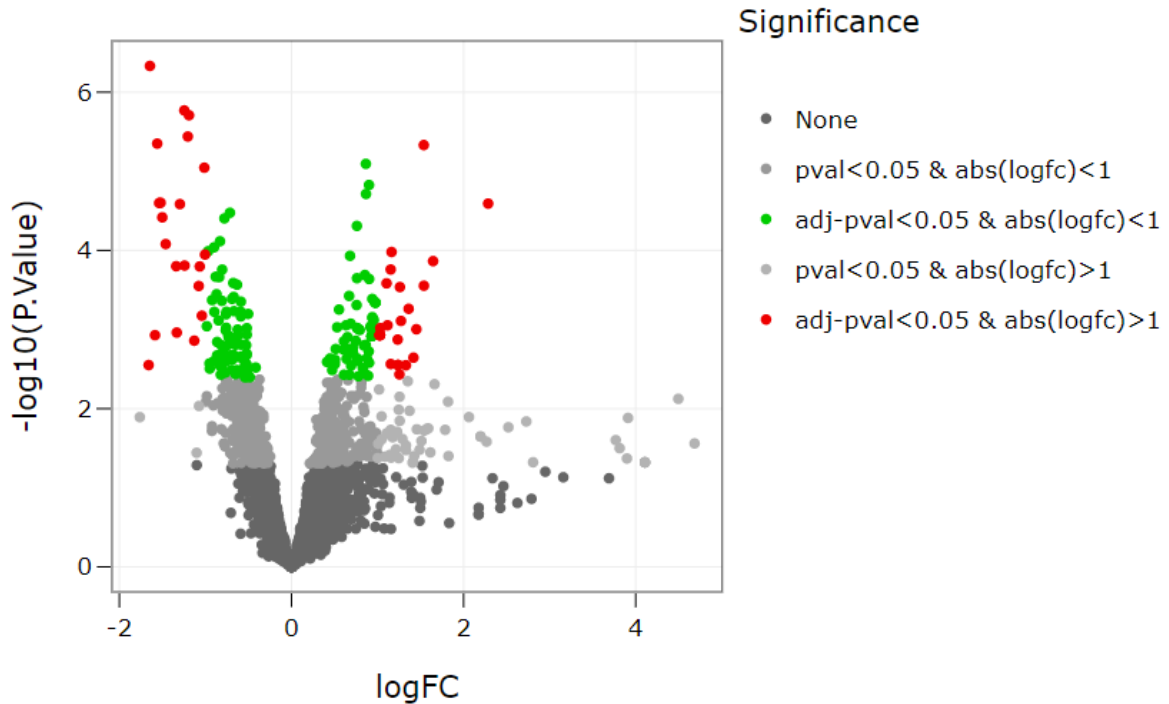
Com o objetivo de visualizar a variação entre os experimentos por logFC e significância, utilizamos o gráfico Volcano, ilustrado nos gráficos 2 e 3, onde comparamos a condição S com a condição R, e a condição R com a condição RC, respectivamente.

Gráfico 2. Gráfico Volcano de comparação entre condições S versus R



Legenda: pval: p-valor, adj: p-valor ajustado. Cada ponto representa um gene. Os pontos vermelhos representam os genes diferencialmente expressos com $\logFC > 1$ e estatisticamente significantes. Em verde estão os genes com $\logFC < 1$ e estatisticamente significantes. Em cinza os genes com \logFC próximo de 0. Em cinza escuro os genes sem significância estatística. Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

Gráfico 3. Gráfico Volcano de comparação entre as condições R *versus* RC



Legenda: pval: p-valor, adj: p-valor ajustado. Cada ponto representa um gene. Os pontos vermelhos representam os genes diferencialmente expressos com $\log FC > 1$ e estatisticamente significantes. Em verde estão os genes com $\log FC < 1$ e estatisticamente significantes. Em cinza os genes com $\log FC$ próximo de 0. Em cinza escuro os genes sem significância estatística. Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

Os gráficos volcano são comumente utilizados para demonstrar os resultados de RNA-Seq ou de outros experimentos ômicos. É um tipo de gráfico de dispersão que demonstra a significância estatística (p-valor) *versus* a magnitude da mudança (\log Fold Change). Ele permite uma rápida identificação visual dos genes com maior diferença de expressão e que são estatisticamente significantes, que podem ser os genes mais significantes biologicamente. Neste gráfico, os genes mais regulados positivamente estão na direita enquanto os mais regulados negativamente estão na esquerda. Os genes com maior significância estatística estão em direção ao topo do gráfico. Neste gráfico a visualização entre a diferença entre a comparação dos experimentos fica evidente, pois podemos observar uma quantidade maior de genes com grande diferença na expressão na comparação R *vs* S, e uma menor quantidade na comparação R *vs* RC.

De modo geral, o RNA-Seq é ideal para analisar os patógenos humanos, pois é possível obter informação sobre a resposta dos microrganismos frente a diferentes condições. Ainda, é possível identificar e estudar os transcritos que ainda não foram anotados, como sRNAs,

vantagem extremamente importante em NG pois a bactéria possui poucas proteínas ligadores de DNA e pode depender da sRNAs regulatórios. Outra vantagem é que o RNA-Seq pode ser utilizado para identificar proteínas de membrana externa altamente expressas, as quais podem representar candidatos para alvos de vacinas ou alvos para desenvolvimento de novos fármacos para este patógeno (CHRISTODOULIDES, 2019).

Após inserção no StartApp dos dados de leitura brutas obtidas no Rockhopper (lista que contempla todos os genes de NG já identificados e sRNAs preditos pelo algoritmo do programa, totalizando 2239 genes), obtivemos uma lista com os dados normalizados com cálculo do logFC para cada gene e sua significância estatística. Em uma análise global do transcriptoma, selecionamos como ponto de corte q-valor ≤ 0.05 e $FC > 1,68$ para verificar quantitativamente os genes diferencialmente expressos nas comparações entre os experimentos.

Na comparação dos genes diferencialmente expressos entre o isolado S e o isolado R, observamos 244 genes (Tabela 10 – Apêndice D), dos quais 124 são regulados positivamente e 120 negativamente no isolado R. A fim de realizar análise qualitativa destes genes, a lista com os 244 códigos foi inserida na base de dados UniprotKB (acesso em 08/01/2020). Os dados obtidos demonstram que apenas 26 genes possuem função molecular definida, 52 são RNAs preditos (RNAs não codificantes), 79 são hipotéticos e 87 possuem sua função anotada automaticamente. Os 26 genes com função molecular definida, que correspondem a apenas 10,66% dos genes diferencialmente expressos (DGEs) para esta comparação, estão elencados na tabela 8 do Apêndice C com as informações disponíveis sobre os respectivos códigos, nome do produto (proteína), gene, processo biológico, componente celular e função molecular, fornecidos pela base de dados Gene Ontology.

Em relação à comparação entre a condição R e RC, foram observados 115 genes diferencialmente expressos (Tabela 11 – Apêndice D), e desses, 53 estavam regulados positivamente e 62 negativamente na condição de presença da CRO. Desses 115 genes, apenas 14 possuem função molecular definida, 46 são RNAs preditos, 28 são hipotéticos e 26 tem sua função anotada automaticamente. Os 14 genes com informações obtidas no Gene Ontology estão elencados na tabela 9 disponível para consulta no Apêndice C. Nessa comparação observamos a mesma situação descrita anteriormente: a ausência de informação revisada ou curada sobre genes envolvidos em mecanismos celulares que não sejam identificados apenas como participantes de metabolismo basal da célula.

Os 20 genes com maior diferença de expressão e estatisticamente significantes (q-valor $\leq 0,05$) nas duas comparações entre as condições serão apresentados e discutidos em seguida: isolado com sensibilidade reduzida (R) *versus* isolado sensível (S) (tabela 6); isolado com sensibilidade reduzida (R) *versus* isolado com sensibilidade reduzida submetido à concentração subinibitória de ceftriaxona (RC) (tabela 7).

Tabela 6. Lista dos 20 genes que apresentaram maior diferença de expressão entre as condições S *versus* R

ID Gene	Nome do produto	logFC_ R/S	padj_ R/ S
NGO1119	phage associated protein	9,23	1,71E-07
NGO0545	type III restriction-modification system methyltransferase	8,47	1,71E-07
NGO1118	phage associated protein	8,33	1,03E-06
NGO1208	NgoMIIM	7,48	2,64E-06
predicted RNA 11	-	7,43	1,43E-06
NGO1117	phage associated protein	7,41	5,34E-07
NGO1209	DNA cytosine methyltransferase M.NgoMIII	7,40	1,35E-06
NGO0546	type III restriction-modification system endonuclease	7,37	1,09E-06
NGO1069	hypothetical protein	5,85	1,40E-02
NGO1197	hypothetical protein	5,58	1,24E-07
predicted RNA	antisense: NGO1627 NGO1628	-13,69	1,43E-06
predicted RNA	antisense: NGO1625 NGO1626	-12,62	1,71E-06
predicted RNA	antisense: NGO1442	-12,62	2,64E-06
predicted RNA	antisense: NGO1442_2	-12,37	3,50E-06
NGO1629	phage associated protein	-8,13	3,68E-06
NGO1627	phage associated protein	-7,87	7,89E-06
NGO1625	phage associated protein	-7,84	5,96E-06
NGO1442	alcohol dehydrogenase	-7,19	1,45E-05
NGO1626	phage associated protein	-7,08	2,64E-05
NGO1630	phage repressor protein	-7,03	2,05E-05

Legenda: padj: p-valor ajustado ou q-valor. LogFC R/S: Expressão relativa em log comparando o isolado R com o isolado S. Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

Quillin e Seifert (2018) afirmam que quando todos os determinantes de resistência de uma cepa resistente são transformados em uma cepa receptora sensível, os transformantes não

reconstituem o mesmo nível de resistência da cepa doadora, sugerindo a presença de um ou mais fatores desconhecidos que não podem ser transferidos facilmente para uma cepa recipiente por meio da transformação, o que nos leva a pensar que mecanismos regulatórios multifatoriais podem auxiliar na determinação da resistência à CRO em diferentes níveis.

Quando comparamos o isolado R com o isolado S, entre os 10 genes regulados positivamente em R, notamos a presença de 4 genes que codificam para sistemas de restrição/metiltransferases com grande diferença de expressão (NGO0545, NGO1208, NGO1209, NGO0546). As metiltransferases protegem o DNA bacteriano da clivagem realizada por endonucleases, pela metilação do DNA. Apesar disso, alguns estudos sugerem que as metiltransferases tipo III R-M (modificação-restrição) tem uma função importante como um novo mecanismo epigenético de controle da expressão gênica em patógenos humanos (FOX; SRIKHANTA; JENNINGS, 2007; SRIKHANTA et al., 2009) e além disso, também podem estar envolvidas no controle da especiação das bactérias, visto que estes microrganismos trocam DNA frequentemente por transferência horizontal de genes e o controle da especiação requer uma barreira contra a captura desregulada de DNA exógeno (JELTSCH, 2003).

Neisseria gonorrhoeae, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e outras bactérias possuem metiltransferases de DNA tipo III submetidas a variação de fase (*phase variation*) aumentando sua possível função no controle da expressão gênica (ADAMCZYK-POPLAWSKA; PIEKAROWICZ, 2009; SRIKHANTA et al., 2009). A variação de fase tem uma função vital na habilidade adaptativa de NG aos diversos nichos do hospedeiro. Por meio de mudança aleatória na expressão de genes importantes e sistemas regulatórios, mediadas por repetições de sequências simples, a população bacteriana é diversa e apta a sobrevivência em face das pressões seletivas (CHURCHWARD et al., 2016).

Sistemas tipo III são compostos de um gene metiltransferase (modificação, *mod*) e um gene endonuclease (restrição, *res*) cujos produtos formam uma enzima de duas subunidades: Mod e Res. Os sistemas tipo III são excepcionais pois Res necessita de um complexo com Mod para ser funcional, no entanto, o oposto não é verdadeiro, pois Mod pode ser funcional independentemente de Res (SRIKHANTA et al., 2009).

Os genes *mod* contém repetições tandem que são propensas a variação de fase, um processo adaptativo o qual bactérias patogênicas realizam mudanças fenotípicas frequentes e reversíveis na expressão de antígenos de superfície, tais como lipopolissacarídeos e proteínas de membrana externa, o que resulta em alterações genéticas em *loci* específicos de seus

genomas (FOX; SRIKHANTA; JENNINGS, 2007) . Esse processo auxilia na colonização do hospedeiro, na adaptação ao nicho e na evasão do sistema imune. O número de repetições entre o gene *mod* influencia a taxa de variação de fase e a expressão do gene *mod*. Devido as mutações no limite do gene *res*, a enzima de restrição pode deixar de ser funcional. Por consequência, a evolução dos sistemas R-M tipo III em moduladores epigenéticos para controle da expressão gênica resulta na perda da função de restrição do DNA. A variação de fase no sistema R-M tipo III pode regular genes epigeneticamente por meio da metilação diferencial do genoma. Além disso, uma metiltransferase fase-variável poderia estar envolvida na patogênese pela expressão aleatória de fatores de virulência por meio de mudanças na metilação (RAO; DRYDEN; BHEEMANAİK, 2014). Muitos genes de NG são modulados aleatoriamente por variação de fase e estima-se que sejam mais de 100 genes que codificam para diversos produtos, o que proporciona diferentes vantagens às numerosas subpopulações bacterianas existentes durante a colonização. A família do gene Opa é o sistema de variação de fase mais bem caracterizado, tanto mecanicamente quanto funcionalmente. A variação do Opa ocorre por meio de mudanças no número de repetições CTCTT na sequência peptídica guia de cada um dos 11 alelos Opa no cromossomo, resultando em expressão alterada desses genes e afetando a aderência na célula hospedeira e o estímulo dos neutrófilos (QUILLIN; SEIFERT, 2018).

No presente estudo, o sistema R-M tipo III parece ter grande importância quando comparamos os dois isolados, visto que NGO0545 apresenta 354 vezes mais transcritos (logFC 8,47) no isolado R do que no isolado S. Esse fato nos leva a pensar que este sistema de função regulatória também possua um papel no fenótipo de diminuição da sensibilidade à CRO, visto que, no estudo de Srikhanta (2009), foram observadas relações entre este sistema e a expressão de genes relacionados à resistência antimicrobiana, como o *mtrF* (NGO1368), que está regulado positivamente no isolado R (Tabela 11 – Apêndice D). MtrF é uma proteína de membrana interna, e sugere-se que ela coopera com o complexo MtrC-MtrD-MtrE no transporte de antimicrobianos, por meio de um mecanismo desconhecido (VEAL; SHAFER, 2003). Su e colaboradores (2015) realizaram a caracterização da MtrF de NG, utilizando a combinação de estrutura cristalizada e ensaios bioquímicos funcionais e sugerem que MtrF é uma bomba de efluxo de antimicrobianos e que, até o momento, existem indícios de que essa proteína media a resistência bacteriana às sulfonamidas ou a fármacos antimetabólitos (SU et al., 2015). Tendo em vista a possível interação de MtrF com o complexo MtrC-MtrD-MtrE e sua função de

efluxo, novas investigações a respeito da interação dessa proteína com a CRO precisam ser realizadas a fim de comprovar a função de MtrF na redução de sensibilidade à CRO.

Muitos genes relacionados aos fagos estão presentes em genomas de *Neisserias* organizados como profagos. Sequências de profagos presentes nos pontos de rearranjo sugerem uma função ativa ou passiva na recombinação. No entanto, existem poucas evidências do que esses profagos são capazes de produzir (ROTMAN; SEIFERT, 2014). Estímulos ambientais e agentes exógenos os quais oxidam o DNA ou causam quebras na fita de DNA, como espécies reativas de oxigênio (ROS) e antimicrobianos podem ativar genes de profagos envolvidos no ciclo lítico (FORTIER; SEKULOVIC, 2013). Os fagos podem alterar as propriedades de virulência bacteriana por codificar genes envolvidos na adesão, colonização e invasão em células hospedeiras pelo aumento da resistência a componentes do sistema imune (WAGNER; WALDOR, 2002). Remmele e colaboradores (2014) sugerem que a maioria dos genes de profagos no gonococo possuem sua transcrição silenciosa em condições de laboratório com a exceção daqueles que codificam proteínas repressoras de fagos que mantêm ativamente a lisogenia do fago ou ativam-se quando as bactérias são submetidas a condições específicas (REMMELE et al., 2014). No entanto, observamos no presente estudo que os genes de profagos NGO1117 e NGO1118, quando comparamos isolados fenotipicamente diferentes, têm sua transcrição induzida no isolado com sensibilidade reduzida, mesmo sendo cultivados sob as mesmas condições.

Em um estudo de 2007 os autores verificaram a transcrição do gene NGO1116 e concluíram que o produto deste gene poderia reprimir diferencialmente a atividade do promotor, sugerindo que sua expressão no gonococo poderia silenciar a expressão dos profagos (PIEKAROWICZ et al., 2007). No presente estudo, verificamos NGO1116 regulado positivamente em R, porém, a expressão dos genes NGO1117 e NGO1118 está regulada positivamente, inclusive com transcrição maior que o repressor, sugerindo que NGO1116 não inibe a transcrição dos genes de fago deste operon.

Foram descritos pelo menos cinco clusters de fago nas extremidades das ilhas de bacteriófagos em NG. Os genes destes clusters são organizados por módulos, com regiões distintas codificando a estrutura e montagem das proteínas, sistemas toxina-antitoxina e fatores envolvidos na replicação de fagos (ADAMCZYK-POPLAWSKA; PIEKAROWICZ, 2009). Muitos dos genes de fago no gonococo codificam para proteínas com função desconhecida e não se sabe se essas proteínas estão envolvidas na patogênese desta bactéria. Klyz e

Piekarowicz (2018) sugerem que um gene pertencente a um fago do gonococo e com similaridade a uma toxina de *Vibrio cholerae*, é expresso na superfície de NG e poderia estar envolvido no dano ao tecido humano durante a infecção (KŁYŹ; PIEKAROWICZ, 2018). No entanto, apesar da extensa análise de bioinformática dos genomas de NG ter identificado e caracterizado bacteriófagos, existem poucas evidências sobre a função dos componentes de fago no ciclo de vida e patogênese do gonococo e a função das proteínas de fago permanecem incertas (CEHOVIN; LEWIS, 2017).

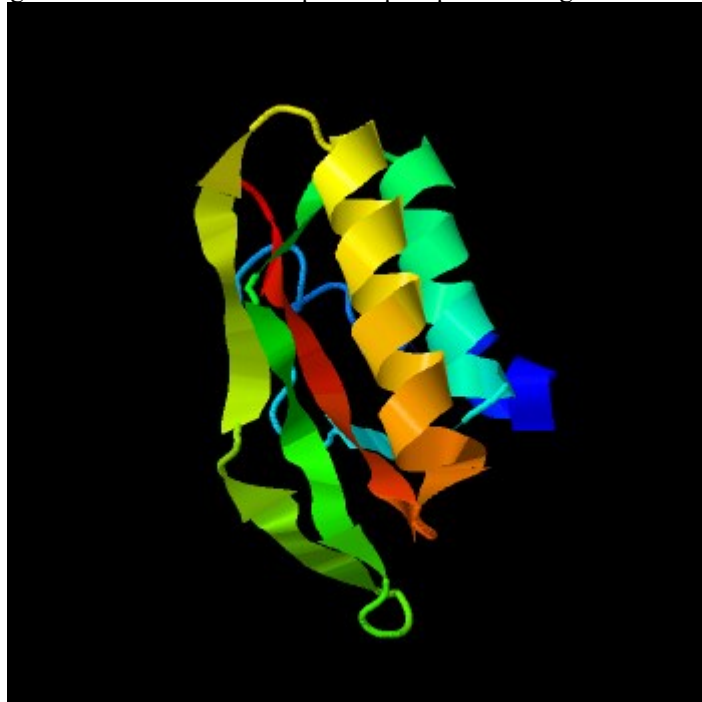
No presente estudo foi possível verificar diferenças na transcrição dos genes relacionados à produção de proteínas de fagos entre os isolados sequenciados e observamos a indução da transcrição dos genes característicos de dois diferentes profagos de NG descritos por Piekarowicz et al., (2007). No isolado R, os genes NGO1117, NGO1118 e NGO1119 estão regulados positivamente, e pertencem ao profago NgoΦ2, que o autor sugere que seja um profago funcional (PIEKAROWICZ et al., 2007). Os genes NGO1625, NGO1626, NGO1627, NGO1628 pertencem ao profago NgoΦ3. Estes genes e os RNAs antissenso estão reprimidos no isolado R. El-Rami e colaboradores (2019) realizaram uma análise proteômica das 14 cepas WHO, organizadas em *clusters* de acordo com o fenótipo de sensibilidade aos antimicrobianos, a fim de determinar o perfil de proteínas produzidas, para identificar possíveis candidatos a vacinas, identificar proteínas hipotéticas envolvidas na AMR e marcadores de AMR (EL-RAMI et al., 2019). No cluster V (composto pelas cepas WHO Y e WHO X, ambas resistentes à CRO) a proteína hipotética produto do gene NGO1628 foi identificada e estava reprimida em comparação aos outros *clusters*. A repressão na transcrição do gene NGO1628 também foi observada no isolado R do presente estudo (Tabela 12 – Apêndice D). Os RNAs preditos antissenso: 1627 1628 e antissenso: NGO1625 NGO1626 foram submetidos a análises no software INTA-RNA e obtiveram os melhores parâmetros de predição de interação nos mRNAs relativos aos seus genes senso (NGO1627 NGO1628 e NGO1625, NGO1626 respectivamente), os quais codificam proteínas associadas aos fagos. O *score* de enriquecimento de ambos RNAs antissenso estão abaixo de 1.3, não sendo estatisticamente significantes. Porém, tanto o gene quanto o RNA antissenso estão reprimidos em R, o que reforça que a expressão desse gene de fago e seu produto estejam relacionados às características fenotípicas dos isolados de NG, sugerindo regulação transcricional e traducional.

Ao realizar a análise do RNA Predito 11 (logFC 7,43), observamos a interação com maior correspondência e confiabilidade no mRNA da proteína de canal de cloreto (NGO1467)

e o *score* de enriquecimento das 100 interações preditas, realizado no programa DAVID, foi 1.38 (significância estatística *score* > 1.3) com o termo proteína ligadora de íon de metal. Estes parâmetros indicam uma possível regulação deste sRNA nessa proteína ou em outras proteínas de membrana que possuem função de transporte de íons, visto que o transcrito NGO1467, por exemplo, está regulado negativamente (logFC - 1,46) no isolado R.

A proteína hipotética codificada por NGO1069 possui um domínio IMM40, e foi submetida a predição de estrutura no I-TASSER, o qual resultou em um modelo com C-Score de -1,4 (C-score é o valor de confiança para estimar a qualidade do modelo predito [-5, 2], e quanto maior o valor, melhor a predição) tornando-se interessante para investigação futura (Figura 10). A estrutura predita foi comparada com as bases de dados de proteínas e a maior similaridade estrutural e funcional foi com a Colicina E5 de *Escherichia coli* (*E. coli*). As colicinas são produzidas por bactérias que carregam plasmídeos Col correspondente e destroem as células de bactérias sensíveis, por meio da inativação de canais de íons nas membranas internas, DNases ou RNases. As colicinas contêm três domínios: translocação de membrana; ligador-receptor e catalítico nas suas sequências primárias. As proteínas Imms ligam-se especificamente às colicinas cognatas a fim de proteger a própria célula (OGAWA et al., 2006). Foi encontrado no plasmídeo críptico de NG genes homólogos aos genes *col* de *E. coli*, no entanto, no estudo de Sarandopoulos; Davies (1993), não foi possível detectar a transcrição destes genes, impossibilitando a confirmação de atividade de transcrição dessa região plasmidial e estes autores sugeriram que essa condição devia-se às condições laboratoriais de cultura de NG (SARANDOPOULOS; DAVIES, 1993). No presente estudo observamos indução da transcrição desse gene que possivelmente codifica para um produto que está relacionado às colicinas e demonstrando sua atividade na célula bacteriana cultivada em condições laboratoriais, e além disso, podemos inferir que esta proteína desempenha uma função adaptativa em NG, principalmente por seu gene ter a transcrição induzida no isolado R, levando a hipótese de que as células de NG que contêm o plasmídeo *col* produzem as colicinas e eliminam as células sensíveis, selecionando parte de sua população.

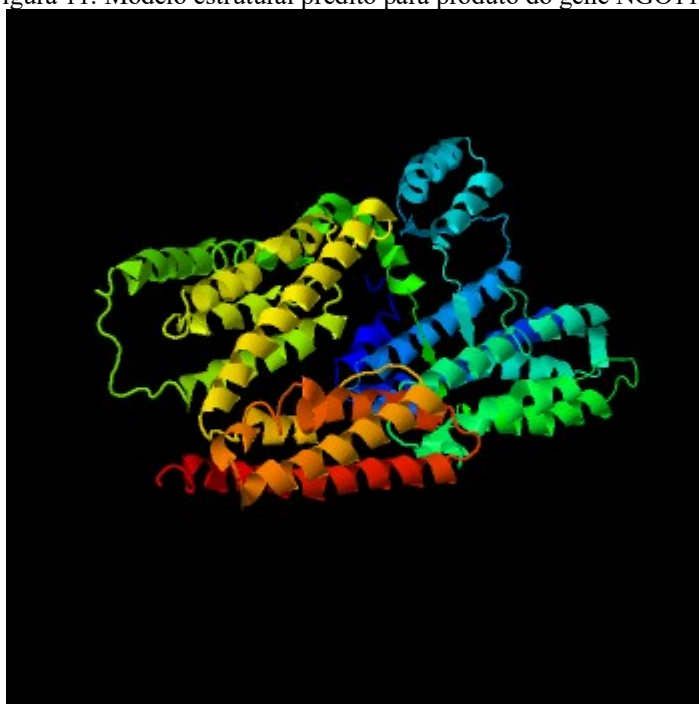
Figura 10. Modelo estrutural predito para produto do gene NGO1069



Legenda: Modelo estrutural obtido no programa I-TASSER. Fonte: Desenvolvido pela autora, 2020.

A predição estrutural da proteína hipotética NGO1197 (Figura 11) revelou um modelo similar às Talinas (C-score: -1.7) as quais são “maquinarias” de proteínas essenciais para adesão celular. No entanto, no que diz respeito à função e homologia, os termos GO encontrados são relacionadas a replicação do DNA e ligação com DNA. Além disso, o modelo que parece ser homólogo dessa proteína é de uma DNA polimerase mutante, demonstrando uma contradição entre a predição do modelo estrutural e sua possível função, o que sugere mais investigações a respeito do produto gênico de NGO1197.

Figura 11. Modelo estrutural predito para produto do gene NGO1197



Legenda: Modelo estrutural obtido no programa I-TASSER. Fonte: Desenvolvido pela autora, 2020.

Em seguida podemos visualizar a lista com os genes, seus códigos, a significância estatística e o logFC dos 20 genes com maior diferença na expressão entre as condições de presença e ausência da ceftriaxona.

Tabela 7. Lista dos 20 genes que apresentaram maior diferença de expressão entre as condições R *versus* RC

ID Gene	Nome do produto	logFC_{R/RC}	logFC_{RC/R}	p_{adj}
NGO1989	hypothetical protein	-1,66	1,66	0,040
NGO1188	magnesium transporter	-1,64	1,64	0,001
NGO2094	co-chaperonin GroES	-1,58	1,58	0,027
NGO0567	hydrolase	-1,56	1,56	0,002
predicted RNA	antisense: NGO1440	-1,53	1,53	0,004
predicted RNA	antisense: NGO1440_2	-1,52	1,52	0,004
predicted RNA	antisense: NGO1440_3	-1,50	1,50	0,005
predicted RNA	antisense: NGO1440_4	-1,46	1,46	0,009
NGO1290	amino-acid transporter sodium/alanine symporter	-1,33	1,33	0,012
predicted RNA	antisense: groES groEL	-1,33	1,33	0,027
predicted RNA	antisense: NGO1024	2,28	-2,28	0,004
predicted RNA	antisense: NGO0863	1,64	-1,64	0,012
predicted RNA	antisense: NGO1024	1,53	-1,53	0,015
NGO0581	30S ribosomal protein S6	1,53	-1,53	0,002
NGO2097	hypothetical protein	1,45	-1,45	0,026

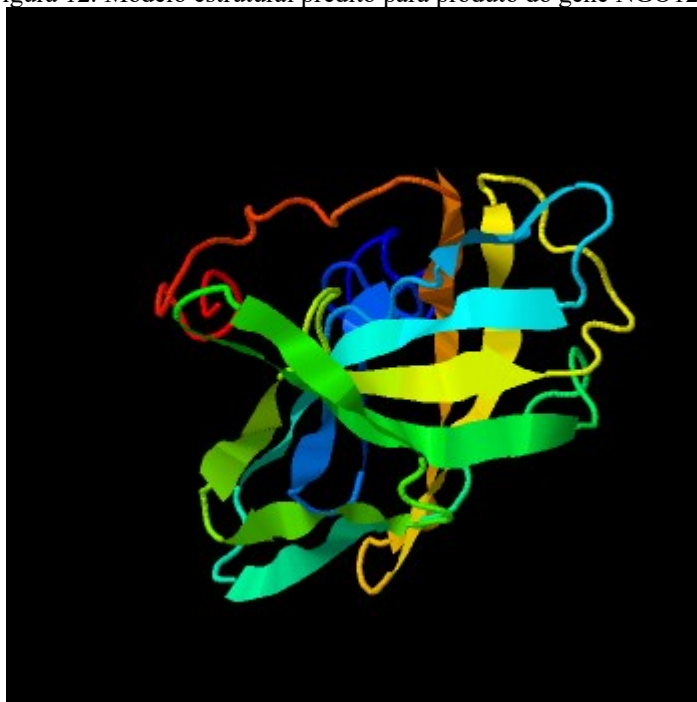
NGO1215	hypothetical protein	1,41	-1,41	0,037
predicted RNA	antisense: NGO1581	1,36	-1,36	0,022
NGO0083	pilin glycosylation protein	1,32	-1,32	0,040
NGO1763	3-oxoacyl-ACP synthase	1,27	-1,27	0,025
NGO0759	hypothetical protein	1,16	-1,16	0,010
predicted RNA	antisense: NGO1374	1,23	-1,23	0,029

Legenda: padj: p-valor ajustado ou q-valor. Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

As proteínas hipotéticas codificadas por NGO1989, NGO2097 e NGO0759 obtiveram C-score dos modelos preditos no I-TASSER considerados ruins, abaixo do ponto de corte definido neste estudo (c-score > -2.1), portanto, não foram realizadas análises relativas a analogia, homologia e similaridade dos modelos estruturais.

A predição da proteína hipotética codificada por NGO1215 obteve um C-score de -0.57, o melhor entre todas as predições de modelos realizadas neste estudo (Figura 12). Sua estrutura possui analogia com o domínio ligador de Cobre da chaperona periplasmática (PCuAC) e homologia com a proteína de canal de potássio Kir (*K⁺ inward rectifier*). Os termos GO em consenso demonstram que esta proteína estaria envolvida no transporte de cátions inorgânicos monovalentes por meio de um canal transmembrana. Dessa forma, buscamos o peptídeo sinal com o programa SignalP 5.0 (acesso em 28/01/2020), o qual foi encontrado (probabilidade 79%). Este achado demonstra a possibilidade de identificação de uma proteína importante para a homeostase bacteriana que permanece desconhecida e com características elegíveis para análise experimental.

Figura 12. Modelo estrutural predito para produto do gene NGO1215



Legenda: Modelo estrutural obtido no programa I-TASSER. Fonte: Desenvolvido pela autora, 2020.

Os pequenos RNAs (sRNAs) podem ser identificados e estudados utilizando o RNA-Seq, com uma vantagem importante em NG, pois este microrganismo possui poucas proteínas ligadoras de DNA e pode depender fortemente de sRNAs reguladores. Porém, em alguns casos, as colunas de sílica com capacidade de ligação no RNA, como as do kit RNeasy utilizadas neste estudo, nem sempre coletam RNA de tamanhos diferentes de forma uniforme, e preferencialmente, ligam RNAs nas colunas com tamanhos maiores do que 200 nt, incapacitando seu uso em trabalhos que pretendem utilizar sRNAs com tamanhos inferiores a este (CHRISTODOULIDES, 2019). No entanto, em ambas as comparações, foram encontrados diversos RNAs preditos classificados como antissenso.

Muitas classes de pequenos RNAs reguladores (sRNAs) já foram identificadas e a mais simples classe de sRNAs são os RNAs antissenso. Em alguns casos, mas não todos, a ligação do sRNAs ao seu mRNA alvo necessita da chaperona Hfq (CECH; STEITZ, 2014). Transcritos antissenso, uma classe de ncRNAs longos, são transcritos da fita oposta aquelas dos transcrito senso de genes codificantes de proteínas ou não (PELECHANO; STEINMETZ, 2013). A maioria dos RNAs antissenso tem o potencial de formar uma ou mais estruturas *stem-loop*. Em alguns casos, estas estruturas têm sido claramente estabelecidas. Muitos dos loops são mais energeticamente favoráveis em tamanho de seis a sete nucleotídeos. Para a maioria das reações

antissenso, contatos críticos entre o RNA antissenso e seu alvo ocorre nos loops do RNA antissenso. Essas sequências críticas podem estar presentes nos loops como uma forma conveniente de garantir que sequências de fita simples estejam disponíveis para o pareamento, mas não acessíveis às RNases da célula. No entanto, restringir as sequências de fita simples nos loops também pode ter importantes características mecânicas. As hastes dos RNAs antissenso não só permitem a formação de *loops* adequados, como também determinam a estabilidade ou instabilidade de muitas moléculas antissenso (SIMONS, 1988). Algumas evidências reforçam a sugestão que RNAs antissenso tem uma função geral em mudanças epigenéticas por recrutar DNA-metiltransferases (COSSART, 2012).

Em procariotos, sistemas regulados por RNAs antissenso tem sido identificados majoritariamente em elementos de DNA “acessórios”, como plasmídeos, fagos e transposons, com poucos representantes de origem cromossômica. No entanto, alguns pequenos RNAs codificados por cromossomo que tinham sua função desconhecida, foram identificados agindo como RNAs antissenso (BRANTL, 2002).

Os sRNAs bacterianos são muito heterogêneos em tamanho, estrutura e função. Apesar de exceções, a maioria dos sRNAs agem como reguladores pós transcricionais ou traducionais por interagirem com a região 5'-UTR dos transcritos de mRNA. Os sRNAs podem ter como alvo mais de um mRNA, e um mRNA pode ser alvo de mais de um sRNA. O efeito da regulação positiva ou negativa do alvo depende da localização exata da região de interação e seu efeito na estrutura do alvo mRNA (EGGENHOFER et al., 2011).

Os RNAs antissenso NGO1440 foram submetidos à análise no programa INTA-RNA como um único RNA (suas sequências obtiveram sobreposição em alguns pontos e possivelmente sejam um único RNA não codificante longo), e sua expressão está em um nível muito semelhante entre os 4. A melhor interação encontrada foi com o mRNA da proteína NGO1056, uma peptidase. O score de enriquecimento foi de 1.2 e indicou que o termo transporte foi o mais observado dentre as predições. No entanto, não observamos diferenças na quantificação do gene NGO1056. Dessa forma, realizamos a análise dos 4 NGO1440 antissenso individualmente, e observamos diferentes interações preditas: antissenso NGO1440 obteve *score* de 1.35 e os termos mais frequentes foram: Reparo e ligação ao DNA e resposta celular ao stress; antissenso NGO1440_2 *score* 1.17 para ligação ao rRNA/tradução; antissenso NGO1440_3 *score* 0.7 para biossíntese de polissacarídeos e carboidratos; antissenso NGO1440_4 *score* 0.88 para síntese de peptideoglicana/biossíntese de polissacarídeos. O único

score com relevância estatística (1.35) foi relativo a ligação/reparo do DNA e resposta celular ao stress, o que pode ser justificado pela presença da CRO, indicando que este RNA antissenso teria alguma função regulatória, possivelmente promovendo a indução da transcrição dos genes envolvidos na resposta ao dano e reparo do DNA (Quadro 5). Os genes da DNA polimerase IV (*dinB*) envolvida no reparo do DNA e o gene da recombinase A (*recA*), envolvida na resposta do sistema SOS, estão regulados positivamente na condição RC. Dwyer et al., (2014) analisou a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzidas pela atividade de diferentes antimicrobianos, incluindo CRO, e sugeriu que alterações fisiológicas induzidas por antimicrobianos podem participar da resposta geral ao stress, na qual a produção de ROS aumenta a mortalidade bacteriana em níveis letais mas promove mutagênese em doses subletais (DWYER et al., 2014). É possível que essa resposta transcricional esteja associada ao dano oxidativo que a CRO pode estar causando, visto que já se sabe que diversos agentes antimicrobianos em concentrações subinibitórias resultam em dano ao DNA (MESAK; MIAO; DAVIES, 2008) e por consequência, realizam mudanças transcricionais em genes responsáveis pelo reparo do DNA e pela integridade do genoma (YIM; HUIMI WANG; DAVIES, 2006). Além disso, a polimerase IV também é considerada necessária para a formação de mutações pontuais no operon *lac*, sendo um importante determinante no desenvolvimento da resistência ao ciprofloxacino em laboratório (CIRZ et al., 2005). Em *Escherichia coli*, DinB é uma das três enzimas que podem evitar lesões no DNA potencialmente fatais na fita molde durante a replicação e é a única DNA polimerase translesão ativa na troca de fita mediada por RecA durante reparo de quebra de dupla fita propensa a erro (TASHJIAN et al., 2019). Assim, podemos inferir que em NG, o processo de reparo do dano ao DNA provavelmente ocasionado pela presença de CRO, está sendo realizado por DinB e RecA e pode ter o envolvimento do RNA antissenso NGO1440.

Quadro 5. RNAs antissenso e suas características encontradas no programa INTA-RNA

Antissenso	Alvo de provável interação	Termo GO	Score	Condição
NGO1440	NGO1056: peptidase	reparo e ligação ao DNA e resposta celular ao stress	1.35	RxRC
NGO1440_2	NGO1056: peptidase	ligação ao rRNA/tradução	1.17	RxRC
NGO1440_3	NGO1056: peptidase	biossíntese de polissacarídeos e carboidratos	0.7	RxRC

NGO1440_4	NGO1056: peptidase	síntese de peptidoglicana/biossíntese de polissacarídeos	0.88	RxRC
antissenso groES groEL_1	NGO0307: supressor de exclusão FsxA, NGO1319: proteína A paraquat-induzível, NGO1774: efluxo antiporte de potássio.	biossíntese de aminoácidos aromáticos	1.18	RxRC
antissenso groES groEL_2	NGO0395: proteína de efluxo multidroga, NGO0468; fosfatase fosfoserina	processo biosintético de lipopolissacarídeos, carboidratos e lipídeos	1.16	RxRC
antissenso groES groEL_3	NGO0256: proteína antiterminação de transcrição NusB; NGO0090: regulador transcricional NrdR	reparo do DNA, resposta ao dano do DNA, resposta ao stress, recombinação	1.55	RxRC
NGO1024_2	NGO0760 (ruvB)	resposta ao stress e reparo do DNA	1.33	RxRC

Fonte: Desenvolvido pela autora, 2020

Já o RNA antissenso groES groEL possui uma sequência nucleotídica de mais de 2.1kb, impossibilitando a análise como um único sRNA. Dessa forma dividimos a sequência em 3 partes de aproximadamente 700nt e obtivemos os seguintes resultados: parte 1: interação com o melhor p-valor, FDR e energia de ligação no mRNA de NGO0307: supressor de exclusão FsxA, (envolvido na excisão do fago T7 em *E. coli*), NGO1319: proteína A paraquat-induzível, NGO1774: efluxo antiporte de potássio. No entanto, o termo de função mais frequente para as 100 predições foi a biossíntese de aminoácidos aromáticos (*score*: 1.18); parte 2: interação com NGO0395: proteína de efluxo multidroga, NGO0468; fosfatase fosfoserina. Os termos de função mais frequentes foram: processo biosintético de lipopolissacarídeos, lipídeos e

carboidratos (*score*: 1.16); parte 3: interação com NGO0256: proteína antiterminação de transcrição NusB; NGO0090: regulador transcricional NrdR. Os termos de função identificados após enriquecimento foram: reparo do DNA, resposta ao dano do DNA, resposta ao stress, recombinação (*score*: 1.55). Este RNA antissenso está com sua transcrição induzida na condição de presença de CRO, o que nos leva a pensar que existe de fato a correlação da interação com mRNAs de genes relacionados principalmente a resposta ao stress e ao reparo do dano ao DNA, da mesma forma que foi observado com o RNA antissenso NGO1440. No entanto, os genes NusB e NrdR não estão transcritos diferencialmente no experimento, e portanto, será necessária uma análise mais profunda para identificar o verdadeiro alvo de interação deste RNA antissenso.

O RNA antissenso NGO1581 obteve *score* baixo no enriquecimento dos termos GO (0.5), e FDR de 0.88, não sendo considerada uma boa análise de predição de interação.

Com relação ao antissenso NGO1024_2, verificamos a possível interação com o mRNA NGO0760 (*ruvB*), o qual está regulado negativamente na condição de presença de CRO, assim como este RNA antissenso, indicando possivelmente uma correlação entre a transcrição do RNA antissenso e o mRNA. O enriquecimento dos termos indicou resposta ao stress e reparo do DNA (*score*: 1.33), em concordância com seu possível alvo de interação, *ruvB*, codificante para uma helicase dependente de ATP – Junção Holliday. A presença do fármaco reprimiu a transcrição do gene *ruvB* quanto deste RNA antissenso em NG, o que parece incomum, visto que os estímulos provocados pela CRO estão indicando a ativação de respostas ao dano do DNA, o que sugere investigações mais profundas a respeito da atividade de RuvB em NG.

A interação com os melhores parâmetros foi observada no RNA antissenso 1374, reprimido em RC, na qual o FDR e p-valor foram 0 com a região 5' UTR do mRNA da subunidade II do citocromo oxidase c tipo *cbb3* (NGO1373) e o *score* de enriquecimento foi 1.55 para o termo transferase, indicando a influência deste RNA antissenso em mRNAs de proteínas envolvidas na transferência de íons ou elétrons. Todavia, não observamos alteração na transcrição do gene NGO1373 e sua interação com o RNA antissenso precisa ser elucidada.

Apesar de observamos grandes diferenças na transcrição de alguns genes, as maiores diferenças não foram observadas em genes relacionados à resistência a CRO (*penA*, *ponA*, *mtrR* e *porB*), tanto na comparação entre R e S quanto na comparação R e RC, demonstrando o dinamismo celular de NG e indicando influência de determinantes transcricionais e a presença de outras vias metabólicas que podem estar relacionados a resistência antimicrobiana.

Dentre as análises realizadas no INTA-RNA foi possível verificar que os alvos de interação com os melhores parâmetros (menor p-valor, menor temperatura e menor FDR) não obtiveram estreita relação com a expressão do RNA antissenso, porém, ao considerar diversas interações preditas (100 interações como *default*), após o enriquecimento dos termos GO relativos a cada gene, foi possível identificar a correlação experimental e o processo biológico de alguns RNAs antissenso.

A maioria das proteínas descritas nas tabelas 8 e 9 (Apêndice C) fazem parte do metabolismo basal da célula bacteriana, enfatizando que os bancos de dados possuem poucas informações curadas a respeito de outros mecanismos celulares em NG, visto que de 244 genes depositados, obtivemos apenas 26 respostas, situação similar observada na comparação R e RC. Além disso, são descritas duas proteínas UPF, as quais não possuem anotação funcional, no entanto, tiveram sua anotação revisada e foram identificadas. Para a identificação de possíveis assinaturas transcricionais relacionadas ao fenótipo de diminuição da sensibilidade à CRO, seria necessário realizar o enriquecimento de todo o conjunto de dados dos genes diferencialmente expressos, o que não foi possível devido à ausência de informação revisada relativa aos genes de NG, necessária para utilizar o algoritmo PANTHER do Gene Ontology.

O estudo de Zhao e colaboradores (2019) analisou o transcriptoma de isolados de NG com sensibilidade reduzida à CRO (n=7) em comparação com isolados sensíveis (n=3). Apesar de não terem utilizado réplicas e possuírem apenas 24.7Mb de *reads* para cada isolado, foram encontrados 21 genes diferencialmente expressos; destes 21, 10 foram identificados no nosso estudo com diferença de expressão entre o isolado S e R (NGO1073, NGO1861, NGO1302, NGO0713, NGO1116, NGO0950, NGO1542, NGO1442, NGO1118 e NGO117). O autor observou diversos genes associados ao componente celular regulados positivamente, e além disso, há um destaque para os genes codificantes de proteínas associadas ao fago (NGO1116, 1117 e 1118) (ZHAO et al., 2019). Ambas observações foram realizadas no presente estudo e indicam a relação destes genes, ou de seus produtos, na determinação da resistência de NG à CRO.

El Rami e colaboradores (2018) sugerem que deve-se verificar os perfis de cepas selvagens e resistentes de gonococo durante a exposição a diferentes níveis de antimicrobianos, e que o papel funcional das proteínas hipotéticas reguladas diferencialmente e potencialmente envolvidas na AMR de NG devem ser elucidadas, pois estes fatores podem ajudar a decifrar a complexa rede de resistência antimicrobiana e promover o planejamento de formar de evitar a

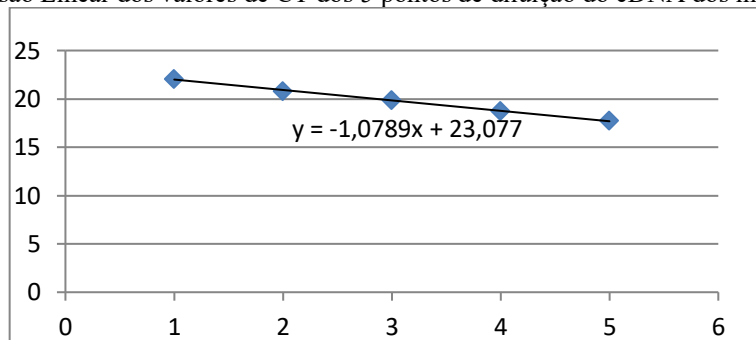
propagação da AMR de NG, o que demonstra a relevância dos dados adquiridos no presente estudo, os quais estão de acordo com as novas estratégias utilizadas para identificar os determinantes de resistência do gonococo.

5.6 PADRONIZAÇÃO RT-QPCR

Após realização da qPCR, os dados brutos de Cq obtidos foram utilizados para calcular a eficiência dos 11 pares de iniciadores, utilizando a média geométrica das triplicatas para cada concentração de cDNA de cada iniciador. Assim foi possível realizar o cálculo de regressão linear e em seguida, a eficiência da reação.

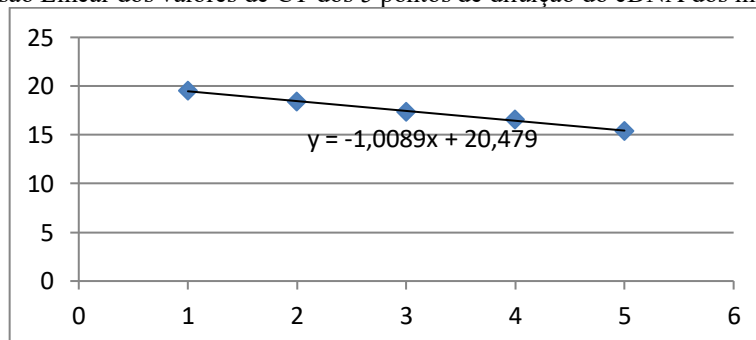
A seguir podemos verificar os gráficos de regressão linear semi-log do valor CT em comparação ao log da quantidade inicial do ácido nucleico de cada iniciador.

Gráfico 4. Regressão Linear dos valores de CT dos 5 pontos de diluição do cDNA dos iniciadores NGO0093



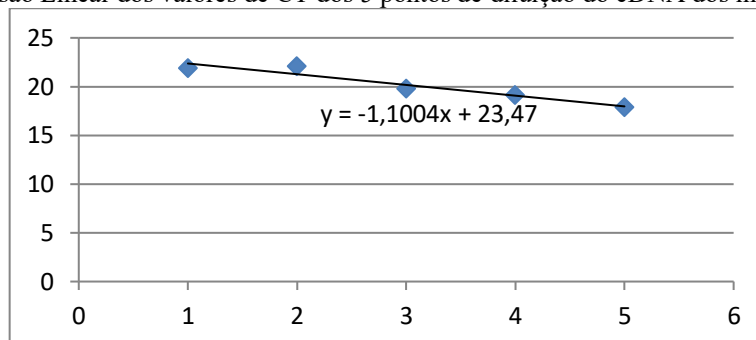
Legenda: Eixo X: Diluição do cDNA: 1: 5ng, 2: 10ng, 3: 20ng, 4: 40ng, 5: 80ng. Eixo Y: Ciclos de quantificação (Cq). Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

Gráfico 5. Regressão Linear dos valores de CT dos 5 pontos de diluição do cDNA dos iniciadores NGO0936



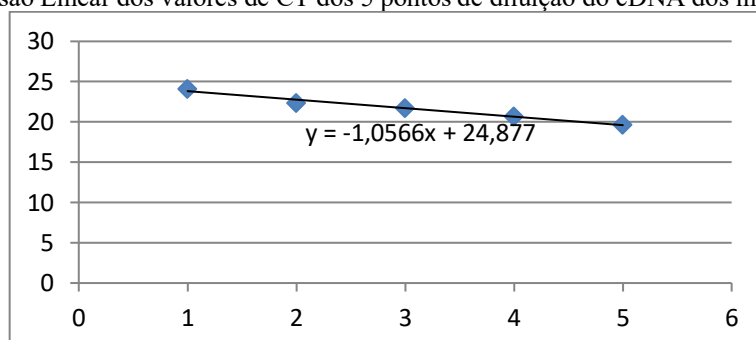
Legenda: Eixo X: Diluição do cDNA: 1: 5ng, 2: 10ng, 3: 20ng, 4: 40ng, 5: 80ng. Eixo Y: Ciclos de quantificação (Cq). Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

Gráfico 6. Regressão Linear dos valores de CT dos 5 pontos de diluição do cDNA dos iniciadores NGO2060



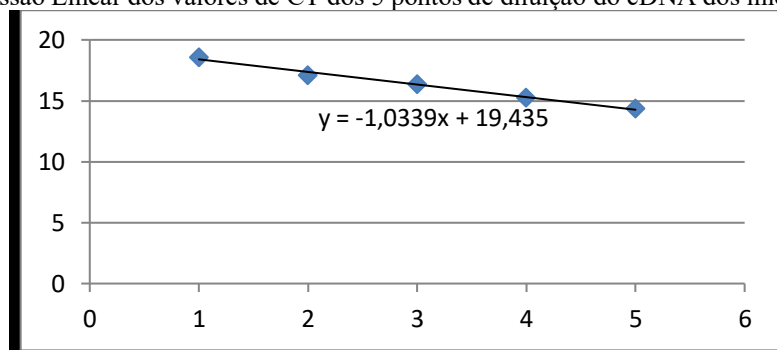
Legenda: Eixo X: Diluição do cDNA: 1: 5ng, 2: 10ng, 3: 20ng, 4: 40ng, 5: 80ng. Eixo Y: Ciclos de quantificação (Cq). Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

Gráfico 7. Regressão Linear dos valores de CT dos 5 pontos de diluição do cDNA dos iniciadores NGO0626



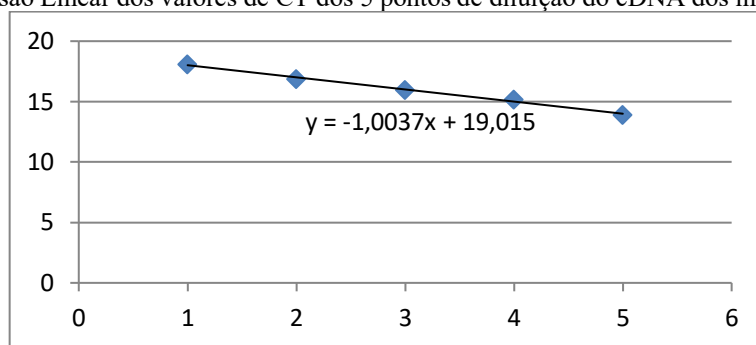
Legenda: Eixo X: Diluição do cDNA: 1: 5ng, 2: 10ng, 3: 20ng, 4: 40ng, 5: 80ng. Eixo Y: Ciclos de quantificação (Cq). Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

Gráfico 8. Regressão Linear dos valores de CT dos 5 pontos de diluição do cDNA dos iniciadores NGO1854



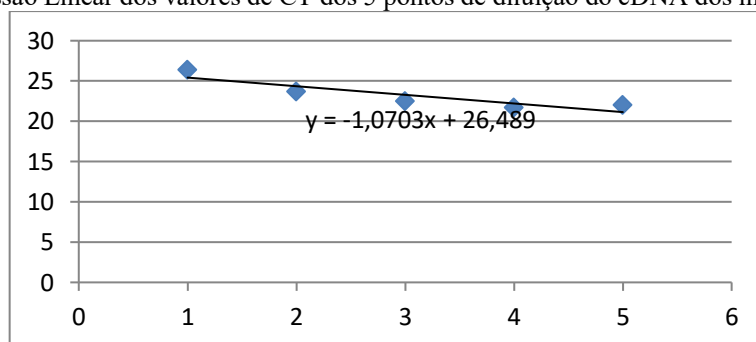
Legenda: Eixo X: Diluição do cDNA: 1: 5ng, 2: 10ng, 3: 20ng, 4: 40ng, 5: 80ng. Eixo Y: Ciclos de quantificação (Cq). Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

Gráfico 9. Regressão Linear dos valores de CT dos 5 pontos de diluição do cDNA dos iniciadores NGO2094



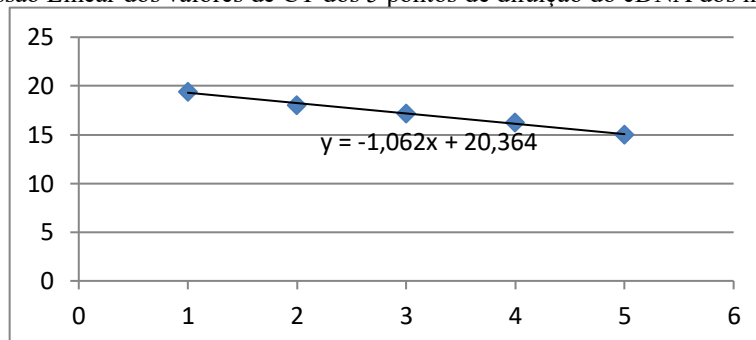
Legenda: Eixo X: Diluição do cDNA: 1: 5ng, 2: 10ng, 3: 20ng, 4: 40ng, 5: 80ng. Eixo Y: Ciclos de quantificação (Cq). Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

Gráfico 10. Regressão Linear dos valores de CT dos 5 pontos de diluição do cDNA dos iniciadores NGO0083



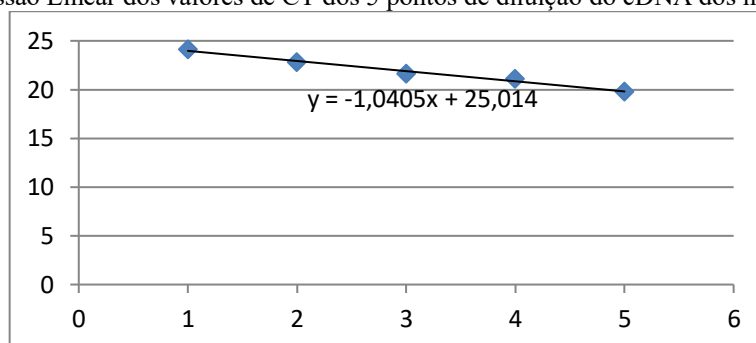
Legenda: Eixo X: Diluição do cDNA: 1: 5ng, 2: 10ng, 3: 20ng, 4: 40ng, 5: 80ng. Eixo Y: Ciclos de quantificação (Cq). Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

Gráfico 11. Regressão Linear dos valores de CT dos 5 pontos de diluição do cDNA dos iniciadores NGO0863



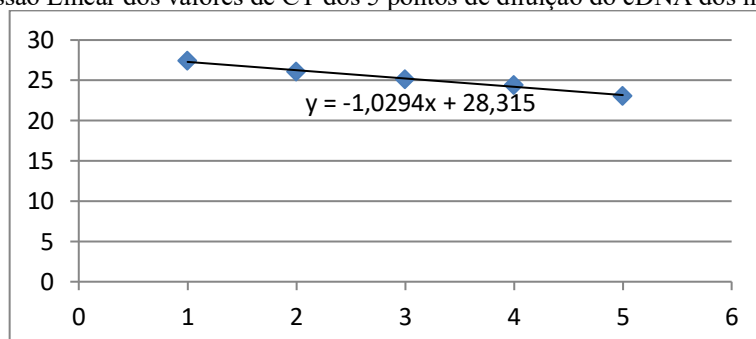
Legenda: Eixo X: Diluição do cDNA: 1: 5ng, 2: 10ng, 3: 20ng, 4: 40ng, 5: 80ng. Eixo Y: Ciclos de quantificação (Cq). Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

Gráfico 12. Regressão Linear dos valores de CT dos 5 pontos de diluição do cDNA dos iniciadores NGO1989



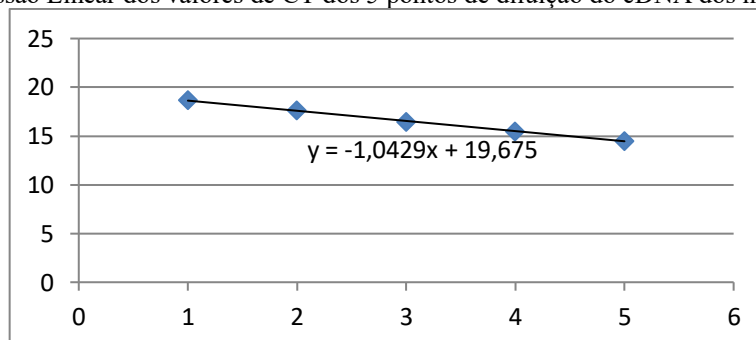
Legenda: Eixo X: Diluição do cDNA: 1: 5ng, 2: 10ng, 3: 20ng, 4: 40ng, 5: 80ng. Eixo Y: Ciclos de quantificação (Cq). Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

Gráfico 13. Regressão Linear dos valores de CT dos 5 pontos de diluição do cDNA dos iniciadores NGO0602



Legenda: Eixo X: Diluição do cDNA: 1: 5ng, 2: 10ng, 3: 20ng, 4: 40ng, 5: 80ng. Eixo Y: Ciclos de quantificação (Cq). Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

Gráfico 14. Regressão Linear dos valores de CT dos 5 pontos de diluição do cDNA dos iniciadores NGO1627



Legenda: Eixo X: Diluição do cDNA: 1: 5ng, 2: 10ng, 3: 20ng, 4: 40ng, 5: 80ng. Eixo Y: Ciclos de quantificação (Cq). Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

Na tabela 8 é possível observar a eficiência final calculada, após padronização, para cada par de iniciador.

Tabela 8. Descrição dos iniciadores, eficiência e concentração na reação

Iniciador	Condição	Eficiência	Concentração
NGO0626	Normalizador	93%	200nM
NGO1854	Normalizador	96%	200nM

NGO0863	UP R DOWN RC	99%	200nM
NGO0083	UP R DOWN RC	91%	100nM
NGO0093	UP R DOWN S	90%	200nM
NGO2060	UP R DOWN S	88%	200nM
NGO2094	UP RC DOWN R	99%	200nM
NGO1989	UP RC DOWN R	102%	200nM
NGO0936	UP S DOWN R	99%	200nM
NGO0602	UP S DOWN R	96%	100nM
NGO1627	UP S DOWN R	94%	100nM

Legenda: UP: regulado positivamente, DOWN: regulado negativamente. Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

É possível verificar que todos os genes foram padronizados com sucesso para a qPCR, obtendo eficiências de 88% a 102%. Pacheco (2015) realizou uma revisão da literatura em busca de uma padronização dos genes normalizadores utilizados para ensaios de RT-qPCR de bactérias. No entanto, ele verificou que muitos genes utilizados, principalmente o rRNA 16S, amplamente difundido como gene normalizador, não demonstrava resultados comparáveis nos estudos e era frequentemente descartado como normalizador (PACHECO, 2015). No presente estudo escolhemos genes de referência de acordo com a significância estatística ($p \leq 0,05$) e *fold change* o mais próximo de 1 em todos os experimentos, para que fosse possível comparar os níveis de expressão nas 3 condições utilizando os mesmos normalizadores.

Para este ensaio também foram escolhidos genes com produto de proteínas hipotéticas e que demonstraram alguma importância no experimento devido sua diferença na expressão quando comparados: os genes NGO0863 e NGO1989.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível concluir que:

Os componentes genômicos de resistência não são exclusivamente responsáveis por determinar a resistência à CRO;

Foram adquiridos dados de alta qualidade para realizar inferências no que diz respeito a AMR de NG por meio do RNA-Seq;

Existe uma forte influência de mecanismos de regulação da transcrição quando comparamos os dois isolados (R e S), com destaque para o sistema de restrição-modificação do tipo III;

RNAs antissenso possuem grande importância no fenótipo de NG e podem estar associados à resistência a CRO;

Os genes associados ao fago estão amplamente presentes no transcriptoma dos três experimentos (R, RC e S) destacando a necessidade de estudos laboratoriais que comprovem a expressão dos produtos dos transcritos ou confirmem sua função de regulação transcricional;

Os bancos de dados ainda carecem de muita informação revisada a respeito de NG;

Como perspectivas estão:

Estudos mais aprofundados utilizando maior capacidade computacional com os dados relativos aos genes diferencialmente expressos dos experimentos, visto que encontramos vias alternativas às clássicas de determinação de resistência e cada uma dessas novas vias deve ser estudada profundamente para que seja possível determinar sua relação com os demais determinantes de resistência;

Validação dos dados de RNA-seq com a RT-qPCR dos genes diferencialmente expressos padronizados;

Anotação funcional em banco de dados.

REFERÊNCIAS

ABDI, H.; WILLIAMS, L. J. Principal component analysis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, v. 2, n. 4, p. 433–459, 2010.

ABRAMS, A. J.; TREES, D. L. Genomic sequencing of *Neisseria gonorrhoeae* to respond to the urgent threat of antimicrobial-resistant gonorrhea. **Pathogens and disease**, v. 75, n. 4, p. 1–9, 2017.

ADAMCZYK-POPLAWSKA, M.; PIEKAROWICZ, A. restriction modification system in *Neisseria gonorrhoeae*. 2009.

BAZZO, M. L. et al. First nationwide antimicrobial susceptibility surveillance for *Neisseria gonorrhoeae* in Brazil, 2015–16. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. April, p. 4–11, 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jac/advance-article/doi/10.1093/jac/dky090/4960905>>.

BELENKY, P. et al. Bactericidal Antibiotics Induce Toxic Metabolic Perturbations that Lead to Cellular Damage. **Cell Reports**, v. 13, n. 5, p. 968–980, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.059>>.

BERNARDINI, G. et al. Proteome analysis of *Neisseria meningitidis* serogroup A. **Proteomics**, v. 4, n. 10, p. 2893–2926, 2004.

BIGNELL, C.; UNEMO, M. European Guideline on the Diagnosis and Treatment of Gonorrhoeae in Adults. **Int J STD AIDS**, v. 24, n. 2, p. 85–92, 2013.

BRANTL, S. Antisense-RNA regulation and RNA interference. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression**, v. 1575, n. 1–3, p. 15–25, 2002.

BRASIL. NOTA INFORMATIVA Nº 6-SEI/2017-COVIG/CGVP/DIAHV/SVS/MS. Atualização da recomendação nacional do tratamento preferencial da infecção gonocócica anogenital não complicada (uretra, colo do útero e reto). **Departamento De Vigilância, Prevenção E Controle Das Infecções Sexualmente Transmissíveis, Do Hiv/Aids E Das Hepatites Virais.**, v. 6, n. Im, p. 1–2, 2017.

BRASIL. Atenção Integral Às Pessoas Com Infecções Sexualmente Transmissíveis (Ist) Protocolo Clínico E Diretrizes Terapêuticas Para. 2019. Disponível em: <www.aids.gov.br>.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CASADESUS, J.; LOW, D. Epigenetic Gene Regulation in the Bacterial World. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 3, p. 830–856, 2006. Disponível em: <<http://mmb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00016-06>>.

CECH, T. R.; STEITZ, J. A. The noncoding RNA revolution - Trashing old rules to forge new ones. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 77–94, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.008>>.

CEHOVIN, A.; LEWIS, S. B. Mobile genetic elements in *Neisseria gonorrhoeae*: Movement for change. **Pathogens and Disease**, v. 75, n. 6, p. 1–12, 2017.

CHEN, C. Y. et al. Physiology and metabolism of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*: implications for pathogenesis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 2 Suppl, n. 0893-8512 (Print), p. S35–S40, 1989.

CHEN, S. C. et al. First nationwide study regarding ceftriaxone resistance and molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 1, p. 92–99, 2016.

CHRISTODOULIDES, M. **Neisseria gonorrhoeae Methods and Protocols**. Southhampton: Methods in Molecular Biology 1997, 2019.

CHURCHWARD, C. P. et al. Phase variable DNA repeats in *Neisseria gonorrhoeae* influence transcription, translation, and protein sequence variation. **Microbial Genomics**, v. 2, n. 8, p. 1–14, 2016. Disponível em: <<http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/mgen/10.1099/mgen.0.000078>>.

CIRZ, R. T. et al. Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. **PLoS Biology**, v. 3, n. 6, p. 1024–1033, 2005.

COSSART, P. **Epigenetics and Bacterial Infections**. 2012.

COSTA-LOURENÇO, A. P. R. da et al. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: history, molecular mechanisms and epidemiological aspects of an emerging global threat. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 617–628, 2017.

DAOU, N. et al. *Neisseria* prophage repressor implicated in gonococcal pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 10, p. 3652–3661, 2013.

DAY, T.; GANDON, S. The evolutionary epidemiology of multilocus drug resistance. **Evolution**, v. 66, n. 5, p. 1582–1597, 2012.

DETELS, R. et al. The incidence and correlates of symptomatic and asymptomatic chlamydia trachomatis and *neisseria gonorrhoeae* infections in selected populations in five countries. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 38, n. 6, p. 503–509, jun. 2011.

DWYER, D. J. et al. Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 20, p. E2100–E2109, 2014. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1401876111>>.

DWYER, D. J.; KOHANSKI, M. A.; COLLINS, J. J. Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 482–489, 2009.

EGGENHOFER, F. et al. RNApredator: Fast accessibility-based prediction of sRNA targets. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. SUPPL. 2, p. 149–154, 2011.

EL-RAMI, F. E. et al. Quantitative proteomics of the 2016 WHO Neisseria gonorrhoeae reference strains surveys vaccine candidates and antimicrobial resistance determinants. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 18, n. 1, p. 127–150, 2019.

FORTIER, L.; SEKULOVIC, O. Fortier. v. 4, n. 5, p. 354–365, 2013.

FOX, K. L.; SRIKHANTA, Y. N.; JENNINGS, M. P. MicroReview Phase variable type III restriction-modification systems of host-adapted bacterial pathogens. v. 65, n. August, p. 1375–1379, 2007.

GIANECINI, R. et al. Neisseria gonorrhoeae resistant to ceftriaxone and cefixime, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 6, p. 1139–1141, 2016.

GIANECINI, R. et al. Emergence and spread of neisseria gonorrhoeae isolates with decreased susceptibility to extended-spectrum cephalosporins in Argentina, 2009 to 2013. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 44, n. 6, p. 351–355, 2017.

GOLPARIAN, D. et al. Emergence, spread and characteristics of Neisseria gonorrhoeae isolates with in vitro decreased susceptibility and resistance to extended-spectrum cephalosporins in Sweden. **Sexually Transmitted Infections**, v. 86, n. 6, p. 454–460, 2010.

GONG, Z. et al. Novel genes related to ceftriaxone resistance found among ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* selected in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 4, p. Accepted manuscript, 2016. Disponível em: <<http://aac.asm.org/content/early/2016/01/12/AAC.00149-15.abstract>>.

GOSE, S. et al. Neisseria gonorrhoeae and extended-spectrum cephalosporins in California: Surveillance and molecular detection of mosaic penA. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2013.

HARRISON, O. B. et al. Genomic analyses of Neisseria gonorrhoeae reveal an association of the gonococcal genetic island with antimicrobial resistance. **Journal of Infection**, v. 73, n. 6, p. 578–587, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2016.08.010>>.

HARRISON, O. B. et al. Neisseria genomics: Current status and future perspectives. **Pathogens and Disease**, v. 75, n. 6, p. 1–11, 2017.

HILL, S. A.; MASTERS, T. L.; WACHTER, J. Gonorrhea – an evolving disease of

the new millennium. **Microbial Cell**, v. 3, n. 9, p. 371–389, 2016. Disponível em: <<http://microbialcell.com/researcharticles/gonorrhea-an-evolving-disease-of-the-new-millennium>>.

HOOPER, D. C.; JACOBY, G. A. Mechanisms of drug resistance: Quinolone resistance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1354, n. 1, p. 12–31, 2015.

ITO, M. et al. Emergence and spread of *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates harboring mosaic-like structure of penicillin-binding protein 2 in central Japan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 137–143, 2005.

JELTSCH, A. Maintenance of species identity and controlling speciation of bacteria : a new function for restriction / modification systems ? v. 317, p. 13–16, 2003.

JIAO, X. et al. DAVID-WS: A stateful web service to facilitate gene/protein list analysis. **Bioinformatics**, v. 28, n. 13, p. 1805–1806, 2012.

JUDSON, F. N. *Gonorrhoea*. n. 6, p. 1353–1366, 1990.

JULIET, E. S.; PENNAN, M. B. The use of cephalosporins for gonorrhoea: an update on the rising problem of resistance. **Expert Opin Pharmacotherapy**, v. 6, n. 8, p. 1411–1420, 2013.

KELLEY, L. A. et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 845–858, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015-053>>.

KERY, M. B. et al. TargetRNA2: Identifying targets of small regulatory RNAs in bacteria. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. W1, p. 124–129, 2014.

KLEIN, N. C.; CUNHA, B. A. Third-generation cephalosporins. **Medical Clinics of North America**, v. 79, n. 4, p. 705–719, 1995. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0025-7125\(16\)30034-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0025-7125(16)30034-7)>.

KŁYŹ, A.; PIEKAROWICZ, A. Phage proteins are expressed on the surface of *Neisseria gonorrhoeae* and are potential vaccine candidates. **PLoS ONE**, v. 13, n. 8, p. 1–17, 2018.

LEWIS, D. A. Global resistance of *Neisseria gonorrhoeae*: When theory becomes reality. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 27, n. 1, p. 62–67, 2014.

LIAO, M. et al. Analysis of mutations in multiple loci of *Neisseria gonorrhoeae* isolates reveals effects of PIB, PBP2 and MtrR on reduced susceptibility to ceftriaxone. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 5, p. 1016–1023, 2011.

LOHANI, S. et al. Disseminated gonococcal infection: an unusual presentation. **Citation: Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives**, n. 6, 2016.

MANN, M.; WRIGHT, P. R.; BACKOFEN, R. IntaRNA 2.0: Enhanced and customizable prediction of RNA-RNA interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W435–W439, 2017.

MARRAZZO, J. M.; HANDSFIELD, H. H.; SPARLING, P. F. Neisseria gonorrhoeae. **Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases**, v. 24, n. 4, p. 2753–2770, 2010. Disponível em: <http://www.crossref.org/deleted_DOI.html>.

MARTIN, I. M. C. et al. Rapid Sequence-Based Identification of Gonococcal Transmission Clusters in a Large Metropolitan Area. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 8, p. 1497–1505, 2004. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/383047>>.

MAYOR, M. T.; ROETT, M. A.; UDUHIRI, K. A. Diagnosis and management of gonococcal infections. **American Family Physician**, v. 86, n. 10, p. 931–938, 2012.

MCCLURE, R. et al. Computational analysis of bacterial RNA-Seq data. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 14, p. 1–16, 2013.

MCSHEFFREY, G. G.; GRAY-OWEN, S. D. **Neisseria gonorrhoeae**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2014. v. 3

MELNYK, A. H.; WONG, A.; KASSEN, R. The fitness costs of antibiotic resistance mutations. **Evolutionary Applications**, v. 8, n. 3, p. 273–283, 2015.

MESAK, L. R.; MIAO, V.; DAVIES, J. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on SOS and DNA repair gene expression in Staphylococcus aureus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 9, p. 3394–3397, 2008.

MORGAN, M. K.; DECKER, C. F. Disease-a-Month Gonorrhea. **Disease-a-Month**, v. 62, p. 260–268, 2016.

MUNITA, J. M. et al. HHS Public Access. **Mechanisms of Antibiotic Resistance**, v. 4, n. 2, p. 1–37, 2016.

NAKAYAMA, S. I. et al. New ceftriaxone- and multidrug-resistant neisseria gonorrhoeae strain with a novel mosaic penA gene isolated in Japan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 7, p. 4339–4341, 2016.

NELSON, J. W. et al. The START App: A web-based RNAseq analysis and visualization resource. **Bioinformatics**, v. 33, n. 3, p. 447–449, 2017.

NG, L.-K.; MARTIN, I. E. The laboratory diagnosis of Neisseria gonorrhoeae. **The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie médicale / AMMI Canada**, v. 16, n. 1, p. 15–

25, 2005. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2095009&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

OCHIAI, S. et al. Rapid detection of the mosaic structure of the *Neisseria gonorrhoeae* penA gene, which is associated with decreased susceptibilities to oral cephalosporins. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 1804–1810, 2008.

OGAWA, T. et al. Sequence-specific recognition of colicin E5, a tRNA-targeting ribonuclease. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 21, p. 6065–6073, 2006.

OHNISHI, M. et al. Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhea?: Detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3538–3545, 2011.

PACHECO, L. G. C. Bacterial reference genes for gene expression studies by RT-qPCR: survey and analysis. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 108, n. 3, p. 685–693, 2015.

PAIS, P. et al. Transcriptional Control of Drug Resistance, Virulence and Immune System Evasion in Pathogenic Fungi: A Cross-Species Comparison. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. October, 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2016.00131/full>>.

PELECHANO, V.; STEINMETZ, L. M. Gene regulation by antisense transcription. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 12, p. 880–893, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrg3594>>.

PENG, T. et al. Ceftriaxone susceptibility and molecular characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Changsha, China. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 23, n. 6, p. 385–389, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jiac.2017.03.007>>.

PENNA, G. O.; HAJJAR, L. A.; BRAZ, T. M. Gonorréia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 5, p. 451–464, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822000000500007&lng=pt&tlng=pt>.

PICARDI, E. RNA bioinformatics. **RNA Bioinformatics**, v. 1269, p. 1–415, 2015.

PIEKAROWICZ, A. et al. Characterization of the dsDNA prophage sequences in the genome of *Neisseria gonorrhoeae* and visualization of productive bacteriophage. **BMC Microbiology**, v. 7, p. 1–20, 2007.

PUBLIC HEALTH ENGLAND. UK case of *Neisseria gonorrhoeae* with high-level resistance to azithromycin and resistance to ceftriaxone acquired abroad. v. 12, n. 11, p. 1–4, 2018. Disponível em: <https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/694655/hpr1118_MDRGC.pdf>.

QUILLIN, S. J.; SEIFERT, H. S. *Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 226–240, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.169>>.

RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, n. 1, p. 62–66, 2003.

RAO, D. N.; DRYDEN, D. T. F.; BHEEMANAIAK, S. Type III restriction-modification enzymes: A historical perspective. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 1, p. 45–55, 2014.

REMMELE, C. W. et al. Transcriptional landscape and essential genes of *Neisseria gonorrhoeae*. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 16, p. 10579–10595, 2014.

RICE, P. A. et al. Annual Review of Microbiology *Neisseria gonorrhoeae*: Drug Resistance, Mouse Models, and Vaccine Development. **Annual Review of Microbiology Neisseria**, v. 71, p. 665–686, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093530>>.

ROSENBERG, E.; DELONG, E. F.; THOMPSON, F. **The Prokaryotes**. [s.l: s.n.]

ROTMAN, E.; SEIFERT, H. S. The Genetics of *Neisseria* Species . **Annual Review of Genetics**, v. 48, n. 1, p. 405–431, 2014.

ROUQUETTE-LOUGHLIN, C. E. et al. crossm Mechanistic Basis for Decreased Antimicrobial Susceptibility in a Clinical Isolate of *Neisseria gonorrhoeae* Possessing a Mosaic- Like mtr Efflux Pump Locus. v. 9, n. 6, p. 1–15, 2018.

ROWLEY, J. et al. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 97, n. 8, p. 548- 562P, 2019.

ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature Protocols**, v. 5, n. 4, p. 725–738, 2010.

SARANDOPOULOS, S.; DAVIES, J. K. Genetic Organization and Evolution of the Cryptic Plasmid of *Neisseria gonorrhoeae*. **Plasmid**, v. 29, n. 3, p. 206–221, 1993.

SIMONS, R. W. Biological Regulation By Antisense RNA in Prokaryotes. **Annual Review of Genetics**, 1988.

SON, K. et al. A simple guideline to assess the characteristics of RNA-Seq Data. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

SRIKHANTA, Y. N. et al. Phasevarions Mediate Random Switching of Gene

Expression in Pathogenic Neisseria. v. 5, n. 4, 2009.

SU, C. C. et al. Structure and function of neisseria gonorrhoeae MtrF illuminates a class of antimetabolite efflux pumps. **Cell Reports**, v. 11, n. 1, p. 61–70, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.003>>.

SUAY-GARCÍA, B.; PÉREZ-GRACIA, M. T. Drug-resistant Neisseria gonorrhoeae: latest developments. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, n. 7, p. 1065–1071, 2017.

TAKAHATA, S. et al. Amino acid substitutions in mosaic penicillin-binding protein 2 associated with reduced susceptibility to cefixime in clinical isolates of Neisseria gonorrhoea. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 11, p. 3638–3645, 2006.

TANAKA, M. et al. Analysis of mutations within multiple genes associated with resistance in a clinical isolate of Neisseria gonorrhoeae with reduced ceftriaxone susceptibility that shows a multidrug-resistant phenotype. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 1, p. 20–26, 2006.

TASHJIAN, T. F. et al. Residues in the fingers domain of the translesion DNA polymerase DinB enable its unique participation in error-prone double-strand break repair. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 19, p. 7588–7600, 2019.

UNEMO, M. et al. High-level cefixime- and ceftriaxone-resistant Neisseria gonorrhoeae in France: Novel penA mosaic allele in a successful international clone causes treatment failure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 3, p. 1273–1280, 2012.

UNEMO, M. Current and future antimicrobial treatment of gonorrhoea - the rapidly evolving Neisseria gonorrhoeae continues to challenge. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12879-015-1029-2>>.

UNEMO, M. et al. The novel 2016 WHO Neisseria gonorrhoeae reference strains for global quality assurance of laboratory investigations: Phenotypic, genetic and reference genome characterization. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 11, p. 3096–3108, 2016.

UNEMO, M.; DEL RIO, C.; SHAFER, W. M. HHS Public Access. **Microbiol. Spectr.**, v. 4, n. 3, p. 1–32, 2016.

UNEMO, M.; SHAFER, W. M. Antibiotic resistance in Neisseria gonorrhoeae : origin , evolution , and lessons learned for the future. v. 1230, p. 19–28, 2011.

UNEMO, M.; SHAFER, W. M. Antimicrobial resistance in Neisseria gonorrhoeae in the 21st Century: Past, evolution, and future. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 587–613, 2014.

VEAL, W. L.; SHAFER, W. M. Identification of a cell envelope protein (MtrF) involved in hydrophobic antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 27–37, 2003.

VINCENT, L. R. et al. In Vivo-Selected Compensatory Mutations Restore the Fitness Cost of Mosaic penA Alleles That Confer Ceftriaxone Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. **mBio**, v. 9, n. 2, p. e01905-17, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29615507>>.

WAGNER, P. L.; WALDOR, M. K. MINIREVIEW Bacteriophage Control of Bacterial Virulence. **Society**, v. 70, n. 8, p. 3985–3993, 2002.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq : a revolutionary tool for transcriptomics. v. 10, n. 1, p. 57–63, 2010.

WHO. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System. Manual for Early Implementation. **Who**, p. 1–44, 2015. Disponível em: <http://www.who.int/drugresistance/en/%5Cnwww.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.%5Cnhttp://apps.who.int/iris/bitstream/10665/188783/1/9789241549400_eng.pdf?ua=1>.

WHO. WHO Guidelines for the Treatment of *Neisseria gonorrhoeae*. **World Health Organization**, p. 1–55, 2016.

WI, T. et al. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Global surveillance and a call for international collaborative action Summary points. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002344>>. Acesso em: 6 nov. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Emergence of multi-drug resistant *Neisseria gonorrhoeae* – Threat of global rise in untreatable sexually transmitted infections. v. 2, n. June, p. 1, 2012. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70603/1/WHO_RHR_11.14_eng.pdf>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Health Sector Strategy on Sexually Transmitted Infections 2016 - 2021. In: June, **Anais...** World Health Organization, 2016.

WRIGHT, P. R.; GEORG, J. Workflow for a computational analysis of an sRNA candidate in bacteria. **Methods in Molecular Biology**, v. 1737, p. 3–30, 2018.

YANG, J.; ZHANG, Y. I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W174–W181, 2015.

YIM, G.; HUIMI WANG, H.; DAVIES, J. The truth about antibiotics. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, n. 2–3, p. 163–170, 2006.

ZHAO, L. et al. Trends in antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* and molecular characteristics of *N. gonorrhoeae* with decreased susceptibility to ceftriaxone in

Shandong, China, 2007 to 2014. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 1, p. 52–56, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.06.004>>.

ZHAO, S. et al. Genetics of chromosomally mediated intermediate resistance to ceftriaxone and cefixime in *Neisseria gonorrhoeae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3744–3751, 2009.

ZHAO, S. P. Molecular basis of high-level ciprofloxacin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* strains from Shandong Province, China. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 276, p. 273–276, 2013.

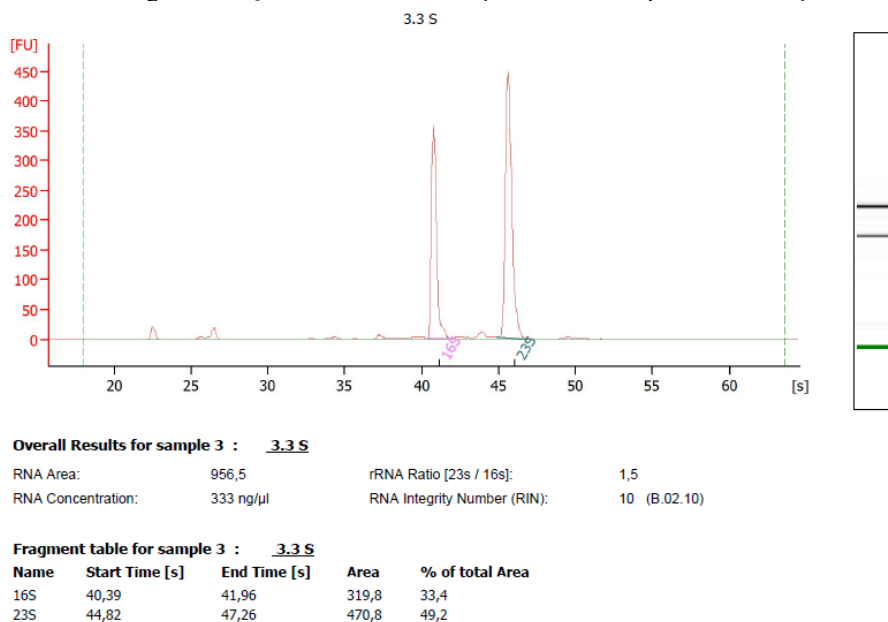
Disponível em:

<<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=prem&AN=24159315>>.

ZHAO, Y. hu et al. Identification and expression analysis of ceftriaxone resistance-related genes in *Neisseria gonorrhoeae* integrating RNA-Seq data and qRT-PCR validation. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 16, n. 2019, p. 202–209, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.10.008>>.

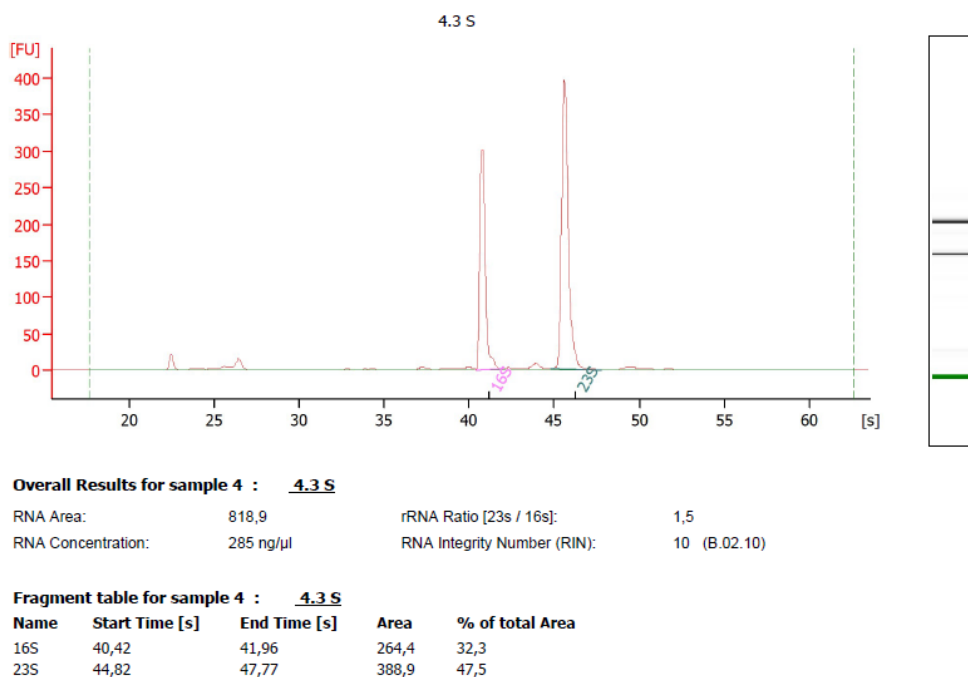
APÊNDICE A – Resultados Bioanalyzer

Figura 13. Qualidade e concentração do RNA: réplica da condição S



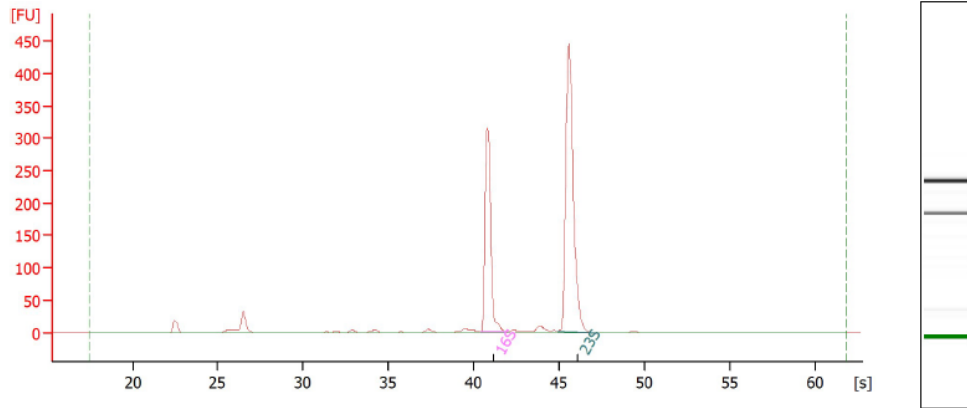
Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

Figura 14. Qualidade e concentração do RNA: réplica da condição S



Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

Figura 15. Qualidade e concentração do RNA: réplica da condição R
1.3 R



Overall Results for sample 5 : 1.3 R

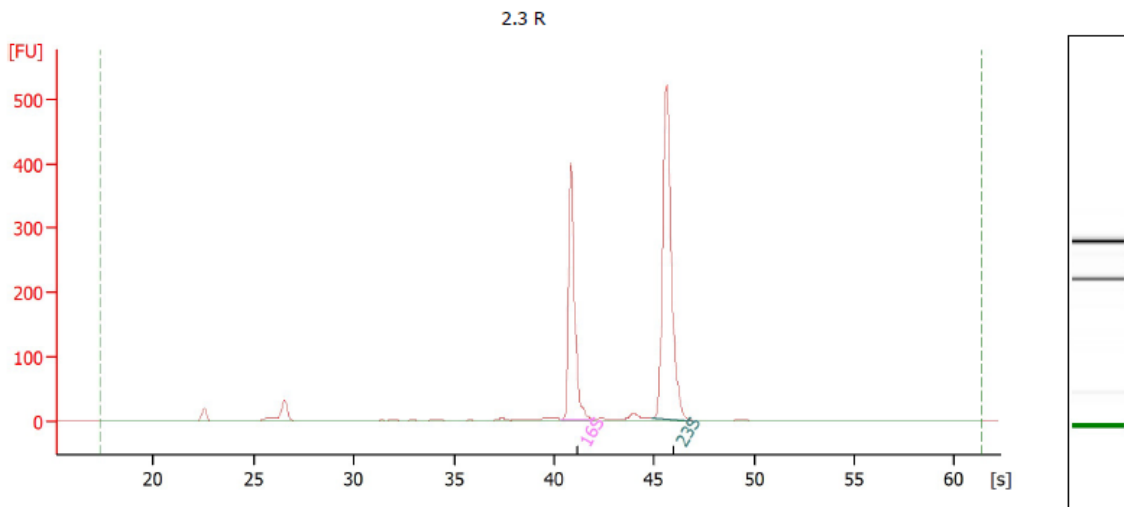
RNA Area: 950,3 RNA Integrity Number (RIN): 10 (B.02.10,
RNA Concentration: 331 ng/µl Anomaly Threshold(s)
rRNA Ratio [23s / 16s]: 1,7 manually adapted)

Fragment table for sample 5 : 1.3 R

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
16S	40,43	42,00	278,0	29,2
23S	44,91	47,29	484,6	51,0

Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

Figura 16. Qualidade e concentração do RNA: réplica da condição R
2.3 R



Overall Results for sample 6 : 2.3 R

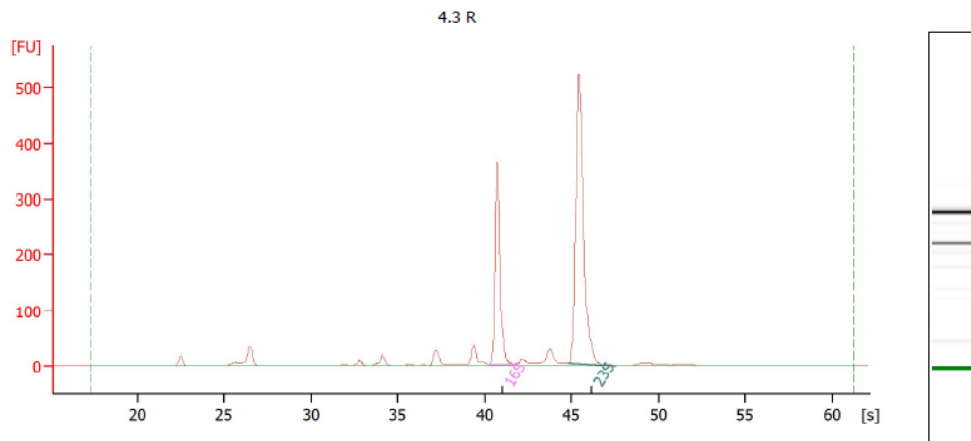
RNA Area: 1.143,6 rRNA Ratio [23s / 16s]: 1,6
RNA Concentration: 398 ng/µl RNA Integrity Number (RIN): 10 (B.02.10)

Fragment table for sample 6 : 2.3 R

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
16S	40,33	42,02	358,5	31,3
23S	44,91	47,09	575,0	50,3

Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

Figura 17. Qualidade e concentração do RNA: réplica da condição R



Overall Results for sample 8 : 4.3 R

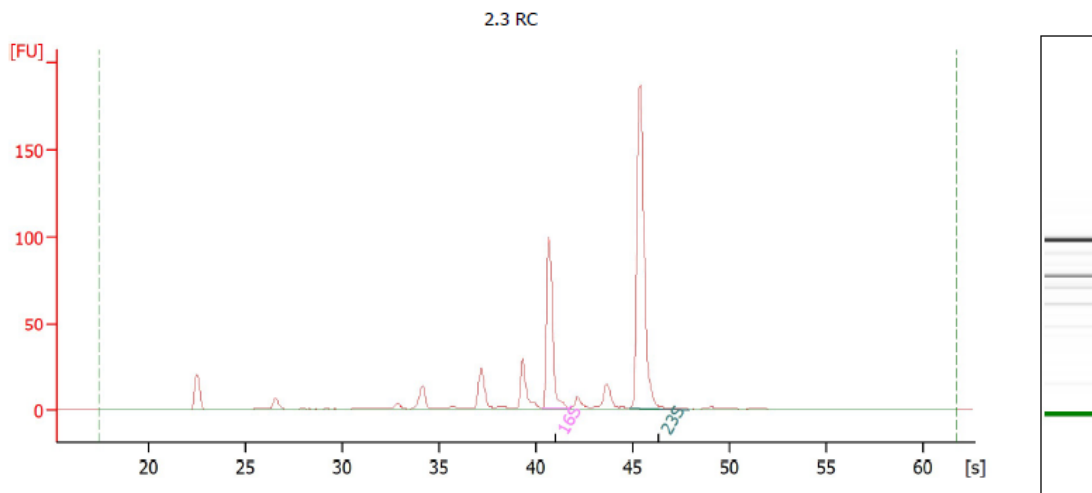
RNA Area: 1.248,0 rRNA Ratio [23s / 16s]: 1,9
 RNA Concentration: 435 ng/µl RNA Integrity Number (RIN): 9.9 (B.02.10)

Fragment table for sample 8 : 4.3 R

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
16S	40,25	41,76	316,7	25,4
23S	44,78	47,53	590,4	47,3

Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

Figura 18. Qualidade e concentração do RNA: réplica da condição RC



Overall Results for sample 10 : 2.3 RC

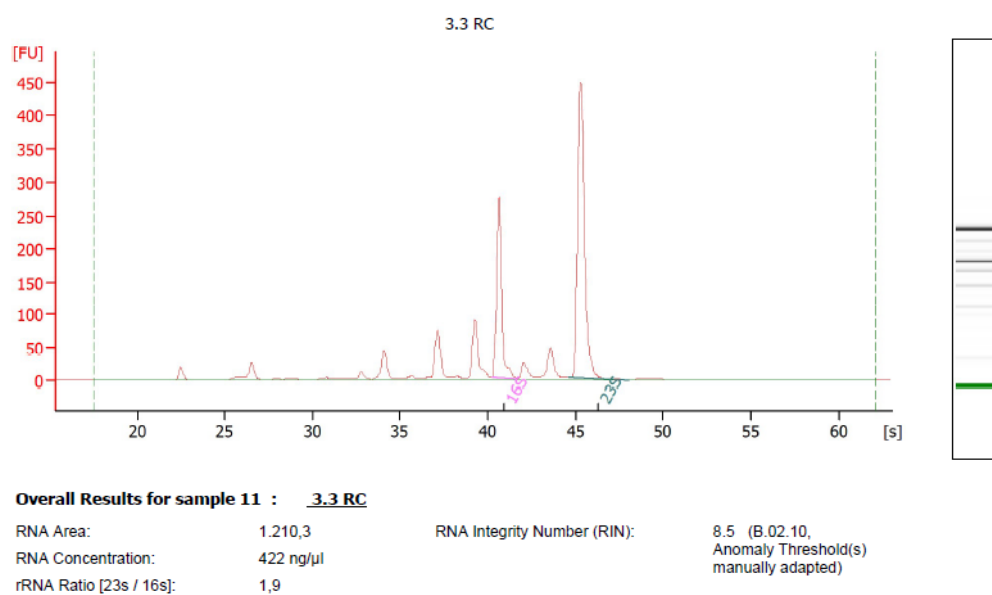
RNA Area: 420,6 RNA Integrity Number (RIN): 8.6 (B.02.10,
 RNA Concentration: 146 ng/µl Anomaly Threshold(s) manually adapted)
 rRNA Ratio [23s / 16s]: 2,2

Fragment table for sample 10 : 2.3 RC

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
16S	40,35	41,73	81,0	19,3
23S	44,82	47,95	176,3	41,9

Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

Figura 19. Qualidade e concentração do RNA: réplica da condição RC

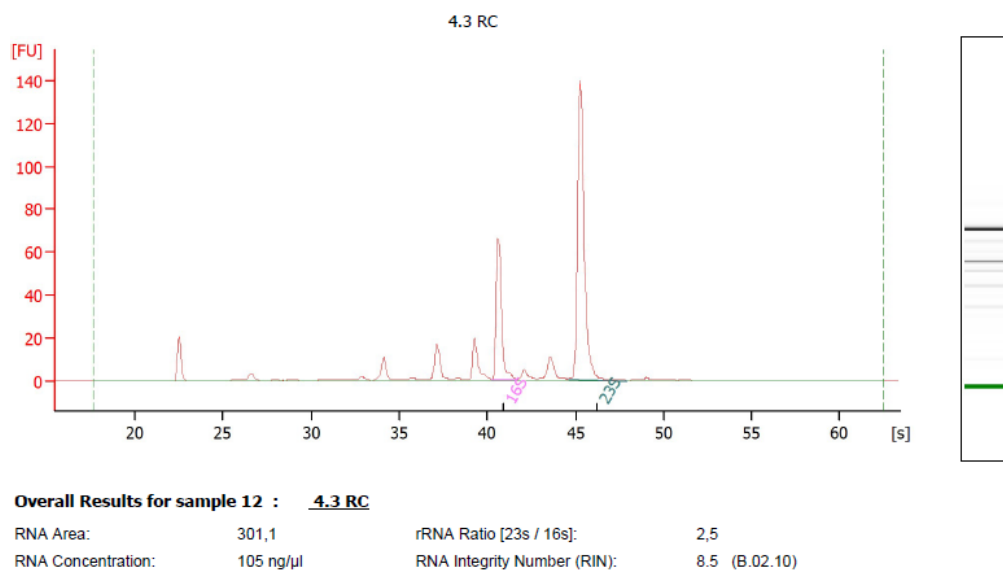


Fragment table for sample 11 : 3.3 RC

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
16S	40,23	41,67	241,7	20,0
23S	44,64	48,02	452,4	37,4

Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

Figura 20. Qualidade e concentração do RNA: réplica da condição RC



Fragment table for sample 12 : 4.3 RC

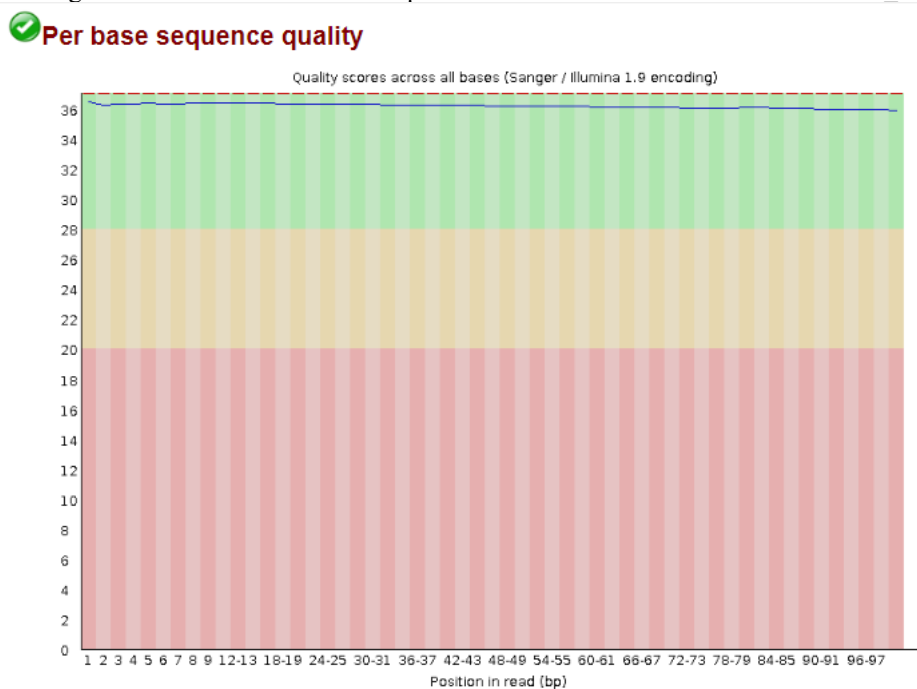
Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
16S	40,25	41,70	53,9	17,9
23S	44,59	47,94	133,8	44,4

Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019.

APÊNDICE B – Resultados FASTQC

Os gráficos a seguir representam os resultados da média de qualidade Phred por base em cada *read* sequenciado, em cada biblioteca e em cada par.

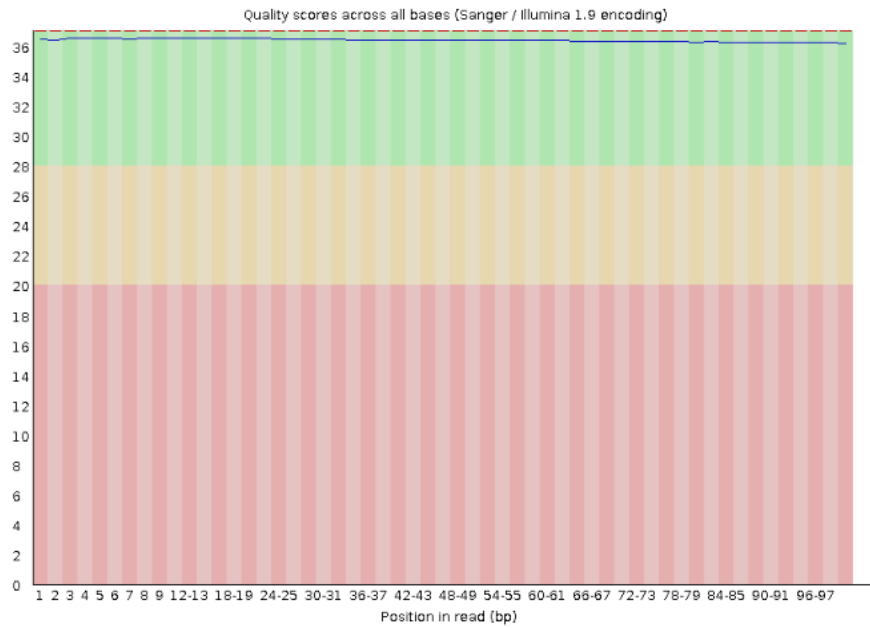
Figura 21. Média do Score Phred por base dos *reads* referentes a biblioteca 2S_2



Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019

Figura 22. Média do Score Phred por base dos *reads* referentes a biblioteca 3S_1

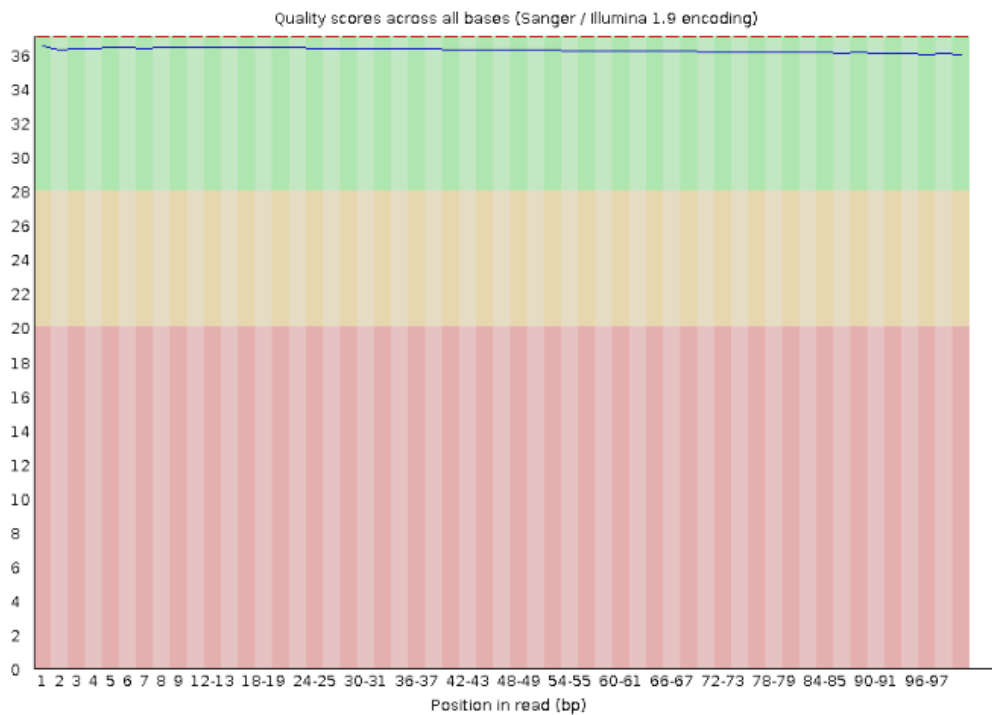
✔ **Per base sequence quality**



Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019

Figura 23. Média do Score Phred por base dos *reads* referentes a biblioteca 3S_2

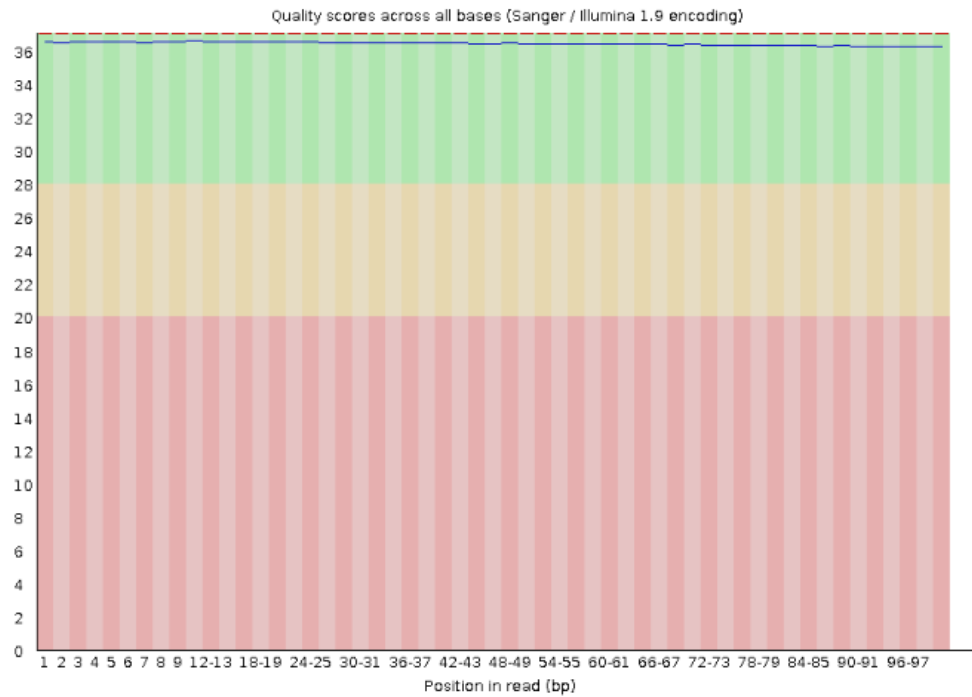
✔ **Per base sequence quality**



Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019

Figura 24. Média do Score Phred por base dos *reads* referentes a biblioteca 4S_1

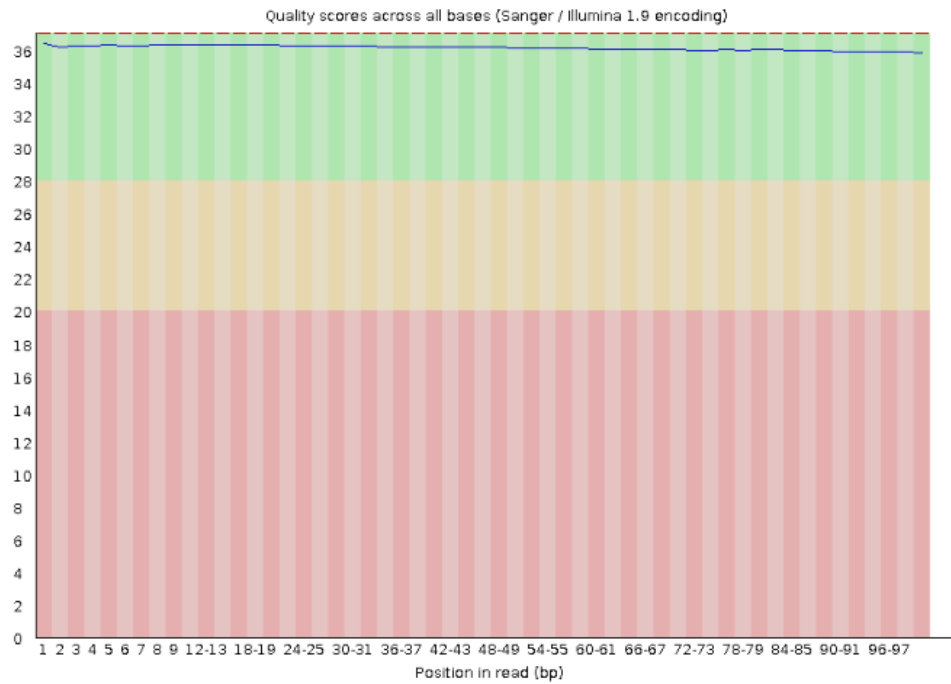
✔ **Per base sequence quality**



Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019

Figura 25. Média do Score Phred por base dos *reads* referentes a biblioteca 4S_2

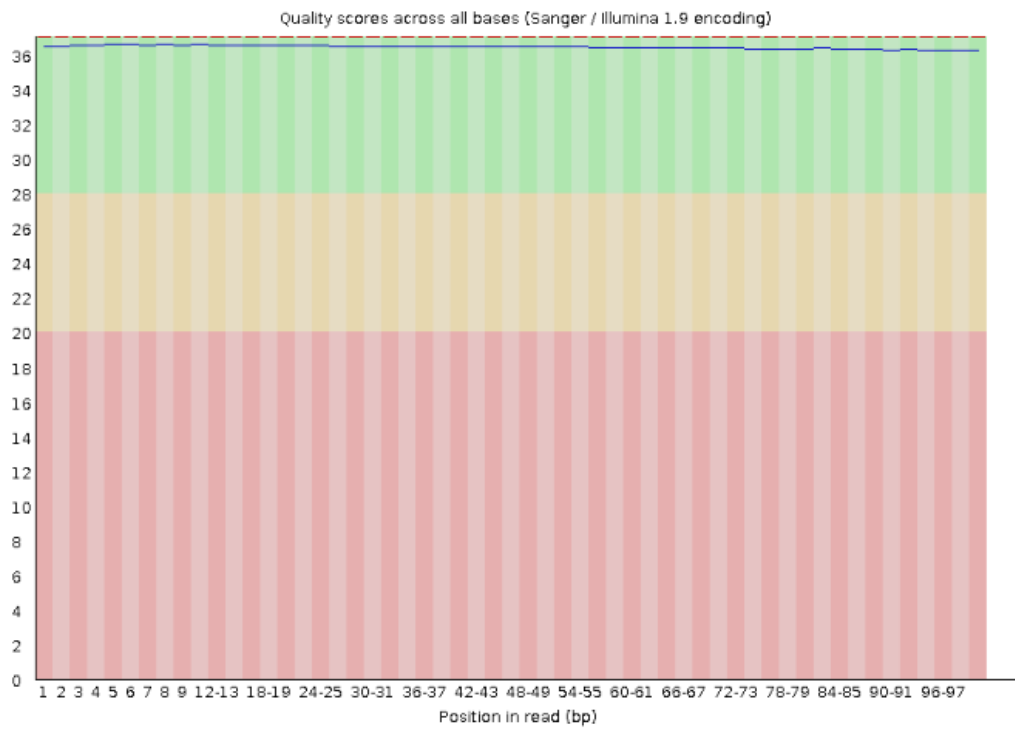
✔ **Per base sequence quality**



Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019

Figura 26. Média do Score Phred por base dos *reads* referentes a biblioteca 4R_1

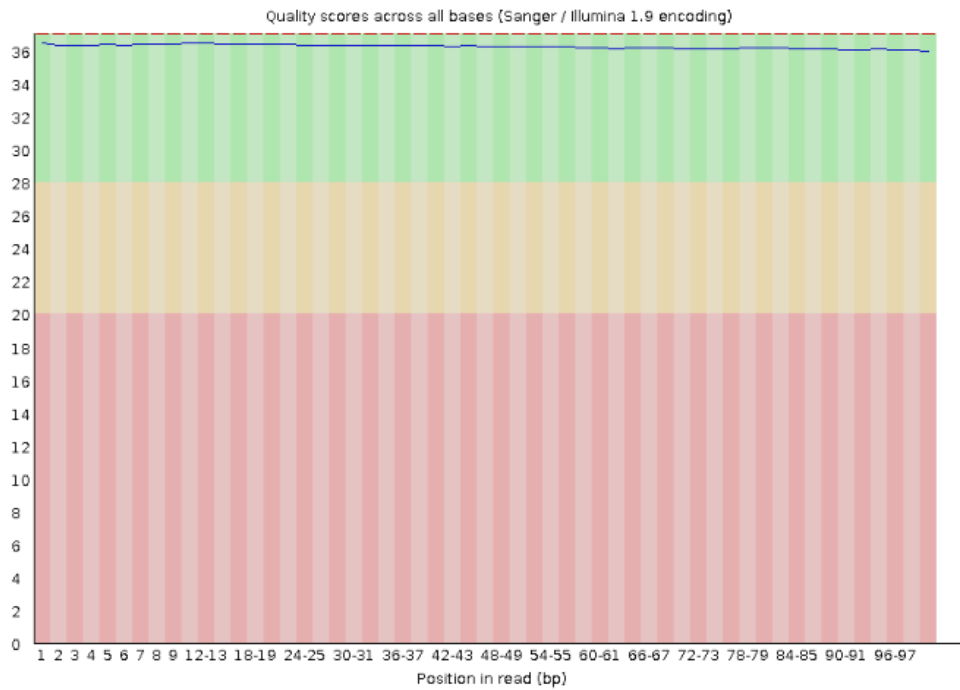
✔ **Per base sequence quality**



Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019

Figura 27. Média do Score Phred por base dos *reads* referentes a biblioteca 4R_2

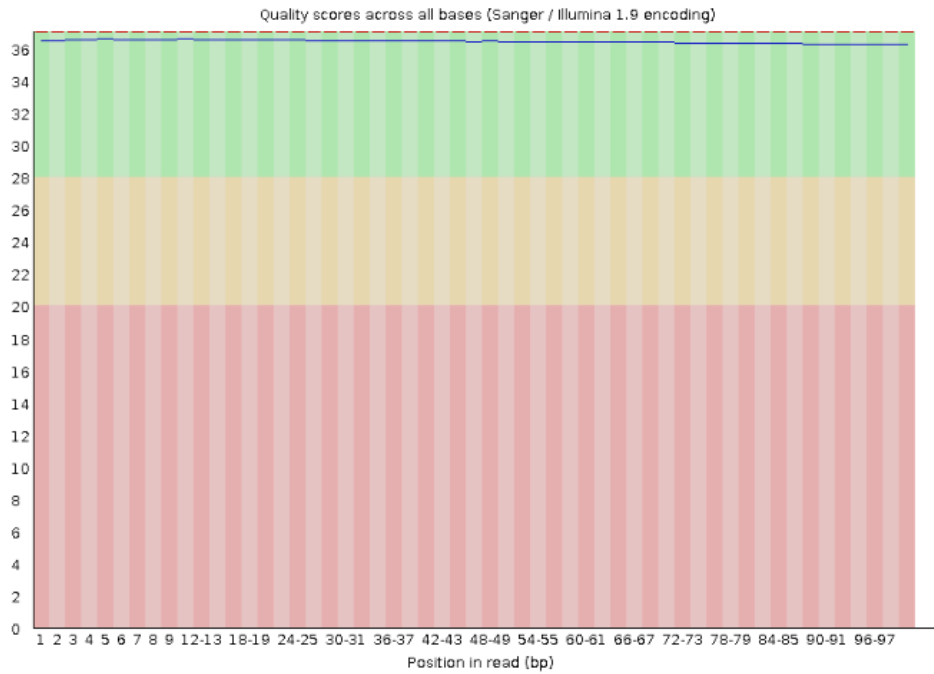
✔ **Per base sequence quality**



Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019

Figura 28. Média do Score Phred por base dos *reads* referentes a biblioteca 5R_1

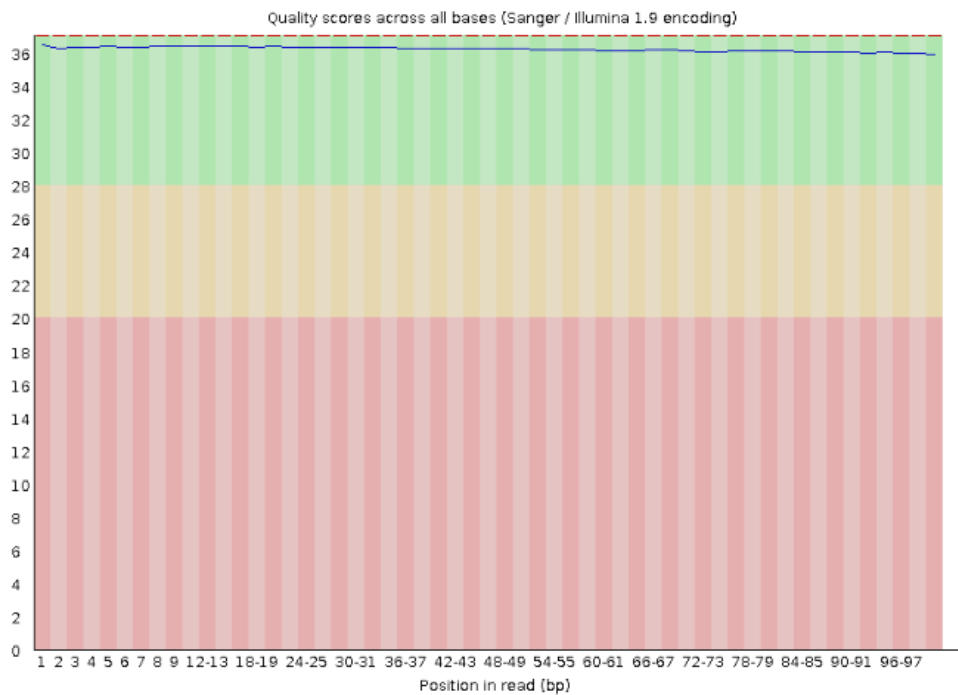
✔ **Per base sequence quality**



Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019

Figura 29. Média do Score Phred por base dos *reads* referentes a biblioteca 5R_2

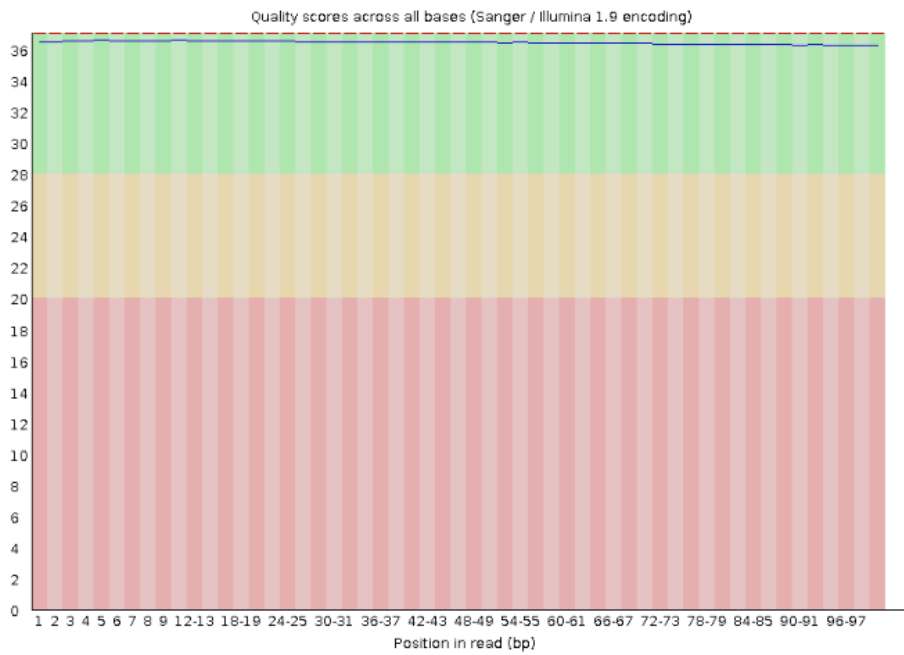
✔ **Per base sequence quality**



Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019

Figura 30. Média do Score Phred por base dos *reads* referentes a biblioteca 6R_1

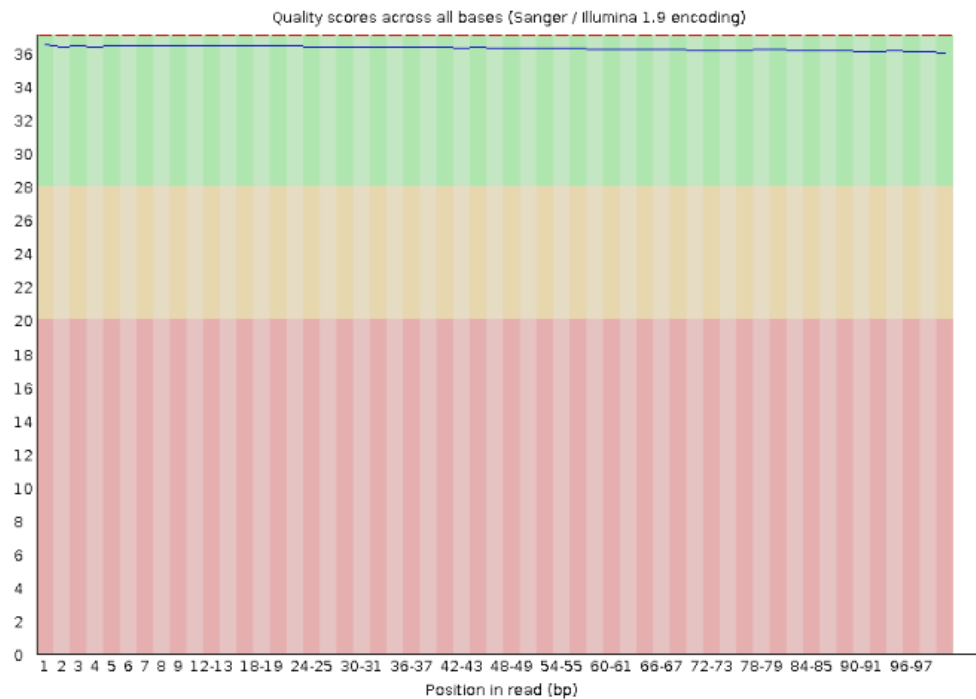
✔ **Per base sequence quality**



Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019

Figura 31. Média do Score Phred por base dos *reads* referentes a biblioteca 6R_2

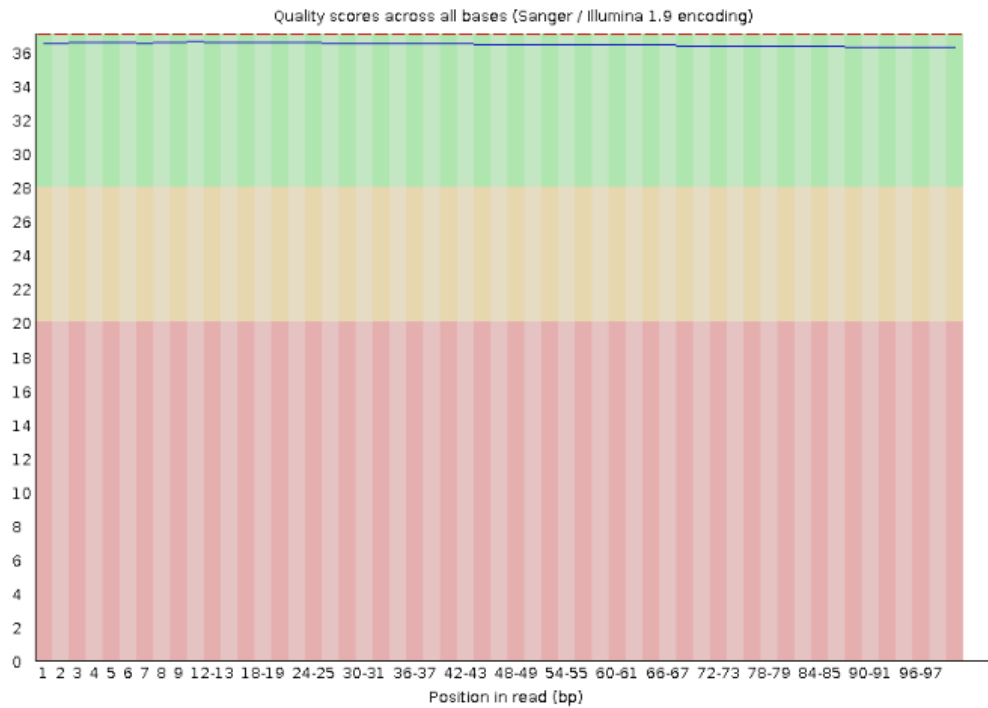
✔ **Per base sequence quality**



Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019

Figura 32. Média do Score Phred por base dos *reads* referentes a biblioteca 2RC_1

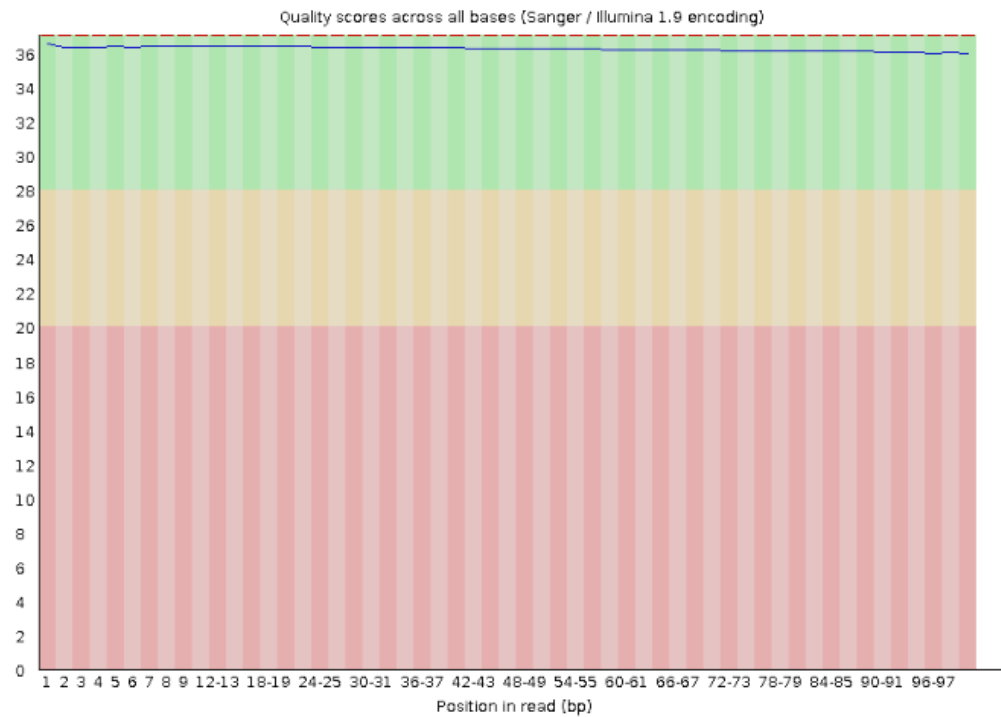
✔ **Per base sequence quality**



Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019

Figura 33. Média do Score Phred por base dos *reads* referentes a biblioteca 2RC_2

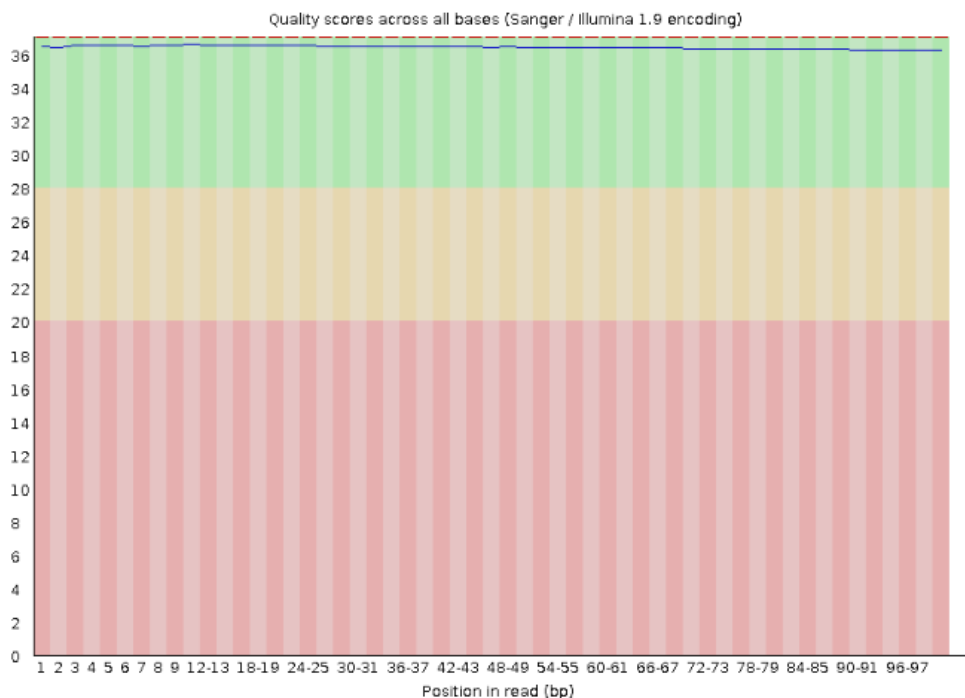
✔ **Per base sequence quality**



Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019

Figura 34. Média do Score Phred por base dos reads referentes a biblioteca 3RC_1

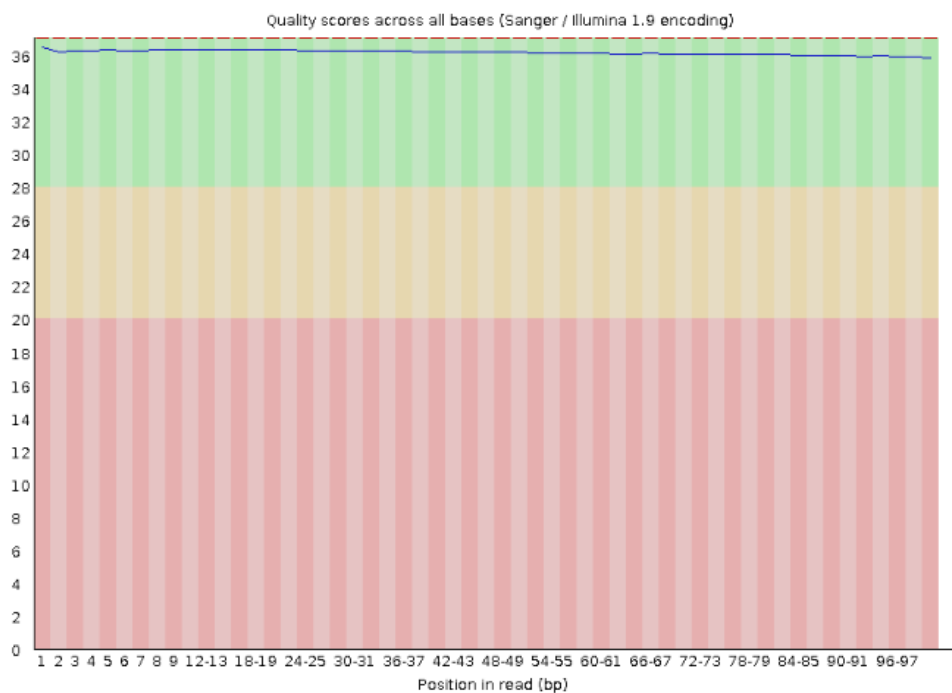
✔ **Per base sequence quality**



Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019

Figura 35. Média do Score Phred por base dos reads referentes a biblioteca 3RC_2

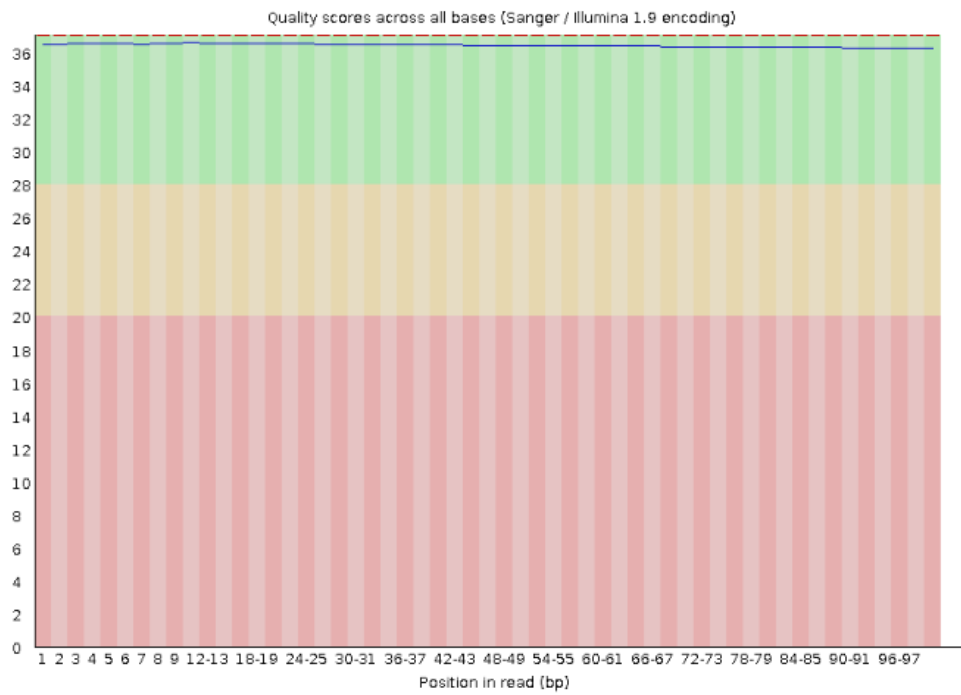
✔ **Per base sequence quality**



Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019

Figura 36. Média do Score Phred por base dos *reads* referentes a biblioteca 4RC_1

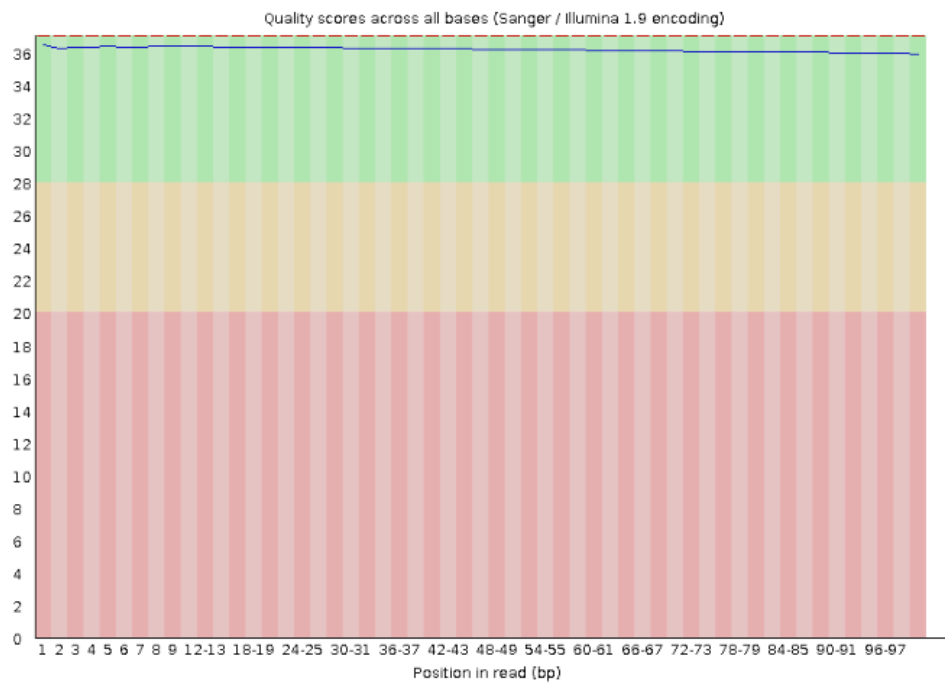
✔ **Per base sequence quality**



Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019

Figura 37. Média do Score Phred por base dos *reads* referentes a biblioteca 4RC_2

✔ **Per base sequence quality**



Fonte: Desenvolvido pela autora, 2019

APÊNDICE C – Resultados Gene Ontology

Tabela 9. Genes diferencialmente expressos com informações da base de dados Gene Ontology na comparação R *versus* S

Código	Proteína	Gene	Processo Biológico	Componente Celular	Função molecular
NGO0936	Fator de alongação P	efp	-	citoplasma	Tradução, atividade de fator de alongação
NGO1946	UPF0276 proteína NGO1946	-	-	-	-
NGO0791	UPF0250 proteína	-	-	-	-
NGO1980	Provável malato:quinon a oxidoredutase	mqo	Ciclo do ácido tricarboxílico	-	Atividade malato dehidrogenase (menaquinona); (quinona)
NGO0274	Cadeia Beta Tryptofano sintase	trpB	-	-	Atividade triptofano sintase
NGO0933	Homoserina O- succiniltransfe rase, HST	metXS	Processo biosíntese da metionina	citoplasma	Atividade homoserina O- succiniltransferase
NGO1466	Biosíntese bifuncional de purina	purH	Processo biosintético IMP 'de novo'	-	Atividade ciclohidrolase IMP; atividade formiltransferase fosforibosilaminoimidazol carboxiamida
NGO0231	Bis(5'- nucleosil)- tetrafosfatase, simétrica	apaH	-	-	Atividade Bis(5'- nucleosil)-tetrafosfatase, simétrica
NGO1778	Leucil/fenilala nil-tRNA-- proteína transferase	aat	Processo catabólico de proteínas	citoplasma	Atividade leuciltransferase
NGO0846	Fosfatidilglice rol- prolipoprotein a diacilgliceril transferase	lgt	Processo biosintético de lipoproteínas	componente integral da membrana plasmática	Atividade Fosfatidilglicerol- prolipoproteína diacilgliceril transferase
NGO1233	Ketol-ácido redutoisomera se (NADP(+)), KARI	ilvC	Processo biosintético de Isoleucine e valina	-	Atividade Ketol-ácido redutoisomerase; ligadora de ion magnésio; ligadora de NADP
NGO1439	Exportadora de macrolídeos Ligadora de ATP/proteína permease	macB	Resposta a antimicrobiano; detoxificação de xenobióticos por exporte transmembrana	Componente integral da membrana plasmática	Atividade ATPase; atividade de efluxo e transporte transmembrane

NGO1806	UDP-N-acetilglucosamina O-aciltransferase	ipxA	Processo biosintético de lipídeo A	citoplasma	Atividade acil-[proteína carregadora de acil]-UDP-N-acetilglucosamina O-aciltransferase
NGO2041	Fosfometilpirimidina sintase	thiC	Processo biosintético de tiamina e tiamina difosfato	-	Ligadora de cluster 4-ferro 4-enxofre; atividade liase carbono-carbono; ligadora de ion zinco
NGO0129	7-ciano-7-deazaguanina sintase	queC	processo biosintético de queosina	-	Ligadora de ATP atividade ligase, foramadora de ligações carbono-nitrogenio; ligadora de ions zinco
NGO0663	Aspartil/glutamil-tRNA amidotransferase subunidade C	gatC	Regulação da fidelidade da tradução	-	Ligadora de ATP; atividade glutaminil-tRNA sintase
NGO1676	50S ribosomal protein L21	rplU	tradução	ribossomo	Ligadora de rRNA; componente estrutural do ribossomo
NGO0662	Glutamil-tRNA amidotransferase subunidade A	gatA	tradução	complexo glutamil-tRNA(Gln) amidotransferase	Atividade amidase; Ligadora de ATP; glutaminyl-tRNA sintase
NGO1331	Corismato sintase, (5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato fosfoliase)	aroC	Processo biosintético	-	Atividade corismato sintase; processo biosintético de aminoácidos aromáticos; biossíntese corismato
NGO0210	fosforibosol-AMP ciclohidrolase, PRA-CH	hisI	Biossíntese histidina	-	Ligadora de ion magnésio, atividade fosforibosil-AMP ciclohidrolase; Ligadora de ion zinco
NGO1972	Adesina MafA 1/4	mafA4	Adesão celular; patogênese	Membrana celular externa	Adesão celular; patogênese
NGO1203	Antranilatofosforibosiltransferase	trpD	processo biosintético triptofano	-	Atividade Antranilatofosforibosiltransferase; ligadora de ion magnésio
NGO1677	50S proteina ribosomal L27	rpmA	tradução	ribossomo	structural constituent of ribosome
NGO0581	30S proteína ribosomal S6	rpsF	tradução	ribossomo	rRNA; componente estrutural do ribossomo
NGO0093	Shikimato cinase	aroK	Processo biosintético	citoplasma	Ligadora de ATP; ligadora de ion magnésio; atividade shikimato cinase

NGO0092	3-dehydroquinat e sintase	aroB	Processo biosintético	citoplasma	Ligadora de íons metais/ligadora de nucleotídeo
----------------	---------------------------	------	-----------------------	------------	---

Legenda: - : informação inexistente. Fonte: Desenvolvido pela autora, 2020.

Tabela 10. Genes diferencialmente expressos com informações da base de dados Gene Ontology na comparação R versus RC

Código	Proteína	Gene	Processo Biológico	Componente Celular	Função molecular
NGO0581	proteína ribossomal 30S S6	rpsF	tradução	ribossomo	ligadora de rRNA, constituinte estrutural do ribossomo
NGO1973	uridilato cinase	pyrH	processo biosintético 'de novo'	citoplasma	ligadora de ATP, cinase UMP
NGO1677	proteína ribossomal 50S L27	rpmA	tradução	ribossomo	constituente estrutural do ribossomo
NGO011	Proteína ribossomal 30S	rpsO	tradução	ribossomo	ligadora de rRNA, constituinte estrutural do ribossomo
NGO0760	Junção Holliday - DNA helicase dependente de ATP	ruvB	recombinação DNA, reparo, resposta SOS	-	ligadora de ATP, ligadora de DNA, atividade de helicase da junção "four-way"
NGO1926	ligase Glutamato-tRNA	gltX	aminoacilação o grutamil-tRNA	citoplasma	ligadora de ATP, atividade de ligase, ligadora de ion zinco
NGO1855	proteína ribossomal 50S L11	rplK	tradução	ribossomo	ligadora da maior subunidade ribossomal, componente estrutural do ribossomo
NGO1232	ornitina carabmoiltransferase	argF	processo biosintético de arginina	citoplasma	ligadora de aminoácido, atividade de ornitina carbamoiltransferase
NGO2095	60kDa chaperonina	groL	redobramento de proteína	citoplasma	Ligadora de ATP, ligadora de proteína não enovelada
NGO0741	recomebinase A	recA	recombinação DNA, reparo, resposta SOS	citoplasma	ligação DNA danificado, ligadora de ATP, ligadora de DNA fita simples
NGO1292	oxidoredutase dissulfeto	dsdB	dobramento de proteínas	componente integral da membrana plasmática	atividade de transferência de eletron, atividade oxidoredutase
NGO0738	DNA polimerase IV	dinB	reparo DNA, replicação dependente de DNA	citoplasma	ligação DNA danificado, atividade de polimerase, ligadora de ion magnésio
NGO1980	Provável malato:quinona oxidoredutase	mqo	ciclo do ácido tricarboxílico	-	atividade de malato desidrogenase

NGO2094	10kDa chaperonina	groS	dobramento de proteínas	citoplasma	Ligadora de ATP
----------------	-------------------	------	----------------------------	------------	-----------------

Legenda: - : informação indisponível. Fonte: Desenvolvido pela autora, 2020.

APÊNDICE D – Listas de genes diferencialmente expressos

Tabela 11. Lista com os 244 genes diferencialmente expressos na comparação do isolado R com o isolado S

ID Gene	Produto do gene	logFC_R_S	logFC_R_S	padj
predicted RNA	-	7,433	-7,433	1,4E-06
predicted RNA	-	2,137	-2,137	1,8E-05
predicted RNA	-	1,694	-1,694	3,9E-04
predicted RNA	-	1,128	-1,128	2,3E-02
predicted RNA	-	-2,779	2,779	5,0E-05
NGO0581	30S ribosomal protein S6	2,182	-2,182	1,3E-05
NGO0092	3-dehydroquinate synthase	3,662	-3,662	1,7E-06
NGO0929	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	0,831	-0,831	9,2E-03
NGO1676	50S ribosomal protein L21	0,868	-0,868	2,4E-03
NGO1677	50S ribosomal protein L27	1,862	-1,862	1,5E-05
NGO0446	ABC transporter	0,994	-0,994	4,4E-03
NGO1732	ABC transporter ATP-binding protein	0,799	-0,799	3,3E-02
NGO1439	ABC transporter ATP-binding protein	-0,793	0,793	5,4E-03
NGO0372	ABC transporter periplasmic binding protein, amino acid	-0,957	0,957	3,1E-03
NGO1494	ABC transporter periplasmic binding protein, polyamine	-1,418	1,418	4,1E-06
NGO1440	ABC transporter periplasmic protein	0,935	-0,935	1,2E-02
NGO0249	acetyl-CoA carboxylase subunit beta	-1,418	1,418	1,2E-04
NGO2125	acetyltransferase	-1,035	1,035	9,6E-04
NGO_t49	Ala tRNA	1,140	-1,140	4,0E-02
NGO_t29	Ala tRNA	1,087	-1,087	3,7E-02
NGO_t38	Ala tRNA	1,087	-1,087	3,7E-02
NGO1442	alcohol dehydrogenase	-7,186	7,186	1,5E-05
NGO1203	anthranilate phosphoribosyltransferase	1,828	-1,828	2,9E-04
NGO1368	antibiotic resistance efflux pump component	1,629	-1,629	1,8E-05
predicted RNA	antisense: dnaK	-0,918	0,918	1,4E-02
predicted RNA	antisense: NGO0011	1,001	-1,001	4,9E-03
predicted RNA	antisense: NGO0155	-0,996	0,996	1,8E-02
predicted RNA	antisense: NGO0240	1,161	-1,161	8,8E-04
predicted RNA	antisense: NGO0373 NGO0372 NGO0374	-2,126	2,126	1,7E-03

predicted RNA	antisense: NGO0382	-1,345	1,345	5,1E-04
predicted RNA	antisense: NGO0382	-2,523	2,523	2,5E-06
predicted RNA	antisense: NGO0441	-0,846	0,846	1,5E-02
predicted RNA	antisense: NGO0449	-0,929	0,929	1,1E-03
predicted RNA	antisense: NGO0574	-1,352	1,352	3,1E-04
predicted RNA	antisense: NGO0732 NGO0731	0,837	-0,837	1,4E-03
predicted RNA	antisense: NGO0925	-0,817	0,817	6,0E-03
predicted RNA	antisense: NGO0950a	-0,906	0,906	2,6E-03
predicted RNA	antisense: NGO0950a	-2,003	2,003	2,3E-05
predicted RNA	antisense: NGO0983	-1,149	1,149	1,0E-02
predicted RNA	antisense: NGO1024	-1,675	1,675	2,0E-03
predicted RNA	antisense: NGO1024	-1,827	1,827	1,8E-03
predicted RNA	antisense: NGO1113	-1,867	1,867	6,0E-05
predicted RNA	antisense: NGO1277a	2,066	-2,066	1,1E-03
predicted RNA	antisense: NGO1277a	1,074	-1,074	9,2E-04
predicted RNA	antisense: NGO1364	0,981	-0,981	7,2E-04
predicted RNA	antisense: NGO1364	0,933	-0,933	2,2E-03
predicted RNA	antisense: NGO1364	0,916	-0,916	1,2E-03
predicted RNA	antisense: NGO1364	0,864	-0,864	2,5E-03
predicted RNA	antisense: NGO1364 NGO1363	0,967	-0,967	2,7E-03
predicted RNA	antisense: NGO1368	-1,984	1,984	1,3E-04
predicted RNA	antisense: NGO1368	-2,421	2,421	5,4E-05
predicted RNA	antisense: NGO1440	1,648	-1,648	8,4E-04
predicted RNA	antisense: NGO1440	1,106	-1,106	5,8E-03
predicted RNA	antisense: NGO1442	-12,371	12,371	3,5E-06

predicted RNA	antisense: NGO1442	-12,617	12,617	2,6E-06
predicted RNA	antisense: NGO1463a	-2,842	2,842	1,1E-06
predicted RNA	antisense: NGO1513	1,128	-1,128	7,3E-04
predicted RNA	antisense: NGO1553a	-2,005	2,005	2,3E-05
predicted RNA	antisense: NGO1581	1,241	-1,241	3,8E-03
predicted RNA	antisense: NGO1591	1,027	-1,027	3,2E-04
predicted RNA	antisense: NGO1625 NGO1626	-12,618	12,618	1,7E-06
predicted RNA	antisense: NGO1627 NGO1628	-13,690	13,690	1,4E-06
predicted RNA	antisense: NGO1861a	2,129	-2,129	2,7E-06
predicted RNA	antisense: NGO1861a	1,784	-1,784	3,4E-04
predicted RNA	antisense: NGO1982 NGO1981	-1,698	1,698	6,0E-05
predicted RNA	antisense: NGO2011	-1,979	1,979	1,4E-04
predicted RNA	antisense: NGO2011 NGO2012	-2,102	2,102	2,3E-04
predicted RNA	antisense: NGO2012	-1,979	1,979	6,4E-04
predicted RNA	antisense: NGO2014	-1,697	1,697	3,3E-03
predicted RNA	antisense: rpsO	-0,762	0,762	2,0E-02
predicted RNA	antisense: tsf rpsB	-0,765	0,765	4,3E-02
NGO0025	AraC family transcriptional regulator	0,924	-0,924	3,2E-03
NGO0662	aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit A	0,933	-0,933	7,5E-03
NGO0663	aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit C	0,848	-0,848	1,2E-02
NGO1196	ATP-dependent DNA helicase-like protein	0,754	-0,754	5,7E-04
NGO1466	bifunctional phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	-1,399	1,399	6,0E-05
NGO1331	chorismate synthase	1,038	-1,038	3,5E-02
NGO0340	cysteine synthase/cystathionine beta-synthase	-1,183	1,183	4,9E-04
NGO2043	dehydrogenase-like protein	-1,219	1,219	2,3E-02
NGO0231	diadenosine tetraphosphatase	-1,068	1,068	3,2E-03
NGO1209	DNA cytosine methyltransferase M.NgoMIII	7,396	-7,396	1,3E-06

NGO0936	elongation factor P	-2,680	2,680	1,8E-06
NGO1207	excinuclease ABC subunit A	-0,984	0,984	3,2E-04
NGO1369	exodeoxyribonuclease V	-2,453	2,453	6,0E-05
NGO1765	glycosyltransferase	1,451	-1,451	2,3E-04
NGO0933	homoserine O-acetyltransferase	-1,493	1,493	9,3E-05
NGO1069	hypothetical protein	5,850	-5,850	1,4E-02
NGO1197	hypothetical protein	5,582	-5,582	1,2E-07
NGO1073	hypothetical protein	5,389	-5,389	3,2E-03
NGO1070	hypothetical protein	5,121	-5,121	8,9E-05
NGO2042	hypothetical protein	4,587	-4,587	6,0E-05
NGO1444	hypothetical protein	3,671	-3,671	2,5E-07
NGO0226	hypothetical protein	2,451	-2,451	3,1E-04
NGO1497	hypothetical protein	2,058	-2,058	2,2E-03
NGO1805	hypothetical protein	2,005	-2,005	1,8E-05
NGO1591	hypothetical protein	1,897	-1,897	1,5E-02
NGO1983	hypothetical protein	1,827	-1,827	7,9E-03
NGO0661	hypothetical protein	1,792	-1,792	2,3E-05
NGO0187	hypothetical protein	1,735	-1,735	6,7E-05
NGO1447	hypothetical protein	1,701	-1,701	1,4E-02
NGO1879	hypothetical protein	1,664	-1,664	1,5E-05
NGO2004	hypothetical protein	1,659	-1,659	1,0E-04
NGO1678	hypothetical protein	1,569	-1,569	6,1E-06
NGO1589	hypothetical protein	1,523	-1,523	3,1E-03
NGO1034	hypothetical protein	1,297	-1,297	1,1E-05
NGO0948	hypothetical protein	1,294	-1,294	1,7E-04
NGO2058	hypothetical protein	1,255	-1,255	2,2E-02
NGO1878	hypothetical protein	1,189	-1,189	9,0E-04
NGO0081	hypothetical protein	1,107	-1,107	2,0E-04
NGO2026	hypothetical protein	1,042	-1,042	4,5E-03
NGO1719	hypothetical protein	1,003	-1,003	5,2E-04
NGO2068	hypothetical protein	0,977	-0,977	1,4E-03
NGO0378	hypothetical protein	0,976	-0,976	1,8E-03
NGO0664	hypothetical protein	0,948	-0,948	1,4E-02
NGO1976	hypothetical protein	0,917	-0,917	3,3E-02
NGO1586	hypothetical protein	0,908	-0,908	1,1E-02
NGO1277	hypothetical protein	0,844	-0,844	2,3E-02
NGO1504	hypothetical protein	0,815	-0,815	3,8E-03
NGO2006	hypothetical protein	0,802	-0,802	3,4E-02
NGO0146	hypothetical protein	0,800	-0,800	6,2E-03
a				
NGO0784	hypothetical protein	0,790	-0,790	3,3E-03
NGO1385	hypothetical protein	0,765	-0,765	7,3E-04

NGO1273	hypothetical protein	0,751	-0,751	2,3E-02
NGO1481	hypothetical protein	-0,800	0,800	1,9E-03
NGO2121	hypothetical protein	-0,842	0,842	4,4E-03
NGO0285	hypothetical protein	-0,852	0,852	8,5E-03
NGO1880	hypothetical protein	-0,876	0,876	4,9E-03
NGO0649	hypothetical protein	-0,883	0,883	3,4E-03
NGO1810	hypothetical protein	-0,899	0,899	1,0E-02
NGO1949	hypothetical protein	-0,923	0,923	1,8E-03
NGO1237	hypothetical protein	-0,998	0,998	4,5E-03
NGO0412	hypothetical protein	-1,012	1,012	1,5E-03
NGO1655	hypothetical protein	-1,107	1,107	1,7E-03
NGO0122	hypothetical protein	-1,109	1,109	8,9E-04
NGO1662	hypothetical protein	-1,125	1,125	1,7E-03
NGO0457	hypothetical protein	-1,135	1,135	3,1E-04
NGO1945	hypothetical protein	-1,184	1,184	1,7E-02
NGO0448	hypothetical protein	-1,251	1,251	7,7E-05
NGO1463	hypothetical protein	-1,255	1,255	1,1E-03
NGO0454	hypothetical protein	-1,297	1,297	5,8E-05
NGO0847	hypothetical protein	-1,311	1,311	1,4E-03
NGO0939	hypothetical protein	-1,349	1,349	4,3E-03
NGO1025	hypothetical protein	-1,350	1,350	9,0E-03
NGO1756	hypothetical protein	-1,374	1,374	5,3E-04
NGO1704	hypothetical protein	-1,419	1,419	9,0E-04
NGO0938	hypothetical protein	-1,434	1,434	7,2E-04
NGO1467	hypothetical protein	-1,461	1,461	1,8E-05
NGO0607	hypothetical protein	-1,668	1,668	9,4E-06
NGO0791	hypothetical protein	-1,753	1,753	8,9E-04
NGO0430	hypothetical protein	-1,765	1,765	2,6E-03
NGO0937	hypothetical protein	-1,939	1,939	1,9E-06
NGO1653	hypothetical protein	-2,039	2,039	1,4E-03
NGO1946	hypothetical protein	-2,132	2,132	2,0E-06
NGO2119	hypothetical protein	-2,145	2,145	2,0E-03
NGO1861	hypothetical protein	-2,323	2,323	2,3E-04
NGO1077	hypothetical protein	-2,368	2,368	1,2E-05
NGO2118	hypothetical protein	-2,390	2,390	6,2E-04
NGO0879	hypothetical protein	-2,451	2,451	3,7E-03
NGO0087	hypothetical protein	-4,183	4,183	2,6E-06
NGO0086	hypothetical protein	-4,279	4,279	1,0E-06
NGO1595	hypothetical protein	-4,497	4,497	1,4E-02
NGO1594	hypothetical protein	-4,584	4,584	6,2E-03
NGO0049	hypothetical protein	-4,934	4,934	3,8E-03
NGO1967	hypothetical protein	-5,362	5,362	1,2E-03

NGO1739	hypothetical protein	-6,168	6,168	2,0E-04
NGO1641	invertase related gene 6 (Irg6), phage associated protein	0,782	-0,782	1,1E-03
NGO0528	IS1016 transposase	2,141	-2,141	1,9E-06
NGO1157	IS1016 transposase	1,563	-1,563	8,4E-06
NGO1394	IS1016 transposase	1,531	-1,531	1,1E-05
NGO1317	IS1016 transposase	1,091	-1,091	1,1E-04
NGO1256	IS1016 transposase	1,015	-1,015	3,3E-04
NGO1412	IS1016 transposase	0,982	-0,982	2,0E-04
NGO1302	IS1016 transposase	0,833	-0,833	8,9E-04
NGO0559	IS1016 transposase	0,760	-0,760	1,4E-03
NGO0713	keto-hydroxyglutarate-aldolase/keto-deoxy-phosphogluconate aldolase	-0,927	0,927	4,1E-04
NGO1233	ketol-acid reductoisomerase	-0,795	0,795	7,5E-03
NGO2156	lacto-N-neotetraose biosynthesis glycosyl transferase	0,870	-0,870	8,4E-03
NGO1778	leucyl/phenylalanyl-tRNA--protein transferase	-0,892	0,892	8,3E-03
NGO1067	MafA adhesin protein	1,310	-1,310	1,3E-05
NGO1972	MafA4	1,350	-1,350	9,7E-06
NGO1068	MafB-like protein	1,404	-1,404	6,0E-06
NGO1980	malate:quinone oxidoreductase	-1,595	1,595	8,4E-06
NGO0602	MerR family transcriptional regulator	-1,003	1,003	8,3E-03
NGO0608	murein transglycosylase/nitrite reductase transcriptional regulator	-1,862	1,862	3,5E-06
NGO1740	NADH dehydrogenase subunit L	-2,312	2,312	1,8E-06
NGO1208	NgoMIIM	7,475	-7,475	2,6E-06
NGO1565	nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase	2,527	-2,527	3,3E-02
NGO1040	opacity protein	2,148	-2,148	8,1E-05
a				
NGO2060	opacity protein	1,767	-1,767	5,1E-04
a				
NGO1861	opacity protein	1,379	-1,379	7,8E-03
a				
NGO1463	opacity protein	-0,947	0,947	3,0E-03
a				
NGO0950	opacity protein	-2,289	2,289	7,6E-04
a				
NGO1513	OpaD protein	1,444	-1,444	1,8E-03
NGO0070	outer membrane opacity protein B	1,295	-1,295	1,5E-03
NGO1319	paraquat-inducible protein A	0,797	-0,797	4,3E-02
NGO1542	Pbp2	-2,141	2,141	1,4E-05
NGO0544	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	1,331	-1,331	9,5E-06
NGO1119	phage associated protein	9,227	-9,227	1,7E-07
NGO1118	phage associated protein	8,331	-8,331	1,0E-06

NGO1117	phage associated protein	7,409	-7,409	5,3E-07
NGO0489	phage associated protein	2,334	-2,334	4,9E-02
NGO0515	phage associated protein	2,098	-2,098	4,3E-03
NGO0519	phage associated protein	1,804	-1,804	1,8E-02
NGO1650	phage associated protein	1,804	-1,804	1,8E-02
NGO1127	phage associated protein	1,534	-1,534	1,7E-02
NGO1619	phage associated protein	1,476	-1,476	5,5E-03
NGO1632	phage associated protein	1,201	-1,201	5,1E-03
NGO0484	phage associated protein	0,821	-0,821	1,1E-03
NGO1618	phage associated protein	0,765	-0,765	1,3E-02
NGO1649	phage associated protein	-0,915	0,915	1,5E-02
NGO1640	phage associated protein	-1,437	1,437	1,8E-03
NGO1007	phage associated protein	-1,628	1,628	6,0E-05
NGO1009	phage associated protein	-1,685	1,685	6,2E-04
NGO0480	phage associated protein	-1,758	1,758	5,8E-05
NGO1114	phage associated protein	-2,106	2,106	1,8E-05
NGO1115	phage associated protein	-5,655	5,655	5,1E-04
NGO1628	phage associated protein	-6,403	6,403	6,3E-05
NGO1626	phage associated protein	-7,082	7,082	2,6E-05
NGO1625	phage associated protein	-7,845	7,845	6,0E-06
NGO1627	phage associated protein	-7,870	7,870	7,9E-06
NGO1629	phage associated protein	-8,130	8,130	3,7E-06
NGO1116	phage repressor protein, phage associated protein	2,733	-2,733	1,7E-06
NGO1630	phage repressor protein, phage associated protein	-7,026	7,026	2,0E-05
NGO0203	phosphatase	-0,772	0,772	1,8E-03
NGO0210	phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase	1,140	-1,140	4,3E-02
NGO0582	PriB	0,800	-0,800	2,3E-02
NGO0949	proline iminopeptidase	1,427	-1,427	1,1E-05
NGO0846	prolipoprotein diacylglycerol transferase	-0,891	0,891	1,4E-03
NGO0113	ribonuclease G / cytoplasmic axial filament protein	0,777	-0,777	1,3E-03
NGO0093	shikimate kinase	3,171	-3,171	2,6E-06
NGO2060	signal recognition particle protein	3,547	-3,547	2,2E-06
NGO0460	succinyl-diaminopimelate transaminase	-1,107	1,107	7,4E-05
NGO2041	thiamine biosynthesis protein ThiC	0,774	-0,774	1,4E-02
NGO2124	thioredoxin	-1,337	1,337	4,9E-03
NGO0413	thiosulfate sulfur transferase	-0,865	0,865	1,1E-03
NGO1205	TonB-dependent receptor protein	-1,183	1,183	6,9E-05
NGO0952	TonB-dependent receptor protein	-2,033	2,033	1,1E-05
NGO0230	transport protein, potassium	-1,526	1,526	1,0E-03
NGO0274	tryptophan synthase subunit beta	-1,494	1,494	1,5E-05

NGO0546	type III restriction-modification system endonuclease	7,373	-7,373	1,1E-06
NGO0545	type III restriction-modification system methyltransferase	8,472	-8,472	1,7E-07
NGO0456	type IV pilin-like protein	-0,814	0,814	1,9E-02
NGO1806	UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase	0,772	-0,772	2,7E-02
NGO0129	YbaX	0,811	-0,811	1,3E-02

Fonte: Desenvolvido pela autora, 2020.

Tabela 12. Lista dos 116 genes diferencialmente expressos na comparação do experimento R e RC

gene.id	gene.name	logFC_R/R C	logFC_RC/ R	padj_R/R C
predicted RNA	antisense: NGO1024	2,286	-2,286	0,004
predicted RNA	antisense: NGO0863	1,646	-1,646	0,012
predicted RNA	antisense: NGO1024	1,539	-1,539	0,015
NGO0581	30S ribosomal protein S6	1,538	-1,538	0,002
NGO2097	hypothetical protein	1,451	-1,451	0,026
NGO1215	hypothetical protein	1,418	-1,418	0,037
predicted RNA	antisense: NGO1581	1,361	-1,361	0,022
NGO0083	pilin glycosylation protein	1,330	-1,330	0,040
NGO1763	3-oxoacyl-ACP synthase	1,272	-1,272	0,025
predicted RNA	antisense: NGO1581	1,260	-1,260	0,015
NGO_t49	Ala tRNA	1,254	-1,254	0,047
NGO_t29	Ala tRNA	1,239	-1,239	0,040
NGO_t38	Ala tRNA	1,239	-1,239	0,040
predicted RNA	antisense: NGO1374	1,234	-1,234	0,029
NGO0759	hypothetical protein	1,163	-1,163	0,010
predicted RNA	-	1,154	-1,154	0,040
NGO1944	RNA polymerase sigma factor	1,152	-1,152	0,013
NGO0230	transport protein, potassium	1,116	-1,116	0,026
NGO1327	hypothetical protein	1,105	-1,105	0,015
NGO1732	ABC transporter ATP-binding protein	1,032	-1,032	0,026
NGO_r06	16S ribosomal RNA	1,029	-1,029	0,027
NGO_r09	16S ribosomal RNA	1,029	-1,029	0,027
NGO_r12	16S ribosomal RNA	1,029	-1,029	0,027
NGO_r03	16S ribosomal RNA	1,022	-1,022	0,027

predicted RNA	antisense: NGO_r03	0,974	-0,974	0,019
predicted RNA	antisense: NGO_r06	0,974	-0,974	0,019
predicted RNA	antisense: NGO_r09	0,974	-0,974	0,019
predicted RNA	antisense: NGO_r12	0,974	-0,974	0,019
NGO1973	uridylate kinase	0,956	-0,956	0,025
predicted RNA	antisense: NGO1449	0,943	-0,943	0,024
predicted RNA	antisense: NGO1374	0,939	-0,939	0,026
predicted RNA	antisense: NGO0142	0,939	-0,939	0,024
predicted RNA	-	0,939	-0,939	0,019
predicted RNA	antisense: NGO_r06	0,931	-0,931	0,027
predicted RNA	antisense: NGO_r09	0,931	-0,931	0,027
predicted RNA	antisense: NGO_r12	0,931	-0,931	0,027
predicted RNA	antisense: NGO_r03	0,931	-0,931	0,027
predicted RNA	antisense: NGO0142	0,930	-0,930	0,026
predicted RNA	antisense: NGO1373	0,924	-0,924	0,026
predicted RNA	antisense: NGO1373 NGO1371 NGO1372	0,917	-0,917	0,026
predicted RNA	antisense: NGO1371	0,903	-0,903	0,039
NGO1701	hypothetical protein	0,902	-0,902	0,014
NGO1336	D-lactate dehydrogenase	0,901	-0,901	0,004
predicted RNA	antisense: NGO1371	0,898	-0,898	0,034
predicted RNA	antisense: NGO1374	0,891	-0,891	0,048
predicted RNA	-	0,876	-0,876	0,037
NGO1678	hypothetical protein	0,866	-0,866	0,004
NGO0544	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	0,864	-0,864	0,003
NGO1193	hypothetical protein	0,863	-0,863	0,031
NGO1677	50S ribosomal protein L27	0,853	-0,853	0,014
NGO2101	hypothetical protein	0,852	-0,852	0,046
NGO0191	30S ribosomal protein S15	0,841	-0,841	0,031

NGO0760	Holliday junction DNA helicase RuvB	0,829	-0,829	0,041
NGO2144	ATP synthase F0F1 subunit A	0,793	-0,793	0,026
NGO1926	glutamyl-tRNA synthetase	0,779	-0,779	0,048
predicted RNA	antisense: NGO0229	0,766	-0,766	0,037
NGO1805	hypothetical protein	0,765	-0,765	0,026
predicted RNA	antisense: NGO0921 NGO0922	0,763	-0,763	0,026
predicted RNA	antisense: NGO0922 NGO0923	0,762	-0,762	0,038
NGO1855	50S ribosomal protein L11	0,761	-0,761	0,014
NGO1682	efflux pump protein, fatty acid resistance	0,760	-0,760	0,006
NGO1647	phage associated protein	0,757	-0,757	0,020
NGO1232	ornithine carbamoyltransferase	-0,756	0,756	0,022
predicted RNA	antisense: nrdB	-0,759	0,759	0,026
NGO2125	acetyltransferase	-0,760	0,760	0,023
predicted RNA	antisense: NGO1422	-0,760	0,760	0,037
NGO2111	hypothetical protein	-0,764	0,764	0,026
NGO1997	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	-0,768	0,768	0,046
NGO0445	ABC transporter ATP-binding protein	-0,771	0,771	0,038
NGO1079	oxidoreductase	-0,780	0,780	0,005
predicted RNA	antisense: NGO0652	-0,782	0,782	0,033
NGO1723	hypothetical protein	-0,806	0,806	0,013
predicted RNA	antisense: rpsA ihfB	-0,809	0,809	0,036
NGO2095	molecular chaperone GroEL	-0,810	0,810	0,019
NGO0336	hypothetical protein	-0,816	0,816	0,031
predicted RNA	antisense: NGO0441	-0,821	0,821	0,037
NGO1649	phage associated protein	-0,822	0,822	0,047
NGO0588	hypothetical protein	-0,831	0,831	0,040
NGO1793	hypothetical protein	-0,831	0,831	0,009
NGO0863	hypothetical protein	-0,840	0,840	0,014
NGO0653	hypothetical protein	-0,847	0,847	0,025
NGO0741	recombinase A	-0,862	0,862	0,038
NGO1292	disulfide bond formation protein	-0,864	0,864	0,029
NGO1279	hypothetical protein	-0,865	0,865	0,036
predicted RNA	antisense: NGO0925	-0,871	0,871	0,019

predicted RNA	antisense: NGO1438	-0,881	0,881	0,014
NGO0208	hypothetical protein	-0,897	0,897	0,022
NGO0433	hypothetical protein	-0,900	0,900	0,010
predicted RNA	antisense: thrS infC	-0,904	0,904	0,038
predicted RNA	antisense: NGO1438	-0,923	0,923	0,019
NGO0738	DNA polymerase IV	-0,950	0,950	0,042
NGO0762	hypothetical protein	-0,952	0,952	0,040
NGO1420	hypothetical protein	-0,969	0,969	0,010
predicted RNA	antisense: NGO0994	-0,984	0,984	0,026
NGO0229	hypothetical protein	-1,005	1,005	0,010
NGO0081	hypothetical protein	-1,013	1,013	0,003
predicted RNA	antisense: dnaK	-1,042	1,042	0,023
NGO0285	hypothetical protein	-1,066	1,066	0,012
NGO2032	hypothetical protein	-1,077	1,077	0,015
predicted RNA	-	-1,130	1,130	0,029
NGO1980	malate:quinone oxidoreductase	-1,191	1,191	0,001
NGO1421	hypothetical protein	-1,205	1,205	0,002
NGO1988	hypothetical protein	-1,242	1,242	0,012
NGO0608	murein transglycosylase/nitrite reductase transcriptional regulator	-1,246	1,246	0,001
NGO0758	ribulose-phosphate 3-epimerase	-1,297	1,297	0,004
predicted RNA	antisense: groES groEL	-1,333	1,333	0,027
NGO1290	amino-acid transporter sodium/alanine symporter	-1,340	1,340	0,012
predicted RNA	antisense: NGO1440	-1,461	1,461	0,009
predicted RNA	antisense: NGO1440	-1,501	1,501	0,005
predicted RNA	antisense: NGO1440	-1,521	1,521	0,004
predicted RNA	antisense: NGO1440	-1,538	1,538	0,004
NGO0567	hydrolase	-1,560	1,560	0,002
NGO2094	co-chaperonin GroES	-1,586	1,586	0,027
NGO1188	magnesium transporter	-1,645	1,645	0,001
NGO1989	hypothetical protein	-1,660	1,660	0,040

Fonte: Desenvolvido pela autora, 2020.