



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
CURSO DE FARMÁCIA

Jhonatan Augusto Ribeiro

Investigação dos mecanismos moleculares de resistência à ceftriaxona em *Neisseria gonorrhoeae*: o papel do gene *penA* tipo mosaico e da proteína de ligação à penicilina 2 (PBP2).

Florianópolis, 2023

Jhonatan Augusto Ribeiro

Investigação dos mecanismos moleculares de resistência à ceftriaxona em *Neisseria gonorrhoeae*: o papel do gene *penA* tipo mosaico e da proteína de ligação à penicilina 2 (PBP2).

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador(a): Prof.(a) Dra. Maria Luiza Bazzo.
Coorientador(a): Dr. Marcos André Schörner,

Florianópolis

2023

Ribeiro, Jhonatan Augusto

Investigação dos mecanismos moleculares de resistência à ceftriaxona em *Neisseria gonorrhoeae*: o papel do gene *penA* tipo mosaico e da proteína de ligação à penicilina 2 (PBP2). / Jhonatan Augusto Ribeiro ; orientador, Maria Luiza Bazzo, coorientador, Marcos André Schörner, 2023.

85 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. *Neisseria gonorrhoeae*. 3. Resistência à ceftriaxona. 4. gene *penA* tipo mosaico. 5. Proteína de ligação à penicilina 2. I. Bazzo, Maria Luiza. II. Schörner, Marcos André. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. IV. Título.

Jhonatan Augusto Ribeiro

Investigação dos mecanismos moleculares de resistência à ceftriaxona em *Neisseria gonorrhoeae*: o papel do gene *penA* tipo mosaico e da proteína de ligação à penicilina 2 (PBP2).

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Farmacêutico e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia.

Florianópolis, 30 de novembro de 2023.

Coordenação do Curso

Banca examinadora

Prof.(a) Maria Luiza Bazzo, Dr.(a)
Orientador(a)

Marcos André Schörner, Dr.(a)
Coorientador(a)

Prof.(a) Hernán Francisco Terénzi, Dr.(a)
UFSC

Prof.(a) Jussara Kasuko Palmeiro, Dr.(a)
UFSC

Florianópolis, 2023.

Dedico este trabalho aos profissionais de saúde e demais estudiosos da
microbiologia.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de expressar minha imensa admiração pela minha orientadora Dra. Maria Luiza Bazzo. Me sinto muito honrado por ter participado do seu grupo de colaboradores num laboratório de excelência. Além de professora e orientadora, Maria Luiza se tornou para mim uma referência nas suas diversas atuações como profissional farmacêutica, pesquisadora, gestora, líder e mãe científica. Muito obrigado pela sua receptividade, confiança, entusiasmo e tutela durante o desenvolvimento desse trabalho.

Esse projeto não teria se concretizado sem essas duas pessoas incríveis que pacientemente me ensinaram, me orientaram e me acompanharam cotidianamente durante a execução e elaboração desse trabalho: Dr. Marcos Schörner e Dra. Jéssica Martins. Sou muito grato a vocês por todo o aprendizado, orientação, convivência e apoio, inclusive em altas horas da noite e durante finais de semana.

A minha experiência no LBMMS foi edificante para a minha formação profissional. Quero agradecer ao Felipe Rocco e Lica Golfetto pela oportunidade. Assim como à toda equipe do LBMMS: Fernando, Cida, Hana, Manu, Renata, Damaris, Tai, Clarice, Henrique, Júlia Kinetz, Chris, Rafael, Julia Azevedo, Adri, Bianca e Ketlyn. Muito obrigado pelo compartilhar de saberes e pela convivência.

Quero agradecer ao meu pai Cezar e minha mãe Rose por todo o suporte, amparo, proteção e incentivo durante toda a minha vida. Vocês acreditaram em mim e me conduziram em busca do meu futuro. Amo vocês! Sou grato aos meus avós Orlando e Santa pelo afeto a mim investido e por terem aguçado a minha curiosidade intelectual desde a minha primeira infância.

Jamais poderia deixar de agradecer minha alma gêmea, meu cúmplice, meu *best*, meu companheiro de todas as horas (vitoriosas e desafiadoras). Muito obrigado Gustavo Catarina pela companhia, afeto e suporte durante o percurso da graduação. Sua amizade foi um presente extraordinário que a UFSC me proporcionou.

Quero agradecer também à FAPEU pelo suporte financeiro e ao HU-UFSC que se tornou a minha casa nos últimos meses.

Preciso expressar minha gratidão ao saudoso professor Adair Santos, à professora Morgana Duarte e à equipe do LANDI-UFSC pela minha primeira iniciação científica que foi fundamental para meu desenvolvimento como pesquisador.

Eu não poderia concluir esse trabalho sem mencionar meu sentimento de admiração pelos meus mestres e mestras que me influenciaram e me ensinaram a beleza da profissão farmacêutica. Faço questão de agradecer nominalmente aos meus professores e professoras: Rejane Cirra, Leidiane Mazzardo, Alcides Milton, Flávia Martinello, Mareni Farias, Eloir Schenkel, Daniela Tartari, José Maia, Ilíada Rainha, Maninha, Ana Lúcia Severo, Fátima Barreto, Liliete Canes, Fabíola Fillipin, Ana Rabelo, Karin Caumo, Celso Spada, Solange Blatt, Marcos Machado, Dirleise Colle, Iara Kretzer, Jairo Santos, Roberto Melo, Edson Silva, Beatriz Borba, Alexandre Sherlley, Fabiana Botelho, Eduardo Dalmarco, Izabel Demarchi, Maria Cláudia, Ziliani Buss, Angela Campos, Aurea Linder, Camila Marchioni, Chistiane Meyre, Cláudia Santos, Cristiane Ribeiro, Elenara Teixeira, Filipe Carvalho, Flavio Reginatto, Geison Izídio, Giovana Bazzo, Hernán Terenzi, Maique Weber, Marina Matozzo, Nito Debacher, Danielle Marranquiel, Norberto Rech, Rosana Santos, Silvana Contezini, Tania Pasa, Lilian Bernardes, Miriam Falkberg, Thiago Caon, Valdecir Laura, Ana Arisi. Não posso deixar de denunciar elas! As responsáveis por provocar minha curiosidade e paixão microbiológica: Silvani Verruck, Jussara Kasuko, Mara Scheffer, Cleonice Michelon, Thaís Sincero, Lucy Parucker e Marilia Miotto. Vocês foram essenciais para o meu desenvolvimento profissional e pessoal, resta em mim um sentimento de gratidão imensa por cada ensinamento e aprendizado.

Apesar de não estar mais na UFSC depois da sua merecida aposentadoria, gostaria de deixar o registro do meu afeto por uma servidora que foi por muito tempo conhecida como a “Mãe da Farmácia”. Uma senhora dedicada, acolhedora, humana e afável, um anjo chamado Rosalba que acolheu a mim e muitas gerações de farmacêuticos da UFSC.

Por fim, encerro este ciclo da minha vida com gratidão e imenso orgulho da minha *alma mater*. Agradeço à UFSC por ter ampliado a minha perspectiva de mundo, por ter me ensinado a profissão farmacêutica e por ter me preparado para ser um profissional ético, com pensamento crítico e comprometido para contribuir na busca por uma sociedade mais próspera e com saúde!

Em seu encontro com a Natureza, a ciência invariavelmente provoca um sentimento de reverência e admiração. O próprio ato de compreender é uma celebração da união, da incorporação, ainda que numa escala muito modesta, à magnificência do Cosmos. E ao longo do tempo o desenvolvimento cumulativo do conhecimento em todo o mundo converte a ciência em algo que é quase uma metainteligência, capaz de ultrapassar as fronteiras das nações e das gerações (Carl Sagan, 1995).

RESUMO

A gonorreia é uma infecção sexualmente transmissível (IST) causada pela bactéria *Neisseria gonorrhoeae* com incidência estimada em mais de 80 milhões de casos anuais na população mundial. Além dos desfechos deletérios à saúde sexual e reprodutiva, outro fato importante é a evolução do perfil de resistência do gonococo a várias classes de antimicrobianos disponíveis na clínica. A resistência às cefalosporinas de terceira geração é um fenômeno grave para a saúde pública pois a ceftriaxona é considerada como a última alternativa terapêutica empírica eficaz contra as infecções gonocócicas. No entanto, desde 2009 quando foi descrito o primeiro caso de *N. gonorrhoeae* resistente a esse fármaco no Japão, observa-se uma difusão internacional de cepas multirresistentes, fato que reforça a importância dos programas de vigilância de resistência do gonococo com a finalidade de interromper cadeias de transmissão, orientar o melhor tratamento e impedir o aparecimento de casos de gonorreia intratáveis. Nesse sentido, este trabalho investigou o mecanismo de resistência à ceftriaxona em *N. gonorrhoeae*, principalmente o papel do gene *penA* tipo mosaico e da proteína de ligação à penicilina 2 (PBP2). Para alcançar esse objetivo, cepas sensíveis foram geneticamente transformadas em cepas resistentes à ceftriaxona através de um protocolo de transformação por cocultivo e cultivo com amplicons do gene *penA*. Após a transformação, as cepas que adquiriram o gene *penA* tipo mosaico manifestaram um fenótipo de alta resistência à ceftriaxona, sendo então realizada a genotipagem das cepas por NG-MAST e sequenciamento genômico da região do gene *penA*. As análises dos resultados do sequenciamento demonstraram que a cepa sensível adquiriu substituições de aminoácidos consideradas críticas para a aquisição do fenótipo resistente à ceftriaxona como A311V, T316P e T483S. Essas mutações alteram a conformação do sítio-ativo de ligação da ceftriaxona na PBP2, diminuindo a acilação necessária para o efeito de inibição da enzima. Sendo assim, pode-se concluir que a transformação é um mecanismo de aquisição do gene *penA* tipo mosaico com papel determinante na resistência à ceftriaxona em *N. gonorrhoeae*.

Palavras-chave: *Neisseria gonorrhoeae*; Resistência aos antimicrobianos; Resistência à ceftriaxona; Gene *penA* tipo mosaico; Proteína de ligação à penicilina 2.

ABSTRACT

Gonorrhoea is a sexually transmitted infection (STI) caused by *Neisseria gonorrhoeae*, with an estimated incidence of over 80 million cases annually within the global population. In addition to deleterious outcomes for sexual and reproductive health, another crucial factor is the evolution of the gonococcal resistance profile to all antimicrobials classes clinically available. Resistance to third-generation cephalosporins is a concerning phenomenon for public health given that ceftriaxone is considered the last effective empirical therapeutic alternative against gonococcal infections. However, since 2009 when the first case of ceftriaxone resistant *N. gonorrhoeae* was described in Japan, there has been worldwide diffusion of multidrug-resistant strains, emphasizing the importance of gonococcal resistance surveillance programs aiming to interrupt transmission chains, guiding optimal treatment, and preventing the emergence of untreatable gonorrhoea. Given this context, this study investigated the mechanism of ceftriaxone resistance in *N. gonorrhoeae*, focusing primarily on the role of the mosaic *penA* gene and penicillin-binding protein 2 (PBP2). To achieve this goal, sensitive strains were genetically transformed into ceftriaxone-resistant strains. After Once transformed, strains that acquired the mosaic *penA* gene exhibited a highly resistant phenotype to ceftriaxone, being then submitted to genotyping using NG-MAST, and genomic sequencing of the *penA* gene region. Sequencing results demonstrated that the sensitive strain had amino acid substitutions considered critical for the acquisition of ceftriaxone-resistant phenotype, such as A311V, T316P, and T483S. These mutations alter the conformation of the PBP2 ceftriaxone-binding active site, reducing acylation which is necessary for enzyme inhibition. Therefore, it can be said that the mosaic *penA* gene is a resistance marker to third-generation cephalosporins, and mutations in this allele result in the translation of an altered PBP2 with reduced affinity for ceftriaxone.

Keywords: *Neisseria gonorrhoeae*; Antimicrobial resistance; Ceftriaxone resistance; Mosaic *penA* gene; Penicillin-binding protein 2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Visualização de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> na bacterioscopia	26
Figura 2- Experimento de transformação utilizando a técnica de cocultivo em meio líquido:	39
Figura 3- Esquema sobre transformação por cocultivo em meio sólido	40
Figura 4- Esquema do experimento de transformação em meio sólido utilizando produtos de amplificação purificados.	42
Figura 5- Avaliação de crescimento do caldo GC em diferentes diluições.....	49
Figura 6- Avaliação de crescimento em meio líquido	50
Figura 7- Avaliação do crescimento em placa após protocolo de cocultivo em meio líquido	51
Figura 8- Avaliação do crescimento em placa após protocolo de cocultivo em meio sólido	53
Figura 9- Avaliação do crescimento em placa após protocolo de transformação com amplicons do gene de resistência	55
Figura 10- Gel de agarose 2% com produtos de amplificação do gene <i>tbpB</i>	59
Figura 11- Gel de agarose 2% com produtos de amplificação do gene <i>porB</i>	60
Figura 12- Gel de agarose 2% com produtos de amplificação do gene <i>penA</i>	61
Figura 13- Alinhamento das sequências de nucleotídeos da região do gene <i>penA</i> ..	63
Figura 14- Mutações críticas em PBP2 para resistência às cefalosporinas.....	71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Evolução temporal dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos em <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	30
Quadro 2- Primers utilizados para amplificação do gene <i>pena</i>	44
Quadro 3- Primers utilizados para amplificação de regiões dos genes para identificação das cepas	45
Quadro 4- Identificação das cepas transformantes selecionadas para o estudo	54
Quadro 5- Tipagem genotípica por NG-MAST	72
Quadro 6- Identificação alélica do gene <i>penA</i> das cepas transformantes	73

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
μL	Microlitros
μg	Micrograma
α	Letra alfa do alfabeto grego
β	Letra alfa do alfabeto grego β

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Concentração Inibitória Mínima (CIM) das cepas de referência	36
Tabela 2- Resultados da determinação da CIM das cepas transformantes	56
Tabela 3- Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do gene <i>penA</i> das cepas transformantes	65
Tabela 4- Caracterização das substituições de aminoácidos na PBP2	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST	<i>Blast Local Alignment Search Tool</i>
BrCAST	Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos
CEACAM	Antígeno Carcinoembrionário humano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DUS	<i>DNA uptake sequence</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSH	Homem que faz sexo com homem
IGV	<i>Integrative Genomics Viewer</i>
LBMMS	Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia
LOS	Lipooligossacarídeo
NG-MAST	<i>Neisseria gonorrhoeae multi-antigen sequence typing</i>
NG-STAR	<i>N. gonorrhoeae Sequence Typing for Antimicrobial Resistance</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONT®	<i>Oxford Nanopore Technology</i>
Opa	Proteína de opacidade
pb	Pares de base
PBP2	Proteína de ligação à penicilina 2
PBPs	Proteínas de ligação à penicilina
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PrEP	Profilaxia Pré-exposição
ST	<i>Sequence Type</i>
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1	<i>NEISSERIA GONORRHOEAE</i>	20
2.2	PATOGÊNESE E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	21
2.3	EPIDEMIOLOGIA E POLÍTICAS DE SAÚDE	22
2.4	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA	25
2.5	TRATAMENTO DA INFECÇÃO POR <i>NEISSERIA GONORRHOEAE</i>	28
2.6	RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	29
2.7	RESISTÊNCIA À CEFTRIAXONA.....	30
2.8	MECANISMO DE RESISTÊNCIA À CEFTRIAXONA.....	32
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4	METODOLOGIA.....	36
4.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO.....	36
4.2	SELEÇÃO DAS CEPAS.....	36
4.3	TRANSFORMAÇÃO <i>IN VITRO</i> UTILIZANDO A TÉCNICA DE COCULTIVO.	37
4.3.1	Preparo e seleção do meio líquido para cocultivo.....	37
4.3.2	Transformação por cocultivo em meio líquido	38
4.3.3	Transformação por cocultivo em meio sólido	40
4.4	TRANSFORMAÇÃO <i>IN VITRO</i> UTILIZANDO PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO PURIFICADOS	41
4.5	DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA POR ÁGAR DILUIÇÃO E FITA DE GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO	43
4.6	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	43
4.6.1	Extração de DNA	43
4.6.2	PCR do gene <i>penA</i>, <i>porB</i> e <i>tbpB</i>.....	44
4.7	PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR.....	46
4.8	GENOTIPAGEM POR NG-MAST	47

4.9	ANÁLISE DE MUTAÇÕES DE NUCLEOTÍDEOS E SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDOS	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE EM MEIO LÍQUIDO	49
5.2	AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO APÓS COCULTIVO EM MEIOS LÍQUIDOS E SÓLIDO:	51
5.3	RESULTADOS DA TRANSFORMAÇÃO POR PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO PURIFICADOS	54
5.4	RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	55
5.5	PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE IDENTIFICAÇÃO	58
5.6	MUTAÇÕES DE UM NUCLEOTÍDEO ÚNICO ENCONTRADAS NAS CEPAS TRANSFORMANTES	62
5.7	CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDOS NA PBP2	66
5.8	TIPAGEM GENOTÍPICA POR NG-MAST	72
5.9	IDENTIFICAÇÃO ALÉLICA DO GENE DE RESISTÊNCIA	73
6	CONCLUSÃO	74
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	74
	REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

As infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) são um problema de saúde pública com alta incidência e prevalência na população mundial. Somente em 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou 374 milhões de novos casos de ISTs. Dentre estes, foram estimados 153 milhões de casos de tricomoníase, 128 milhões de casos de infecções por *Chlamydia trachomatis*, 82 milhões de casos de gonorreia e 7 milhões de casos de sífilis em pessoas com faixa etária entre 15 e 49 anos. Em decorrência desse panorama, a OMS definiu metas para a eliminação das ISTs até 2030 (WHO, 2021). O esforço global concentra-se principalmente na eliminação da transmissão vertical de HIV e sífilis, na imunização contra o papilomavírus humano (HPV) e no controle da resistência de *Neisseria gonorrhoeae* (gonococo) aos antimicrobianos (Miranda et al., 2021).

As infecções por *N. gonorrhoeae* podem ser assintomáticas, especialmente em mulheres. Sendo assim, é necessário o investimento em métodos diagnósticos mais sensíveis para a detecção desse patógeno nos indivíduos assintomáticos. Em razão dessas infecções assintomáticas e da magnitude de sua ocorrência, é necessária a implementação de programas e ações de rastreamento, principalmente em populações com maior exposição às práticas sexuais desprotegidas (Chang et al., 2020).

A gonorreia, quando não tratada, é um fator de risco para a saúde sexual e reprodutiva, pois pode apresentar desfechos clínicos deletérios como a doença inflamatória pélvica (DIP), risco aumentado de infecção por HIV, prostatite, epididimite, estenose uretral, endocervicite, uretrite e infertilidade (BRASIL, 2022). Em casos raros pode ocorrer disseminação hematogênica e acometimento das articulações, um quadro denominado de artrite gonocócica (OMS, 2012). A transmissão dessa infecção pode ocorrer por via sexual ou vertical, sendo esta última responsável pela manifestação da oftalmia gonocócica neonatal (BRASIL, 2022).

Em 2009, a OMS lançou a rede internacional GASP (do inglês, *Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme*) para monitorar tendências de resistência e recomendar diretrizes de tratamento (Unemo et al., 2016). Em razão da alta capacidade adaptativa de *N. gonorrhoeae* por meio da aquisição de mecanismos de

resistência aos antimicrobianos (RAM), a OMS classificou este patógeno como de alta prioridade para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, considerando o risco do aparecimento de casos de gonorreia intratáveis (WHO, 2017).

Diante desse cenário de risco emergente à saúde pública, a OMS lançou em 2012 o Plano global de ação para o controle da disseminação e impacto da RAM em *N. gonorrhoeae*, estabelecendo estratégias que visam a contenção da disseminação de cepas multirresistentes, com ênfase nos isolados que apresentam resistência às cefalosporinas de terceira geração (WHO, 2012). Entre as estratégias propostas encontram-se programas para tratamento efetivo de pacientes e suas parcerias sexuais, aperfeiçoamento da capacidade diagnóstica para detecção rápida das infecções, ações de educação em saúde e fortalecimento de redes laboratoriais para programas de vigilância (WHO, 2012). Entre os eixos norteadores do plano global de controle de RAM em *N. gonorrhoeae* em laboratório encontram-se: a identificação dos fatores que favorecem a RAM em *N. gonorrhoeae*; novos métodos moleculares para monitoramento e detecção de RAM; melhoramento das técnicas de cultivo; utilização das cepas de referência da OMS para controle de qualidade; métodos para determinação de concentração inibitória mínima (CIM) e comparação de fenótipos; correlação dos genótipos com a RAM e seus desfechos clínicos (WHO, 2012).

Desde a introdução das sulfonamidas na clínica na década de 1930, o gonococo vem se tornando resistente a praticamente todas as classes de antimicrobianos disponíveis (Unemo et al., 2019). Tendo em vista que a ceftriaxona é considerada a última opção de monoterapia antimicrobiana de primeira linha para uso no tratamento empírico, a RAM do gonococo à classe das cefalosporinas de terceira geração requer uma atenção especial (WHO, 2012). Os mecanismos de resistência à ceftriaxona ainda não foram completamente elucidados, mas alguns trabalhos concluíram, a partir do sequenciamento de isolados resistentes, que os genes *penA* tipo mosaico, *mtrR*, *ponA* e *porB* estão relacionados ao fenótipo resistente às cefalosporinas (Unemo, 2019; Mlynarczyk-Bonikowska, 2022).

A aplicação de métodos moleculares para a vigilância genômica e predição do perfil de RAM de *N. gonorrhoeae* tem se tornado uma importante ferramenta para o monitoramento da circulação de cepas multirresistentes (Donà et al., 2017). Atualmente, as técnicas de sequenciamento genômico permitem os estudos

epidemiológicos correlacionarem os diferentes genótipos com os perfis de resistência e suas cadeias de transmissão (Martin *et al.*, 2004). Ademais, o sequenciamento genômico também possibilita a identificação de mutações e aquisições de genes de resistência que podem ser analisados filogeneticamente a partir dos isolados clínicos (Lin *et al.*, 2021).

O avanço do campo da bioinformática e das técnicas *in silico* permitem complementar os métodos tradicionais de cultivo e biologia molecular por meio de análises em programas que comparam sequências genômicas e estruturas de proteínas associadas como alvos potenciais para desenvolvimento de vacinas ou medicamentos antimicrobianos (Baarda, 2015; El-Rami, 2019; Peng, 2020). Sendo assim, ensaios *in silico* podem colaborar com o avanço da pesquisa de RAM do gonococo por meio da simulação das condições *in vivo* com dados que permitem a predição de fenótipos de resistência a partir do genótipo obtido pelo sequenciamento genômico dos isolados (Ndagi, 2020; Ren, 2022; Seoane, 2021; Yang, 2022).

Diante do cenário de aumento da resistência de *N. gonorrhoeae* aos antimicrobianos e a redução das alternativas terapêuticas para o tratamento da gonorreia, o presente estudo apresenta relevância no sentido de auxiliar na compreensão dos mecanismos moleculares que conferem resistência à ceftriaxona. Atualmente, este fármaco é a recomendação de primeira linha para o tratamento empírico das infecções pelo gonococo em protocolos nacionais e internacionais (Brasil, 2022; WHO, 2016).

Apesar da baixa incidência de isolados de gonococo resistentes à ceftriaxona no cenário epidemiológico global, alguns estudos têm mostrado a disseminação de cepas com perfil intermediário e multirresistentes em diferentes continentes (Golparian *et al.*, 2023; Liao, 2023; Ko, 2019; Kirkcaldy, 2019; Yahara, 2021; Attram, 2019; Lin, 2021). Ademais, tendo em vista a capacidade adaptativa e o histórico da evolução do perfil de RAM do gonococo, a resistência à ceftriaxona mostra-se como um preocupante problema de saúde pública e os isolados resistentes devem ser estudados pelos programas de vigilância.

Este trabalho visou investigar os mecanismos moleculares associados à resistência de *N. gonorrhoeae* aos antimicrobianos da classe das cefalosporinas, com ênfase no fármaco ceftriaxona. A partir disso, este estudo propôs a adaptação de um

modelo experimental de transformação genética para avaliação de mutações no gene *penA* tipo mosaico e possíveis alterações na tradução da proteína de ligação à penicilina 2 (PBP2, do inglês *Penicilin Binding Protein 2*).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Neisseria gonorrhoeae*

A bactéria *Neisseria gonorrhoeae* é um diplococo gram-negativo intracelular com cerca de 0,6 a 1,0 µm de diâmetro, tendo formato riniforme e com faces côncavas adjacentes (Focaccia, 2009). *N. gonorrhoeae* é classificada como catalase e oxidase positiva, DNase negativa e de crescimento fastidioso (Leber, 2016), sendo que seu cultivo deve ser realizado em meios enriquecidos como ágar chocolate e Thayer-Martin modificado em atmosfera úmida de 5% de CO₂ com temperatura de 35,5°C (Procop, 2018).

Os membros do gênero *Neisseria* são classificados na família Neisseriales e no subgrupo beta do filo Proteobacteria (Procop, 2018). O gênero *Neisseria* compreende mais de 27 espécies, sendo somente *Neisseria gonorrhoeae* um patógeno estrito. Os membros desse gênero encontrados nos seres humanos são: *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *N. lactamica*, *N. sicca*, *N. subflava* (inclusive as subvariantes *subflava*, *flava* e *perflava*), *N. mucosa*, *N. flavescens*, *N. cinerea*, *N. polysaccharea*, *N. bacilliformis* e três subespécies de *N. elongata* (Procop, 2018).

Outra espécie de relevância clínica é *Neisseria meningitidis*, representante do gênero que pode ser patogênica em casos de meningites e infecções do trato respiratório. Análises filogenéticas indicam que *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis* evoluíram de um ancestral comum, porém, estas bactérias ocupam sítios anatômicos distintos, a mucosa genital e a mucosa da nasofaringe respectivamente (Quillin, 2018).

O gonococo é muito sensível a fatores ambientais como oxigênio, temperaturas fora da faixa fisiológica, desidratação e presença de substâncias tóxicas como ácidos graxos (Quillin, 2018), portanto, a bactéria não consegue sobreviver muito tempo fora do corpo humano. Devido às particularidades anatômicas da região urogenital humana, é possível que o gonococo encontre condições aeróbicas, microaeróbicas e anaeróbicas, fator que justifica sua alta adaptação a estes sítios anatômicos (Unemo et al., 2019).

N. gonorrhoeae apresenta um único cromossomo circular com aproximadamente 2,3 Mpb e é capaz de realizar recombinação homóloga por transformação naturalmente (Hamilton *et al.*, 2006). Essa capacidade facilitada de transferência de DNA é um fator adaptativo importante para aquisição de genes de resistência aos antimicrobianos (Unemo *et al.*, 2019).

Em *N. gonorrhoeae*, a captura de DNA do ambiente é mediada pela proteína PilQ associada a outras proteínas de reconhecimento de sequências específicas de DNA. Uma vez captado, o fragmento de DNA atravessa a membrana externa por um canal formado pela proteína PilE, atravessando o espaço periplasmático. Somente uma fita é translocada para o citoplasma e esta pode ser integrada ao genoma por recombinação (Marques, 2012). Este elevado grau de recombinação genética é necessário para gerar diversidade antigênica e permitir, dessa forma, a perpetuação da infecção gonocócica na população humana (Hamilton *et al.*, 2006).

2.2 PATOGÊNESE E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A etapa inicial para o estabelecimento da infecção é a adesão ao epitélio da mucosa do hospedeiro. Essa adesão é mediada por estruturas de membrana como as proteínas de opacidade (Opa), pilus tipo IV, lipo-oligossacarídeo (LOS) e a porina principal PorB. A adesão à superfície das células epiteliais e, por conseguinte retração do pilus tipo IV, permite ao gonococo aproximar-se e aderir-se ao epitélio do hospedeiro, sendo o pilus gonocócico crucial para a colonização eficiente do epitélio colunar não ciliado da mucosa urogenital (Quillin, 2018; Unemo, 2019).

Essas proteínas são necessárias para a adesão ao tecido do hospedeiro e a outras células de *N. gonorrhoeae*, são importantes também para a motilidade espasmódica sobre a mucosa e evasão dos leucócitos polimorfonucleares da resposta imune inata. Por outro lado, as proteínas Opa atuam como adesinas e se ligam principalmente ao antígeno carcinoembrionário humano (CEACAM), uma família de proteínas de superfície (Unemo *et al.*, 2019).

Com a progressão dos estágios da patogênese da doença, sendo estes a adesão, colonização, invasão e evasão da resposta imune, o gonococo expressa muitos fatores de virulência para promover sua sobrevivência e replicação no trato

urogenital do hospedeiro. Para evitar a ação do sistema complemento, o gonococo esconde seu LOS conjugando-se com ácido siálico e ligando-se ao fator H e a proteína C4BP, evitando dessa forma o reconhecimento pelo sistema complemento. Ademais, *N. gonorrhoeae* consegue sobreviver dentro dos fagossomos de macrófagos, modulando sua apoptose e produção de citocinas (Quillin, 2018).

A gonorreia, doença causada pela infecção por *N. gonorrhoeae*, pode se manifestar como uretrite em indivíduos de ambos os sexos e cervicite em indivíduos do sexo feminino. Além do trato urogenital, o gonococo pode infectar sítios extragenitais como faringe, reto, conjuntiva e raramente pode se apresentar de forma sistêmica (Unemo *et al.*, 2019). A maioria dos indivíduos do sexo masculino com uretrite são sintomáticos, porém, uma parte significativa de indivíduos do sexo feminino com gonorreia urogenital cursam a infecção de forma assintomática ou com sintomas inespecíficos (Unemo *et al.*, 2019). As uretrites gonocócicas geralmente cursam com disúria, inflamação do meato uretral, urgência miccional, polaciúria e corrimento uretral purulento (Salomão, 2017).

Durante a gestação, as infecções gonocócicas têm sido associadas a corioamnionite, parto prematuro, baixo peso ao nascer e aborto espontâneo; além disso, a gonorreia quando não tratada pode ocasionar conjuntivite neonatal, levando ao risco de perfuração da córnea e cegueira em neonatos (Kirkcaldy *et al.*, 2019).

2.3 EPIDEMIOLOGIA E POLÍTICAS DE SAÚDE

Segundo a OMS, somente em 2020 foram estimados cerca de 82,4 milhões de casos de infecções gonocócicas (WHO, 2021). A incidência de gonorreia tem aumentado nos últimos anos principalmente entre populações-chave como Homens que Fazem Sexo com Homens (HSH), minorias raciais/étnicas, populações indígenas e profissionais do sexo (Kirkcaldy *et al.*, 2019), e tem sido associada ao risco aumentado de aquisição e transmissão de HIV (Pathela *et al.*, 2013).

Alguns estudos relataram que indivíduos HSH que utilizam Profilaxia Pré-Exposição (PrEP) podem ter uma probabilidade cerca de 25 vezes maior de adquirir uma infecção gonocócica quando comparados com HSH que não utilizam PrEP, em decorrência do aumento do comportamento sexual de risco (Kojima *et al.*, 2016). Em

razão disso, iniciativas recentes têm defendido o uso profilático de doxiciclina (DoxiPep) pós-exposição sexual para redução da incidência de outras ISTs nesta população (Luetkemeyer *et al.*, 2023). No entanto, apesar dos resultados promissores, é necessário o monitoramento do impacto desses programas no perfil de resistência bacteriana, principalmente do gonococo (Unemo; Kong, 2023).

O local geográfico em que as pessoas vivem também aparenta ter um papel na prevalência da infecção gonocócica, refletindo prováveis diferenças no acesso à informação sobre saúde, fatores sociais como estigma e comportamentos de procura pelos serviços de saúde (Unemo *et al.*, 2019). Além disso, a dinâmica da globalização com frequentes fluxos populacionais pode facilitar a difusão de cepas resistentes através das fronteiras internacionais (Kirkcaldy *et al.*, 2019). Segundo uma estimativa realizada pela OMS, a prevalência de gonorreia foi mais elevada em mulheres na região Africana (1,99%), nas Américas (0,9%) e na região do Pacífico Ocidental (0,9%), sendo mais baixa em mulheres europeias (0,3%). Em homens, a prevalência é mais elevada na região Africana (1,6%), nas Américas (0,8%) e no Pacífico Ocidental (0,7%), sendo mais baixa na Europa (0,3%), conforme foi observado nas mulheres (Kirkcaldy *et al.*, 2019).

As probabilidades de transmissão da gonorreia variam de acordo com os tipos de práticas sexuais e foram calculadas matematicamente em um estudo desenvolvido por Hui *et al.*, 2015, no qual foi visto que a chance de transmitir a infecção com sexo oral desprotegido é de 63% quando uretral-faríngeo e 9% faríngeo-uretral. Na prática de sexo anal, a probabilidade é de 84% quando uretral-retal e 2% retal-uretral. A chance de transmissão no ato sexual pênis-vagina é de 50% e 20% quando vaginal-pênis (Hui *et al.*, 2015). Portanto, a transmissão por sítios extragenitais, sendo esses geralmente assintomáticos, apresenta papel importante na sustentação das cadeias de transmissão da gonorreia, principalmente em populações HSH (Kirkcaldy *et al.*, 2019).

Em decorrência da problemática dos casos assintomáticos em mulheres, o CDC (do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention*) dos Estados Unidos recomenda que seja realizado o rastreamento anual de mulheres com vida sexual ativa com idade <25 anos e para mulheres de outras faixas etárias que apresentam aumento do comportamento de risco como múltiplos parceiros ou parcerias sexuais com histórico

de ISTs (Walensky *et al.*, 2021). No Brasil, durante o programa de pré-natal é recomendada a requisição de exames laboratoriais para pesquisa de *Chlamydia trachomatis*, *Streptococcus* do grupo B e gonococo (Brasil, 2012).

No Brasil, um marco importante para o enfrentamento das ISTs ocorreu em 2015 com a publicação do Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) para Atenção Integral às Pessoas com ISTs. Este documento foi atualizado em 2022 e preconiza o diagnóstico, tratamento e manejo dos casos de ISTs baseando-se em parâmetros de eficácia, segurança e custo-efetividade das tecnologias recomendadas (Brasil, 2022). Além do PCDT, em 2014 foi realizada uma parceria entre o Ministério da Saúde (MS), a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e sítios sentinelas para o primeiro estudo nacional de vigilância da sensibilidade do gonococo aos antimicrobianos, o Projeto SenGono (Miranda *et al.*, 2021).

Segundo este estudo de vigilância da RAM do gonococo realizado no Brasil entre 2015 e 2016, cerca de 6,8% dos isolados de *N. gonorrhoeae* apresentaram uma concentração inibitória mínima (CIM) de cefixima de 0,125 mg/L, valor próximo do ponto de corte que demonstra resistência, de acordo com os critérios do Comitê Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana (EUCAST – do inglês *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). Conforme os pontos de corte atuais do EUCAST, dos 550 isolados analisados, 0,2% são classificados como resistentes à cefixima com CIM de 0,25 mg/L (Bazzo, 2018; EUCAST, 2023). Este dado é um alerta sobre o risco da diminuição da sensibilidade do gonococo às cefalosporinas de terceira geração, fato este que precisa ser acompanhado com atenção pelos programas de vigilância (Bazzo *et al.*, 2018).

Além dos perfis de resistência já bem estabelecidos às sulfonamidas, tetraciclina e penicilinas, na primeira edição do projeto SenGono constatou-se resistência emergente ao ciprofloxacino, com taxas superiores a 50% em todas as regiões do país (Brasil, 2017; Bazzo, 2018). Esses dados do projeto SenGono subsidiaram a exclusão do ciprofloxacino como tratamento de primeira linha em infecções gonocócicas anogenitais não complicadas no país. Além disso, os isolados de todas as regiões que participaram do estudo mostraram-se sensíveis à ceftriaxona (Bazzo, 2018). Sendo assim, o novo protocolo atualizado após esses resultados

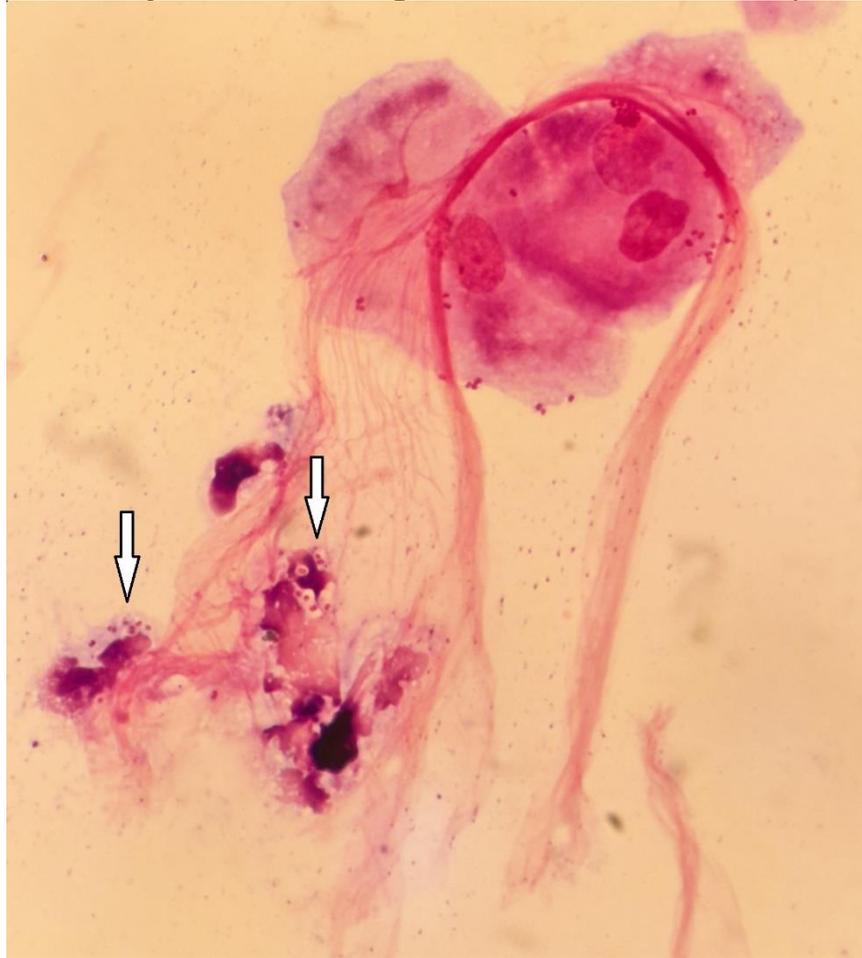
recomenda que o tratamento seja feito com ceftriaxona 500mg intramuscular (IM) associada à azitromicina 1g via oral (VO) em dose única (Brasil, 2017).

Em razão da relevância dos resultados do perfil de resistência em *N. gonorrhoeae* reportados pelo Projeto SenGono, o MS instituiu um programa de vigilância sentinela da síndrome do corrimento uretral masculino por meio da portaria GM/MS nº 1.553 de 2020. A institucionalização do programa é uma etapa importante para a consolidação do monitoramento sistemático de dados, enviados pelas unidades de saúde habilitadas, sobre os casos de síndrome do corrimento uretral masculino no Brasil (Brasil, 2020). Portanto, a inserção de *N. gonorrhoeae* na pauta das políticas públicas de vigilância retrata como a evolução da RAM se constitui em ameaça à saúde pública.

2.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

O diagnóstico laboratorial da gonorreia pode ser realizado utilizando métodos de microscopia, provas bioquímicas a partir de cultura bacteriana e exames moleculares, porém a cultura bacteriana é necessária para determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos (Młynarczyk-Bonikowska *et al.*, 2020). A sensibilidade e a especificidade são variáveis de acordo com o método e o sítio anatômico, sendo que a microscopia por meio de coloração de gram apresenta alta sensibilidade e especificidade para indivíduos sintomáticos com pênis, mas sua sensibilidade é baixa para infecções endocervicais, portanto, seu uso não é recomendado para espécimes vaginais, urina, reto ou faringe (Brasil, 2013). Na bacterioscopia, a infecção gonocócica é caracterizada pela presença de elementos inflamatórios e diplococos gram-negativos conforme a figura 1.

Figura 1- Visualização de *Neisseria gonorrhoeae* na bacterioscopia.



Legenda: Amostra de secreção uretral com células epiteliais, exsudato, leucócitos polimorfonucleares com diplococos gram-negativos intracelulares (apontados com setas). Método de coloração de Gram, aumento de 1000x.
Fonte: o autor, 2023.

O diagnóstico a partir da cultura bacteriana, em condições otimizadas, é um método sensível e altamente específico que ainda permite a realização do teste de sensibilidade antimicrobiana (Brasil, 2013). De acordo com esquema de Kelloggs, as colônias do gonococo podem ser classificadas em cinco tipos caracterizados de acordo com a cor, topografia e reflexão da luz, sendo que as colônias de *N. gonorrhoeae* tendem a ser pequenas, brilhantes e elevadas (Procop, 2018). Após o cultivo, a identificação de *N. gonorrhoeae* é avaliada pela combinação de vários métodos de detecção por testes bioquímicos como a oxidase e metabolização de carboidratos (Meyer, 2020).

A cultura bacteriana também permite a determinação fenotípica do perfil de resistência dos isolados. O método por ágar-diluição é considerado o padrão-ouro

para a determinação de sensibilidade de *N. gonorrhoeae* aos antimicrobianos de acordo com o Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, 2019). No entanto, a determinação de sensibilidade aos antimicrobianos também pode ser efetuada por tiras reagentes. Essa metodologia consiste na utilização de uma fina tira reagente que carrega um gradiente de concentração do antimicrobiano estabilizado na tira. A tira contendo o gradiente do antimicrobiano utiliza o princípio de difusão em ágar, de forma similar aos tradicionais discos, permitindo assim a identificação da CIM no ponto onde é possível observar o início da elipse de inibição do crescimento bacteriano (Sader, 1994).

Os testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs, do inglês *Nucleic Acid Amplification Test*) foram desenvolvidos e introduzidos permitindo a detecção específica do DNA, ou RNA de *N. gonorrhoeae* e apresentam sensibilidade superior à cultura, principalmente em amostras do reto e faringe (Brasil, 2013). Além disso, os NAATs são mais rápidos do que a cultura, são compatíveis com diferentes tipos de amostra, reduzindo o tempo de liberação dos resultados e, quando associados com automação, podem permitir testes de alto rendimento (Meyer; Buder, 2020).

De forma complementar ao diagnóstico, a análise de sequenciamento genômico é fundamental na medicina laboratorial para a identificação de patógenos emergentes ou novos genótipos de patógenos existentes (Crossley *et al.*, 2020). O sequenciamento do genoma é uma ferramenta ideal para epidemiologia molecular, uma vez que identifica infecções mistas, análise preditiva de RAM e análise rápida das relações filogenéticas das cepas circulantes de *N. gonorrhoeae* (Seoane, 2021). Nesse sentido, o sequenciamento do genoma dos isolados de gonococo tem sido aplicado principalmente para monitoramento epidemiológico do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos (Peterson *et al.*, 2015).

Novos métodos de sequenciamento genômico têm sido desenvolvidos e são aplicáveis para a investigação de disseminação da RAM bacteriana. Recentemente, o sequenciamento pelo dispositivo portátil MinION® Mk1B (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido) foi utilizado para avaliação dos determinantes de RAM em *N. gonorrhoeae* (Golparian, 2018; Zhang, 2020; Juma, 2021). O sequenciamento por nanopore permite alcançar leituras superiores a 2 Mb. A leitura da sequência de nucleotídeos é baseada na passagem do DNA ou RNA de fita simples através de um

nanoporo da proteína α -hemolisina (α HL) estafilocócica (Clarke *et al.*, 2009). A ligação de um adaptador ao DNA de fita dupla facilita sua captura pelo poro da proteína. As bibliotecas são carregadas numa célula de fluxo contendo uma membrana com centenas de milhares de nanoporos. Em seguida, uma proteína motora pré-carregada ao adaptador na extremidade 5', juntamente com a aplicação de uma corrente iônica, direciona a fita simples através do nanoporo. Essa passagem de cada nucleotídeo através do nanoporo gera uma interrupção da corrente iônica que é detectada por um sensor, dessa forma é possível discriminar com exatidão a passagem de cada nucleotídeo e registrar a composição da sequência de DNA analisada (Mohammadi, 2022).

O sequenciamento do genoma também permite a identificação de cadeias de transmissão de cepas resistentes por meio de tipagem genética dos isolados. O NG-MAST (do inglês, *Neisseria gonorrhoeae multiantigen sequence typing*) é um método que possibilita a identificação de genótipos de *N. gonorrhoeae* a partir de fragmentos internos de dois *loci* codificadores de antígenos altamente polimórficos, *porB* e *tbpB*, se constituindo dessa forma um procedimento de tipagem molecular de alto rendimento (Martin *et al.*, 2004).

2.5 TRATAMENTO DA INFECÇÃO POR *Neisseria gonorrhoeae*

O tratamento atual para gonorreia recomendado pelo Ministério da Saúde consiste na administração de ceftriaxona 500 mg- IM e azitromicina 1 g VO, em dose única (Brasil, 2022). Na indisponibilidade de azitromicina, o tratamento pode ser realizado com administração de ceftriaxona 500 mg- IM e doxiciclina 100 mg- VO, duas vezes ao dia durante 7 dias. No caso de retratamento das infecções gonocócicas por falha de tratamento, o esquema terapêutico inclui duas condutas, podendo ser mantida a ceftriaxona 500 mg- IM com aumento da dose de azitromicina para 2 g, ou a administração de gentamicina 240 mg- IM e 2 g de azitromicina em dose única (Brasil, 2022).

Na ausência de uma vacina, a terapia antimicrobiana é fundamental para curar pessoas infectadas e reduzir a propagação da infecção na comunidade (Rice *et al.*, 2017), mas diante das falhas terapêuticas dos medicamentos atuais, existe um

grande esforço global para o desenvolvimento de novos antimicrobianos. Atualmente, estão sendo investigadas novas fluoroquinolonas como a delafloxacina, sitafloxacina (ambas em estudos clínicos), assim como novos inibidores da síntese proteica: lefamulina e solitromicina (Mlynarczyk-Bonikowska *et al.*, 2020).

2.6 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A bactéria *N. gonorrhoeae* está evoluindo para se tornar uma superbactéria, ou seja, pode tornar-se intratável devido à sua resistência a todas as classes de antimicrobianos disponíveis para tratamento (Unemo, 2014). Em 2017, *N. gonorrhoeae* foi incluída numa lista criada pela OMS de 12 patógenos cuja resistência aos antimicrobianos representa uma ameaça à saúde global e que exigem urgência no desenvolvimento de novos antimicrobianos devido ao surgimento de isolados multirresistentes (Tacconelli *et al.*, 2017).

Inicialmente, com a introdução dos primeiros antimicrobianos na clínica durante a década de 1930, *N. gonorrhoeae* era sensível a todas as classes de antimicrobianos disponíveis (Unemo *et al.*, 2019). No entanto, ao longo do tempo, o gonococo desenvolveu ou adquiriu a maior parte dos mecanismos de resistência conhecidos em bactérias como inativação enzimática de antimicrobianos, alteração do sítio de ligação, aumento da expressão de bombas de efluxo (superexpressão da bomba MtrCDE, por exemplo) e diminuição do influxo de fármacos através de porinas, alterando a permeabilidade das membranas (Christodoulides, 2019). Os principais mecanismos de resistência aos antimicrobiano podem ser visualizados no quadro 1.

Quadro 1- Evolução temporal dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos em *Neisseria gonorrhoeae*

Antimicrobiano	Período de efetividade ^a	Mecanismo de resistência
Sulfonamidas	1938-1942	SNPs no <i>folP</i> geraM redução da afinidade do fármaco às enzimas DHPS.
Betalactâmicos: penicilina	1944-1987	Betalactamases (TEM-1 e TEM-35); mutações no geneS <i>penA</i> , <i>ponA</i> , <i>mtrR</i> e <i>pilQ</i> .
Tetraciclina	~1962-1986	<i>tetM</i> , SNPs no gene <i>rpsJ</i> , redução da afinidade à subunidade 30S ribossomal (V57M).
Doxiciclina	~1967-1986	SNPs nos genes <i>mtrR</i> e <i>porB1B</i>
Espectinomicina	~1962-1986	16S rRNA SNP (C1192U) reduz a ligação do fármaco; mutações no <i>rpsE</i> .
Quinolonas	~1990-2007	QRDR mutações no <i>gyrA</i> e <i>parC</i> reduz a ligação do fármaco à DNA girase e topoisomerase IV; superexpressão da bomba de efluxo NorM.
Macrolídeos	~1990- atualidade	SNPs na subunidade 23S rRNA resultam num alvo 23S rRNA (alça peptidiltransferase do domínio V) com uma afinidade reduzida para o alvo ribossômico 50S; mutações nos genes <i>mtrR</i> , genes <i>erm</i> (que codificam as rRNA metilases) e superexpressão da bomba de efluxo MacAB ; bomba de efluxo <i>mef</i> .
Betalactâmicos: cefalosporinas de terceira geração	~1980- atualidade	<i>penA</i> tipo mosaico e alteração da PBP2; <i>penA</i> não mosaico; mosaico <i>mtr locus</i> ou mutações no <i>mtrR</i> ; <i>porB1b</i> SNPs; Fator "X" (fator de transformação desconhecido).

Legenda: ^aOs anos efetivos listados são relativos aos Estados Unidos. SNPs (*do inglês, single nucleotide polymorphism*) poliformismo de nucleotídeo único. QRDR (*do inglês, quinolone resistance-determining regions*) região determinante de resistência às quinolonas.

Fonte: adaptado de Rice (2017) e Unemo (2019).

2.7 RESISTÊNCIA À CEFTRIAXONA

Por se tratar da última alternativa para terapêutica empírica efetiva contra as infecções gonocócicas, a resistência à ceftriaxona deve ser investigada com muita atenção pelos programas de vigilância. O primeiro caso de um isolado gonocócico (H041) altamente resistente à ceftriaxona foi relatado no Japão em 2009, a partir de

uma coleta faríngea de uma profissional do sexo (Ohnishi *et al.*, 2011). Esse primeiro caso foi emblemático pois a paciente não apresentava sinais ou sintomas característicos e a coleta de amostra vaginal teve resultado negativo, ou seja, o primeiro relato descrito na literatura de um isolado resistente à ceftriaxona partiu de uma coleta extragenital de um indivíduo assintomático (Ohnishi *et al.*, 2011).

Durante os anos seguintes foram relatados diversos casos de isolados de *N. gonorrhoeae* resistentes à ceftriaxona na China, Austrália, Singapura, Canadá, Argentina e alguns países europeus (Unemo *et al.*, 2019). Este cenário indica uma difusão global de linhagens com alto nível de resistência às cefaloporinas de terceira geração (Golparian *et al.*, 2023). Um estudo observacional retrospectivo realizado entre 2017 e 2018 mostrou que, dos 68 países que participavam do programa global de vigilância da RAM em *N. gonorrhoeae*, 21 deles haviam reportado isolados com resistência à ceftriaxona. O estudo concluiu que houve uma diminuição de 21% e 22% de sensibilidade à ceftriaxona e à cefixima respectivamente nos países analisados (Unemo *et al.*, 2021).

No contexto brasileiro, não há relato de caso de gonococo resistente à ceftriaxona até o momento da elaboração deste trabalho. No entanto, ao longo dos últimos oito anos, desde a primeira rodada do projeto SenGono, foi observado um aumento do perfil de resistência de *N. gonorrhoeae* aos antimicrobianos. Na primeira rodada entre 2015 e 2016, o programa de vigilância já havia identificado elevado percentual de resistência (55,6%) dos isolados ao ciprofloxacino, fato este que modificou o protocolo de tratamento recomendado pelo MS (Bazzo *et al.*, 2018). Na segunda edição do projeto que ocorreu entre 2018 e 2020, foi observado aumento da resistência à azitromicina (10,6%) e alguns isolados apresentaram perfil de sensibilidade próximo ao ponto de corte de resistência (CIM>0,125mg/L, segundo o BrCAST) para a ceftriaxona (0,3%) e cefixima (4,6%) respectivamente (Machado *et al.*, 2022).

Além disso, nessa última edição do projeto SenGono, dos 663 isolados, 0,3% apresentaram resistência à cefixima. Apesar desse antimicrobiano não estar disponível no Brasil, este dado alerta para uma dinâmica que foi observada internacionalmente, na qual os primeiros casos de isolados resistentes às cefalosporinas de terceira geração foram relatados com o fármaco cefixima (Ohnishi

et al., 2010; Zhao *et al.*, 2009; Machado, *et al.*, 2022). Sendo assim, o cenário brasileiro já convive com o risco de isolados com potencial de adquirirem resistência à ceftriaxona, portanto, é crucial a prática do uso racional de antimicrobianos e do monitoramento constante do perfil de resistência das cepas circulantes no país (Brasil, 2023).

2.8 MECANISMO DE RESISTÊNCIA À CEFTRIAXONA

A ceftriaxona é um fármaco da classe dos betalactâmicos, do grupo das cefalosporinas de terceira geração e possui amplo espectro de ação contra bactérias aeróbias e anaeróbias gram-positivas e gram-negativas (Goodman, 2012). Seu mecanismo de ação consiste na inibição da reação de transpeptidação da síntese da parede celular. Os betalactâmicos são análogos estruturais do substrato D-Alanil-D-Alanina natural, dessa forma, o fármaco liga-se de modo covalente nas Proteínas Ligadoras de Penicilina (PBPs – do inglês, *Penicilin Binding Proteins*) (transpeptidases) inibindo a transpeptidação e, conseqüentemente, a síntese de peptidoglicano, provocando morte celular (Katzung, 2017).

Os mecanismos de resistência à ceftriaxona ainda não foram completamente elucidados, mas alguns trabalhos concluíram a partir do sequenciamento genômico dos isolados resistentes que os genes *mtrR*, *ponA* e *porB* apresentam uma correlação com o fenótipo resistente às cefalosporinas de terceira geração, porém estes genes isoladamente não são considerados fatores determinantes de resistência às cefalosporinas (Młynarczyk-Bonikowska *et al.*, 2020; Unemo *et al.*, 2019).

Apesar de seu mecanismo ainda não ter sido definido, há um consenso na literatura de que a resistência às cefalosporinas de terceira geração foi associada ao alelo tipo mosaico do gene *penA-60.001* (Golparian *et al.*, 2023). O gene *penA* codifica a transpeptidase PBP2 que é uma proteína de dois domínios composta por um domínio catalítico TPase e um domínio N-terminal de função desconhecida (Singh *et al.*, 2020). O mecanismo molecular de resistência sugerido consiste na formação de uma estrutura em mosaico da PBP2 codificada pelo gene *penA* modificado por recombinação homóloga com outras espécies do gênero *Neisseria*. O resultado dessa

recombinação seria a tradução de um PBP2 com menor afinidade à ceftriaxona (Ohnishi *et al.*, 2010).

Foram identificadas quatro PBPs em *N. gonorrhoeae*, sendo duas transpeptidases (TPase) de alto peso molecular (PBP1 de classe A e PBP2 de classe B) e duas de baixo peso molecular (PBP3 e PBP4). As duas últimas apresentam menores efeitos na manutenção do crescimento e morfologia celular, enquanto as PBPs 1 e 2 são essenciais para a viabilidade celular e são os alvos letais dos betalactâmicos (Powell *et al.*, 2009).

PBP2 reconhece e reage com o terminal d-Ala-d-Ala C da cadeia peptídica para formar um complexo acil-enzima com o penúltimo d-Ala, e então catalisa a transferência do peptídeo acilado para o grupo amino de meso-ácido diaminopimérico de uma fita peptídica adjacente para formar uma ligação cruzada de amida. Todos os antibióticos β -lactâmicos, incluindo ceftriaxona e cefixima, são imitadores do terminal C do peptídeo d-Ala-d-Ala e reagem com PBPs para formar um complexo acilado de longa vida que inibe a enzima e leva à perda da atividade da TPase necessária para síntese adequada de peptideoglicano (Singh *et al.*, 2020).

Nos isolados resistentes às cefalosporinas de terceira geração, a PBP2 apresenta mais de 60 modificações de aminoácidos em comparação com a PBP2 da cepa FA19 que é sensível à penicilina e às cefalosporinas. Essa variação surgiu através da recombinação homóloga com segmentos de DNA de *Neisseria spp.* comensais, portanto, foi a partir dessa recombinação que surgiram os alelos do gene *penA* tipo mosaico (Singh *et al.*, 2020). Historicamente, a nomenclatura utilizada para o gene *penA* tem sido atribuída ao perfil de substituição de aminoácidos da PBP2, sendo descrita em algarismos romanos de I a XXXVIII. Posteriormente, uma nova nomenclatura foi estabelecida em algarismos arábicos para diferenciar as mudanças de nucleotídeos que não geram alteração de aminoácidos (Demczuk *et al.*, 2017).

Atualmente, a tipagem molecular por NG-STAR (*do inglês, Neisseria gonorrhoeae Sequence Typing for Antimicrobial Resistance*) é considerada um método de classificação de sete genes bem caracterizados à RAM em *N. gonorrhoeae*, sendo eles o *penA*, *mtrR*, *ponA*, *gyrA*, *parC* e *23S rRNA*. O NG-STAR utiliza essa nomenclatura histórica baseada em aminoácidos como base para a nomenclatura dos alelos do *penA* e também permite identificar se é tipo mosaico ou

não mosaico. Quando é detectado um novo perfil de aminoácidos, é atribuído um número inteiro sequencial e, se for detectada uma sequência de DNA de um perfil de aminoácidos existente, é anexado um número decimal (Demczuk *et al.*, 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel do gene *penA* tipo mosaico e da proteína de ligação à penicilina 2 (PBP2) na resistência à ceftriaxona em *Neisseria gonorrhoeae*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a resistência à ceftriaxona em cepas transformantes de *Neisseria gonorrhoeae*;
- b) Identificar a presença de Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) no gene *penA* das cepas transformantes, de forma comparativa com o genoma das cepas antes da transformação.
- c) Avaliar *in silico* as possíveis alterações estruturais ou conformacionais na PBP2 e a influência dessas alterações na afinidade entre o sítio de ligação com o fármaco ceftriaxona.

4 METODOLOGIA

4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

Este estudo foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia, do Centro de Ciências da Saúde (LBMMS/CCS/UFSC) localizado no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC/EBSERH) em Florianópolis, Santa Catarina.

4.2 SELEÇÃO DAS CEPAS

As cepas utilizadas foram cedidas pelo Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS-UFSC). Foram selecionadas duas cepas de referência da OMS denominadas “WHO O” e “WHO X” sendo a primeira sensível e a segunda resistente à ceftriaxona (Unemo et al., 2016). A seleção foi baseada na CIM de cada cepa, pois essa diferença do perfil de resistência foi necessária para a execução do experimento de cocultivo e para a demonstração experimental da aquisição de um gene de resistência. A cepa WHO O não apresenta o gene *penA* tipo mosaico associado com a resistência à ceftriaxona, ao passo que a cepa WHO X é portadora desse gene.

Tabela 1- Concentração inibitória mínima para ceftriaxona e espectinomicina das cepas de referência.

CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)		
CEPA:	CRO (CIM)	SPT (CIM)
WHO O	0,032 mg/L	>1024 mg/L
WHO X	2 mg/L	16 mg/L

Legenda: CRO: Ceftriaxona; SPT: Espectinomicina. A espectinomicina foi utilizada para a técnica de cocultivo descrita no item 4.3 de métodos.

Fonte: Unemo et al., 2016.

4.3 TRANSFORMAÇÃO *IN VITRO* UTILIZANDO A TÉCNICA DE COCULTIVO

A partir de um estudo anteriormente descrito por Ohnishi et al. (2010), foi adaptado um protocolo experimental para transformação de cepas sensíveis à ceftriaxona em cepas resistentes por meio da técnica de cocultivo. Sendo assim, a cepa WHO X com resistência bem caracterizada à ceftriaxona foi cocultivada com uma cepa sensível à ceftriaxona (WHO O). O cocultivo foi realizado em três diferentes meios, sempre em triplicata para a reprodutibilidade dos resultados.

4.3.1 Preparo e seleção do meio líquido para cocultivo

Foi adaptada uma formulação de caldo GC a partir do meio GC ágar (Difco™, EUA). Dessa maneira, foi realizada uma diluição do meio GC ágar em água destilada estéril aquecida para a obtenção de um meio de aspecto líquido ou semissólido. Após o preparo do meio ágar GC, conforme as orientações do fabricante, foram realizadas duas diluições do meio ainda aquecido (antes de atingir a solidificação) em água destilada estéril aquecida. O meio foi enriquecido com 1% de Vitox® (Oxoid™, Inglaterra).

As diluições foram realizadas nas razões de 1:3 e 1:4, sendo 1 mL de ágar GC aquecido em 2 ou 3 mL de água destilada estéril aquecida, conforme a diluição correspondente. O conteúdo foi transferido em um tubo de vidro e foi homogeneizado em vórtex. Os tubos foram fechados com algodão hidrófilo. Mesmo após o resfriamento, devido à diluição dos componentes, o meio manteve aspecto macroscópico de um meio líquido para cultivo. As cepas foram repicadas nesses tubos contendo os meios líquidos e foi avaliado o crescimento em cada diluição após 24, 48 e 72 horas. Os tubos foram incubados em estufa com temperatura de 35 ± 1 °C e atmosfera úmida com 5% de CO₂. A avaliação do crescimento/viabilidade foi baseada na presença ou ausência e na intensidade da turvação do meio, parâmetro que indica se houve ou não crescimento bacteriano. Com base na avaliação do crescimento, foi selecionada a diluição mais adequada para ser utilizada no experimento. Essa etapa foi crucial para garantir a viabilidade das cepas neste meio adaptado considerando que *N. gonorrhoeae* é um organismo fastidioso. Além do caldo

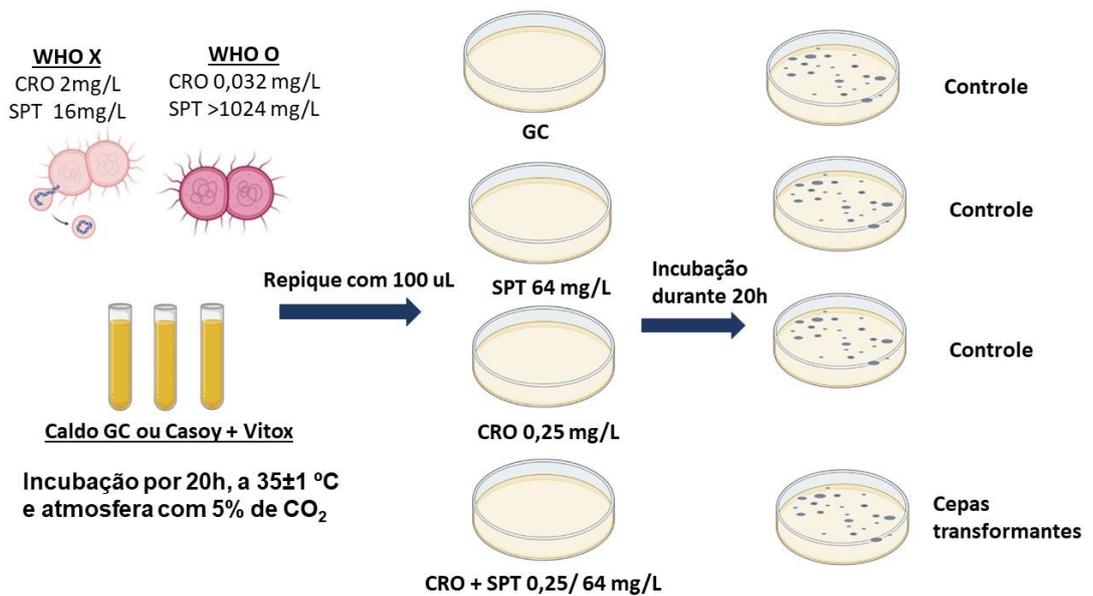
GC adaptado, foi avaliada a preservação de viabilidade nos caldos Mueller Hinton (Difco™, EUA) e Casoy (Difco™, EUA) enriquecidos com 1% de Vitox®. Os tubos foram incubados na mesma condição anterior e o crescimento foi avaliado nos mesmos tempos.

Além da turvação do meio, o crescimento também foi avaliado quantitativamente através de repique em placa contendo ágar GC. Um volume de 100 µL de cada diluição do meio de cultivo contendo as cepas foi transferido em duplicata para uma placa contendo somente ágar GC dividida em quatro quadrantes. O parâmetro de seleção foi a diluição que apresentou maior número de unidades formadoras de colônias na placa.

4.3.2 Transformação por cocultivo em meio líquido

Depois do descongelamento, as cepas foram recuperadas em ágar chocolate (Laborclin, Brasil). Após o crescimento, foi produzida uma suspensão das colônias de cada cepa em caldo Casoy (Difco™, EUA) e caldo GC adaptado (Difco™, EUA) enriquecidos com 1% de Vitox® (Oxoid™, Inglaterra). Com o auxílio de uma alça microbiológica, foi realizada uma turvação de 1,0 McFarland utilizando o densitômetro Densichek (BioMérieux, França). Em seguida, 2 mL de cada suspensão foi transferido para um tubo de vidro estéril resultando num volume final de 4 mL de caldo com as suspensões bacterianas homogeneizadas, conforme esquema ilustrado na Figura 2.

Figura 2- Experimento de transformação utilizando a técnica de cocultivo em meio líquido:



Legenda: Esquema ilustrando o delineamento experimental da técnica de cocultivo em meio líquido. CRO: ceftriaxona; SPT:espectinomicina.

Fonte: o autor, 2023.

As suspensões contendo as duas cepas foram incubadas de forma estática em caldo GC ou Casoy por 20 horas, em estufa com temperatura de 35±1 °C e atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após a incubação, 100 µL do caldo com a cocultura foi subcultivado em placas de meio GC sólido contendo uma concentração de 0,25 mg/L de ceftriaxona associada com 64 mg/L de espectinomicina. A incorporação de uma associação de antimicrobianos acima do ponto de corte de sensibilidade das cepas não permite o crescimento de ambas neste meio, tornando a placa um meio seletivo. Portanto, o crescimento só é possível se ocorrer a transferência de genes de resistência entre as duas cepas, com a formação de cepas transformantes.

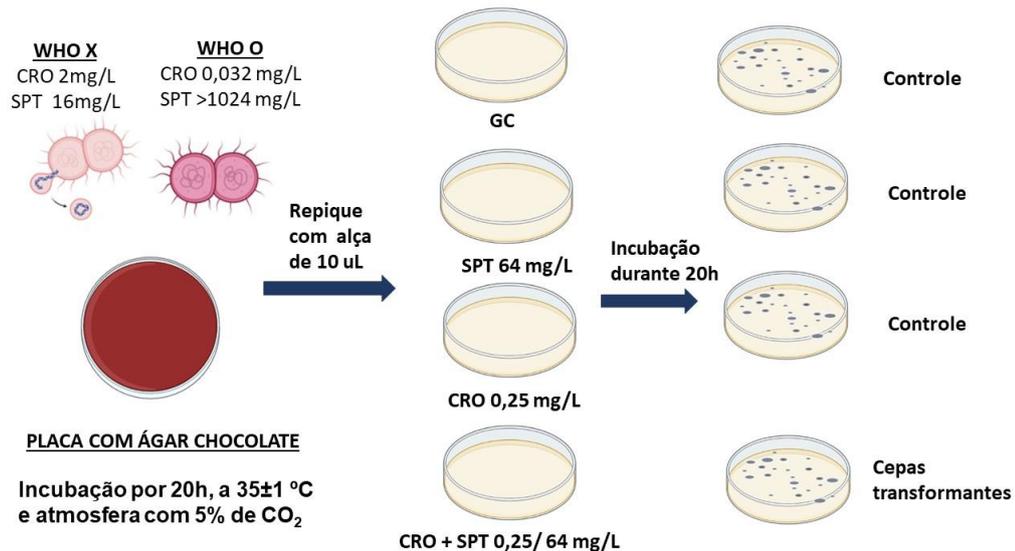
Além das placas com meio seletivo, a suspensão da cocultura foi repicada em placas controle contendo os antimicrobianos isoladamente e com ágar GC sem antimicrobiano para demonstração da viabilidade das cepas após o processo de incubação em caldo. Uma placa sem inóculo foi incubada para demonstrar esterilidade do meio produzido.

Os subcultivos foram repetidos todos os dias com intervalo de 20 horas entre cada cultivo. A transformação foi considerada completa quando foi observada estabilidade de crescimento na placa com a associação de antimicrobianos por meio de cultivo subsequente durante 7 dias. As cepas transformadas foram armazenadas em caldo Casoy com 20% de glicerol em ultrafreezer -80°C e as regiões dos genes *porB*, *tbpB* e *penA* foram sequenciadas.

4.3.3 Transformação por cocultivo em meio sólido

Depois do descongelamento, as cepas foram recuperadas e seu cultivo foi realizado em ágar chocolate (Laborclin, Brasil). Após a recuperação, com o auxílio de uma alça de $10\ \mu\text{L}$ foi realizado um repique de estriamento quantitativo de cada cepa (WHO O e WHO X) numa mesma placa contendo ágar chocolate, em triplicata. Em seguida, as placas foram incubadas por 20 horas em estufa com temperatura de $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ e atmosfera úmida com 5% de CO_2 (Figura 3).

Figura 3- Esquema sobre experimento de transformação por cocultivo em meio sólido.



Legenda: Ilustração do delineamento experimental da técnica de transformação por cocultivo em ágar chocolate. CRO: ceftriaxona; SPT: espectinomicina.

Fonte: o autor, 2023.

Após a incubação, foi possível observar crescimento abundante sobre toda a superfície da placa com colônias de aspecto piloso. Posteriormente, com o auxílio de

uma alça de 10 µL foi realizado o subcultivo dessas colônias em placas de meio GC sólido contendo uma concentração de 0,25 mg/L de ceftriaxona associada com 64 mg/L de espectinomicina. Duas placas com GC ágar sem antimicrobiano foram utilizadas para controle da viabilidade das cepas e outra como controle negativo para demonstração da esterilidade do meio produzido.

Os subcultivos foram repetidos todos os dias com intervalo de 20 horas entre cada cultivo. A transformação foi considerada completa quando foi observada estabilidade de crescimento na placa com a associação de antimicrobianos por meio de cultivo subsequente durante 7 dias. As cepas transformadas foram armazenadas em caldo Casoy com 20% de glicerol em ultrafreezer -80° C e os genes *porB*, *tbpB* e *penA* foram sequenciados.

4.4 TRANSFORMAÇÃO IN VITRO UTILIZANDO PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO PURIFICADOS

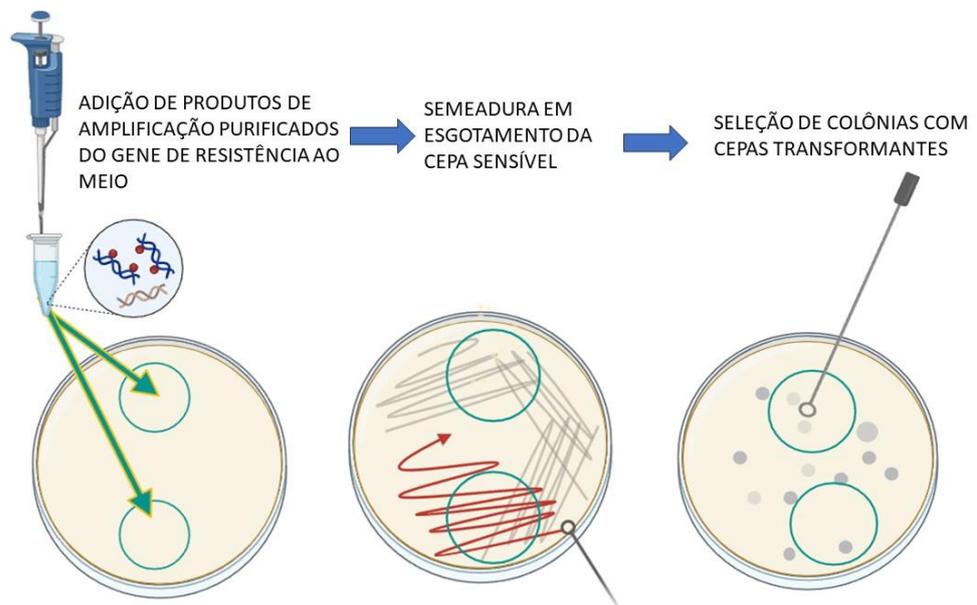
A partir de dois estudos anteriormente descritos (Ohnishi et al., 2011; Christodoulides, 2019), foi adaptado um protocolo experimental para transformação de cepas sensíveis à ceftriaxona em cepas resistentes por meio da técnica de transformação por cultivo com produtos de amplificação do gene *penA* tipo mosaico. Considerando que a cepa WHO X é portadora desse gene, foi realizada uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês Polymerase Chain Reaction) convencional para amplificação do gene *penA*, conforme descrito detalhadamente na seção 4.6 de métodos deste trabalho. Os produtos amplificados foram purificados por meio do *High Pure Product Purification Kit* (Roche®) conforme instruções do fabricante e quantificados pelo espectrofotômetro NanoVue Plus™ (General Electric®).

Em uma placa contendo GC ágar, foram delimitados quatro círculos com um diâmetro de aproximadamente 2 cm. Dentro de uma cabine de segurança biológica, com o auxílio de uma micropipeta, foram transferidos 40 µL do produto amplificado e purificado para o interior da área delimitada pelos círculos sobre o ágar GC. Este volume foi definido com base na faixa de recomendação para quantidade de DNA descrita na literatura que deve ser entre 100 e 1000 ng de DNA para cada círculo delimitado (Christodoulides, 2019). Em seguida, o líquido contendo o produto de PCR

foi espalhado por toda a superfície da área interna delimitada pelo círculo. Após a incorporação do líquido pelo ágar (secagem), foi realizada uma semeadura por esgotamento a partir de colônias da cepa WHO O. As placas foram incubadas por 20 horas em estufa com temperatura de 35 ± 1 °C e atmosfera úmida com 5% de CO₂.

Depois da incubação, foram selecionadas as colônias que apresentaram crescimento somente no interior dos círculos contendo o produto do gene *penA*. Com o auxílio de uma alça, as colônias selecionadas foram repicadas em nova placa de ágar GC contendo uma concentração de CRO de 0,5 mg/L (concentração 15 vezes superior à CIM da cepa WHO O). A transformação foi considerada completa quando foi observado crescimento estável na placa contendo CRO 0,25 mg/L por meio de repiques consecutivos durante 7 dias. O esquema experimental foi representado na figura 4.

Figura 4- Esquema do experimento de transformação em meio sólido utilizando produtos de amplificação purificados.



Legenda: representação ilustrativa das etapas do experimento de transformação utilizando produtos de PCR do gene *penA* tipo mosaico da cepa WHO X para transformação da cepa WHO O.
Fonte: o autor, 2023.

4.5 DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA POR ÁGAR DILUIÇÃO E FITA DE GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO

Posteriormente ao processo de transformação, foi realizada a determinação da CIM das cepas transformantes para os antimicrobianos ceftriaxona e espectinomicina por ágar diluição de acordo com o Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, 2019). Para o controle de qualidade do teste, foram utilizadas as cepas WHO F, WHO O, WHO X e WHO K (UNEMO *et al.*, 2016).

Para a determinação da CIM do ciprofloxacino, foi utilizado o método epsilométrico (Liofilchem®). Para validação do experimento de determinação da CIM das cepas transformantes foram utilizadas as cepas de referência WHO O e WHO X para comparação das CIMs.

4.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Para a identificação das cepas, obtenção de produtos amplificados e para o sequenciamento genômico, foram realizadas reações de PCR para amplificação dos genes *penA*, *porB* e *tbpB*.

4.6.1 Extração de DNA

A extração de DNA das cepas foi realizada pelo método de fervura. Em um tubo de 1,5 mL, foram adicionados 500 uL de Tampão Fosfato-Salino (PBS, do inglês Phosphate-Buffered Saline) estéril e com o auxílio de uma alça microbiológica, foi realizada a turvação do PBS a partir de colônias de cada cepa individualmente. Cada tubo foi vedado com plástico filme para evitar evaporação. Os tubos foram colocados em um termobloco na temperatura de 100 °C, durante 10 minutos. Após a fervura, os tubos foram centrifugados a 20.000 rcf durante 1 minuto e 200 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo de 1,5 mL estéril e livre de nucleases. O DNA foi armazenado em freezer -20° C.

4.6.2 PCR do gene *penA*, *porB* e *tbpB*

Com o DNA extraído, a PCR do gene *penA* foi realizada utilizando iniciadores descritos por Onishi e colaboradores (2011), sendo suas sequências descritas no Quadro 2.

Quadro 2- Iniciadores utilizados para amplificação do gene *penA*.

Iniciador	Sequência (5'-3')	Finalidade
<i>penA_F</i>	CGGGCAATACCTTTATGGTGGAAC	Amplificação do gene <i>penA</i>
<i>penA_R</i>	ACAACGGCGGGCGGGATATAAC	
<i>penA_SF1</i>	CAAAGATAGAAGCAGCCTG	Sequenciamento da região do gene <i>penA</i>
<i>penA_SF2</i>	GATATTGACGGCAAAGGTC	
<i>penA_SF3</i>	CTTTGGATGTGCGCGGC	
<i>penA_SR1</i>	GCCGTCGGTATATTCGC	
<i>penA_SR2</i>	CCAAAGGGGTAACTTGC	
<i>penA_SR3</i>	TTCTCAACAAACCTGCAG	
<i>penA_SR4</i>	CTTTGCCGTTTTGCGGGG	

Legenda: A amplificação ocorreu nas condições de 96°C por 2 minutos e 30 ciclos de 96°C por 10s, 65°C por 10s e 72°C por 2 minutos.

Fonte: adaptado de Onishi, et al., 2010.

Para a amplificação, foi preparado um master-mix contendo tampão 1X, MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,3 µM de cada iniciador, 1,25 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e 5 µL de DNA para um volume final de 25 µL. O termociclador foi configurado com a programação: 96°C por 2 minutos e 30 ciclos de 96°C por 10 segundos, 65°C por 10 segundos e 72°C por 2 minutos. Após a amplificação, os produtos foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose 2% (90V/ 50 minutos). Os amplicons foram corados com brometo de etídio e foram visualizados sob luz UV no transiluminador *ImageQuant™* LAS 500 (GE Healthcare Bio-Sciences AB®). Em seguida, os produtos de PCR foram quantificados utilizando o espectrofotômetro *NanoVue Plus™* (General Electric®).

Para a PCR dos genes *porB* e *tbpB*, foram utilizados os iniciadores descritos por Martin et al. (2004), sendo suas seqüências descritas no Quadro 3.

Quadro 3- Iniciadores utilizados para tipagem das cepas por NG-MAST

Iniciador	Seqüência (5'-3')	Tamanho (pb)	Finalidade:
<i>porB_F</i>	CAAGAAGACCTCGGCAA	737 pb	Amplificação e sequenciamento
<i>porB_R</i>	CCGACAACCACTTGGT		
<i>tbpB_F</i>	CAAGAAGACCTCGGCAA	589 pb	Amplificação e sequenciamento
<i>tbpB_R</i>	CCGACAACCACTTGGT		

Legenda: pb: pares de base. Iniciadores utilizados para a amplificação e sequenciamento dos genes *porB* e *tbpB* conforme descrito por Martin et al., 2004.

Para a amplificação do gene *porB*, foi preparado um master-mix contendo tampão 1X, 25 mM de MgCl₂, de cada dNTP 25mM, iniciador na concentração de 10 µM, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e 2 µL de DNA com volume final de 50 µL. O termociclador foi configurado para a programação: 95° C por 4 minutos, 25 de ciclos de 95° C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e, por fim, 72°C por 10 minutos. Para a amplificação do gene *tbpB*, foi preparado um master-mix contendo tampão 1X, MgCl₂ 25 mM, dNTP 25mM, iniciadores na concentração de 10 µM, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e 2 µL de DNA. O termociclador foi configurado para a programação: 95° C por 4 minutos, 25 de ciclos de 95° C por 30 segundos, 69°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e, por fim, 72°C por 10 minutos. Após a amplificação, os produtos foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose 2,0% (90V/ 50minutos). Os amplicons foram revelados com brometo de etídio e foram visualizados sob luz UV no transiluminador *ImageQuant*TM LAS 500 (GE Healthcare Bio-Sciences AB®). Em seguida, os produtos de PCR foram quantificados pelo espectrofotômetro *NanoVue Plus*TM (General Electric®).

4.7 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR

Os produtos de PCR dos genes *tbpB*, *porB* e *penA* foram purificados por meio do *High Pure Product Purification Kit* (Roche®) conforme instruções do fabricante e os produtos foram quantificados pelo espectrofotômetro NanoVuePlus™ (General Electric®). Após a purificação, os produtos de amplificação dos genes *penA*, *porB* e *tbpB* das amostras foram distribuídos numa placa de 96 poços identificada de acordo com os iniciadores correspondentes. Em cada poço foram adicionados entre 30 e 100 ng do produto purificado e 2,5 pmol de iniciador respectivo a cada gene. Em seguida, as amostras foram encaminhadas para sequenciamento pelo método de Sanger automatizado (Mohammadi, 2022; Sanger, 1975). O sequenciamento foi realizado pela empresa ACTGene Análises Moleculares LDTA (Rio Grande do Sul, Brasil) utilizando a plataforma ABI 3.500 (Applied Biosystems®).

A qualidade dos eletroferogramas foi avaliada com o programa Chromas versão 2.6.6 e as extremidades das leituras com baixa qualidade (qualidade Phred <20) foram removidas utilizando o mesmo programa. Após a remoção das sequências com baixa qualidade, foi realizada a montagem das leituras em sequências contíguas por meio do programa CAP3 (Huang, 1999). O CAP3 tem a capacidade de recortar regiões de leitura com baixa qualidade com base nos cálculos de sobreposição entre leituras, construção de alinhamentos de múltiplas sequências de leitura e geração de sequências consenso (Huang, 1999). Em seguida, as sequências consenso foram verificadas pelo algoritmo BLAST (*do inglês, Basic Local Alignment Search Tool*, NIH, EUA) para confirmação de similaridade das leituras sequenciadas com as sequências de referência dos respectivos genes depositadas no GenBank (NIH, EUA).

Devido ao tamanho do gene *penA* (1749 pb), foi julgado necessário realizar um novo sequenciamento desse gene utilizando a plataforma *Oxford Nanopore Technologies*® (ONT®) (Reino Unido) utilizando o sequenciador MinION Mk1B junto ao kit Rapid Barcoding Kit 96 (ONT®). Para o sequenciamento por nanoporos, foram selecionadas quatro cepas transformantes, sendo cada uma das cepas representativa de uma abordagem utilizada durante a etapa de transformação. Portanto, foram escolhidas as cepas T3 (cocultivo em ágar chocolate), T5 (cocultivo em caldo Casoy),

T7 (cocultivo em caldo GC) e T8 (cultivo com produto amplificado do gene *penA*) (Quadro 4).

As leituras brutas provindas do sequenciador MinION Mk1B foram limpas utilizando o programa Guppy v6.5.7 (ONT®), alinhadas com as sequências de referência do gene *penA* da WHO O (ID: SAMEA2448466) e WHO X (ID:SAMEA2448468) utilizando o programa minimap2 v2.15-r905(disponível em: <https://github.com/lh3/minimap2>). O arquivo de alinhamento foi organizado, indexado e utilizado para montar a sequência consenso utilizando o programa samtools v1.18 (disponível em: <https://github.com/samtools/samtools>). O alinhamento das leituras à sequência de referência pode ser verificado utilizando o programa IGV v2.16.2 (do inglês, *Integrative Genomic Viewer*) (disponível em: <https://igv.org/>) e as sequências consenso foram alinhadas às sequências de referência utilizando o programa MEGA X v11.0.13 (disponível em: <https://www.megasoftware.net/>).

4.8 GENOTIPAGEM POR NG-MAST

As sequências consenso obtidas pelo sequenciamento foram submetidas à plataforma PubMLST (disponível em: <https://pubmlst.org/>) para tipagem por NG-MAST das cepas transformantes e demonstração de similaridade genética com as cepas WHO O e WHO X.

4.9 ANÁLISE DE MUTAÇÕES DE NUCLEOTÍDEOS E SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDOS

Após a análise da qualidade pelo programa Chromas (versão 2.6.6, Technelysium Pty Ltda, Australia, 2018) e a geração de contigs pelo programa CAP3 (Huang, 1999), as sequências de nucleotídeos do gene *penA* das cepas transformantes foram alinhadas por meio do programa Mega (*do inglês, Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 11.0.13*). A presença de SNPs foi visualizada a partir do alinhamento das sequências consenso do gene *penA* das cepas transformantes com as sequências das cepas de referência WHO O e WHO X, utilizando o programa MEGA X v11.0.13. Para análise de substituição de aminoácidos,

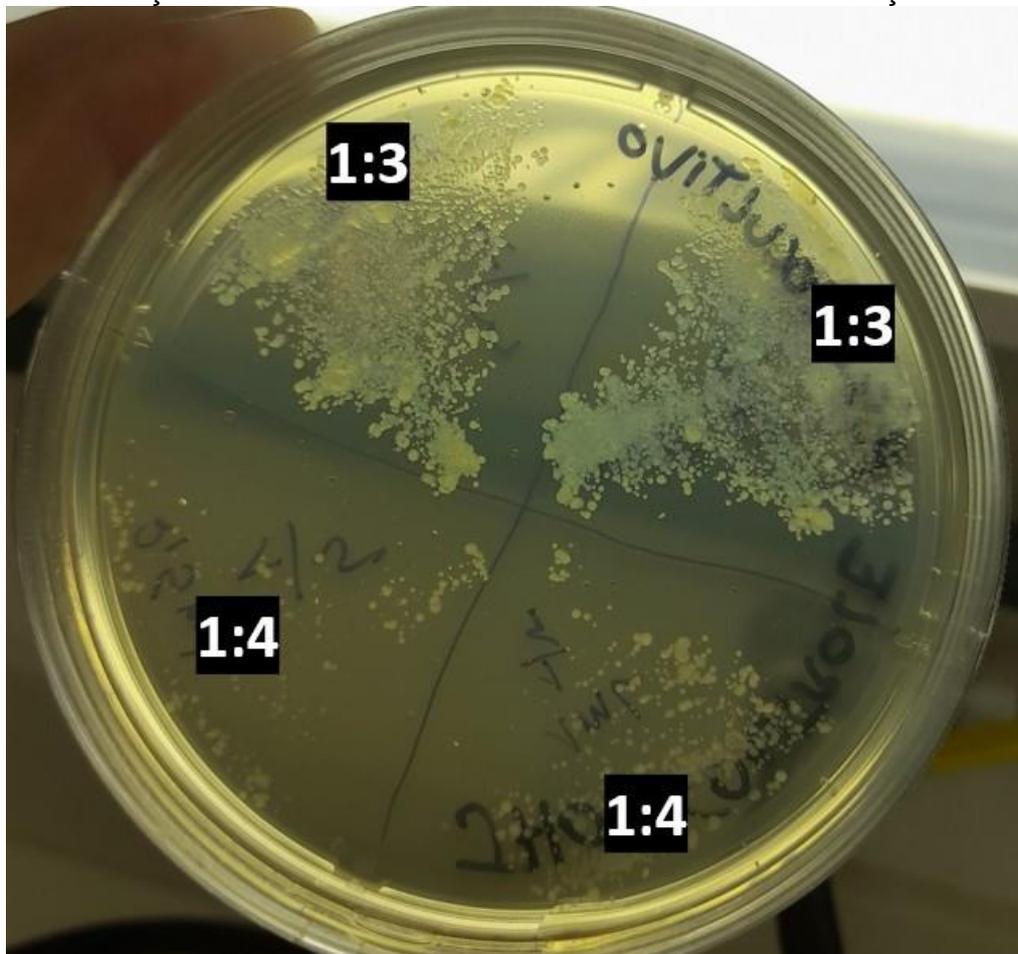
as sequências de nucleotídeos foram traduzidas utilizando o programa Expasy Translate Tool vX (disponível em: <https://web.expasy.org>) e comparadas com a sequência das cepas originais. Foram consideradas apenas as mutações com percentual de confiança $\geq 70\%$ e profundidade > 2000 .

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE EM MEIO LÍQUIDO

Após a diluição do meio, o caldo GC adaptado manteve aspecto líquido mesmo após o resfriamento. A diluição 1:3 foi selecionada para o experimento pois apresentou maior crescimento de unidades formadoras de colônias depois de 48 horas de incubação seguida de repique em placa contendo ágar GC, conforme observado na Figura 5. O maior crescimento implica maior probabilidade de ocorrer interações entre as células bacterianas e, portanto, pode facilitar a transformação de maneira espontânea.

Figura 5- Avaliação de crescimento do caldo GC em diferentes diluições

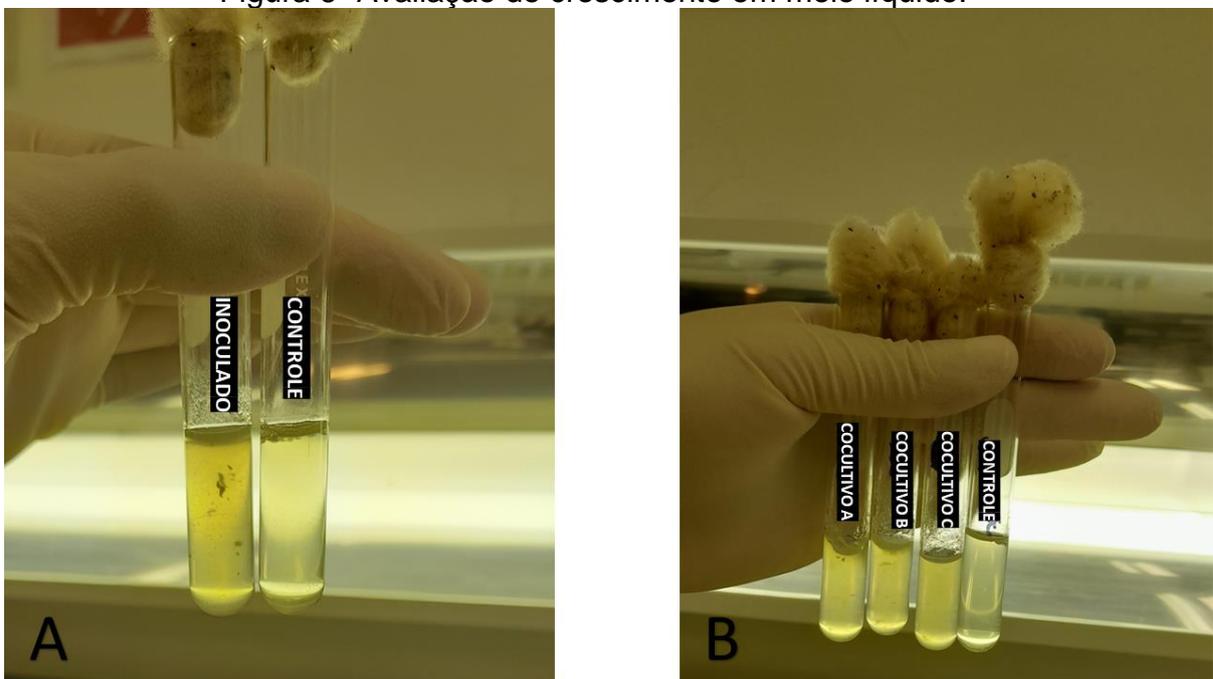


Legenda: Avaliação de crescimento em placa contendo ágar GC após 20 horas de incubação. Cada quadrante retrata o crescimento bacteriano de acordo com cada diluição do meio GC em água

destilada (em duplicata). O repique na placa advém do meio líquido (caldo GC) inoculado após incubação de 24 ou 48 horas, nas diluições descritas. Fonte: o autor, 2023.

No meio caldo Mueller Hinton, as cepas apresentaram crescimento escasso após 24 horas de incubação, sendo, portanto, inadequado para o experimento de cocultivo. Depois do repique e incubação, os meios caldo GC e Casoy permitiram crescimento por até 48 horas de incubação, apresentando aspecto turvo em relação aos tubos controles (sem inoculação) (Figura 6). Não foi observado crescimento após 48 horas em todos os meios, tendo como parâmetro a intensidade da turvação do meio líquido. Dessa maneira, foi estabelecido que a viabilidade de *N. gonorrhoeae* em meio líquido (caldo GC e Casoy) nessas condições citadas apresenta tempo limite de crescimento em até 48 horas de incubação.

Figura 6- Avaliação de crescimento em meio líquido.



Legenda: A) Avaliação de crescimento em caldo GC após incubação de 48 horas (tempo limite de crescimento observado). O tubo da esquerda contendo o inóculo apresenta turvação indicando crescimento de *N. gonorrhoeae*, o tubo da direita (controle sem inoculação) não apresenta turvação. B) Os 3 tubos da esquerda contêm o cocultivo das cepas em triplicata (Cocultivo A, B e C) em caldo GC após incubação de 20 horas. O tubo controle da direita não apresenta turvação.

Fonte: o autor, 2023.

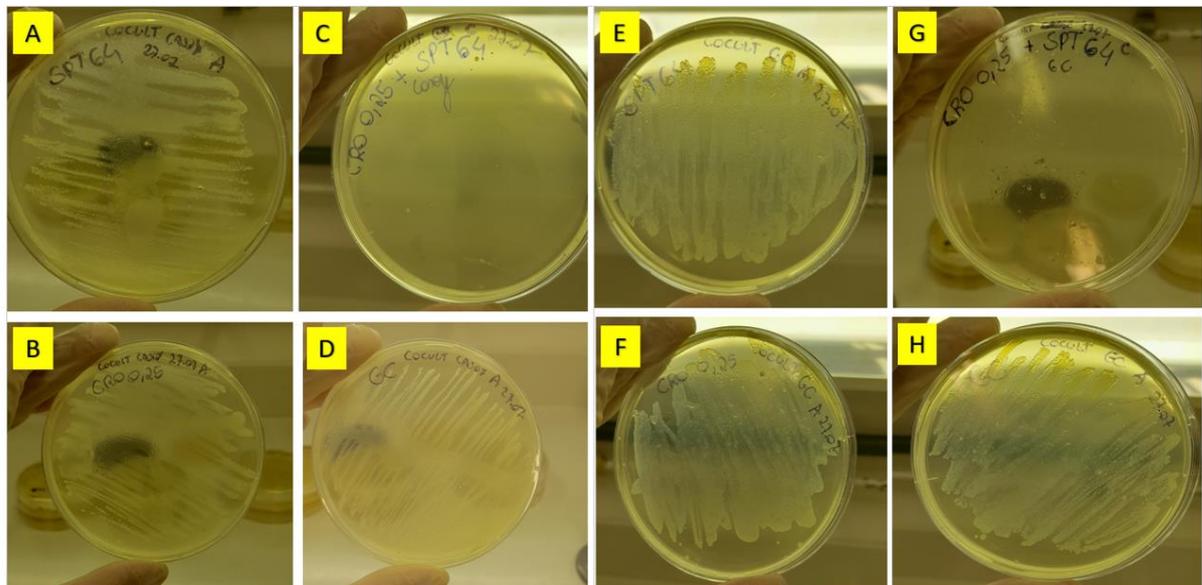
A comprovação da viabilidade evidencia que, apesar do crescimento fastidioso, as cepas mantiveram sua viabilidade em meio líquido durante a incubação. Foi observado crescimento de colônias características de *N. gonorrhoeae* em todas

as placas (com exceção do controle negativo) e a morfologia foi confirmada por coloração de Gram, onde foi possível observar diplococos gram-negativos.

5.2 AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO APÓS COCULTIVO EM MEIOS LÍQUIDOS E SÓLIDO:

Depois da incubação de 20 horas, as placas contendo os inóculos (oriundos dos diferentes meios de cocultivo) foram avaliadas diariamente onde foi observado o crescimento de colônias características de *N. gonorrhoeae* com confirmação de morfologia através de coloração de gram (Figura 7).

Figura 7- Avaliação do crescimento em placa após protocolo de cocultivo em meio líquido



Legenda: A) Placa contendo SPT 64 mg/L. B) Placa contendo CRO 0,5mg/L. C) Placa contendo CRO 0,5 mg/L + SPT 64 mg/L. D) Placa sem antimicrobiano. E) Placa contendo SPT 64 µg/mL. F) Placa contendo CRO 0,5 mg/L. G) Placa contendo CRO 0,5 mg/L + SPT 64 mg/L. H) Placa sem antimicrobiano. Avaliação de crescimento em placas após incubação de 20 horas. As placas A até D são oriundas do cocultivo em caldo Casoy. As placas E até H são oriundas do caldo GC.

Fonte: o autor, 2023.

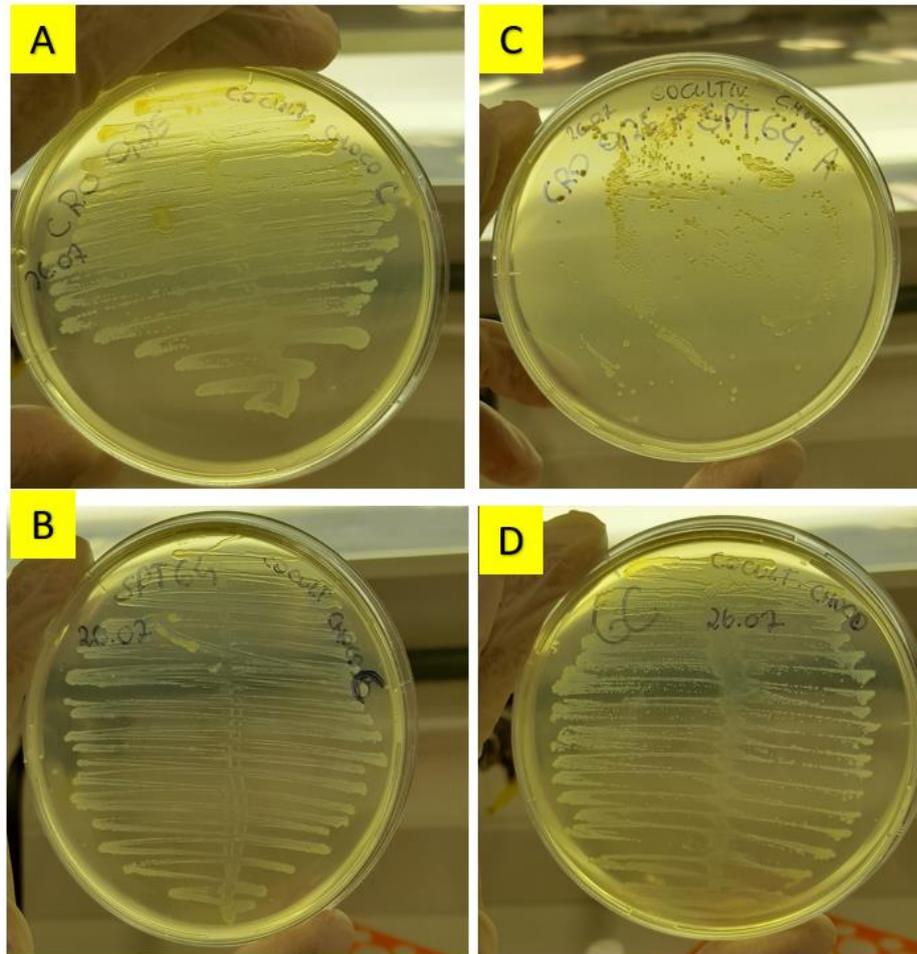
Nas placas oriundas do cocultivo em caldo Casoy, foi possível observar crescimento abundante em todas as placas controles. Na placa com o meio seletivo, houve crescimento de poucas colônias após 48 horas. Essas foram novamente repicadas em uma nova placa contendo a mesma associação de antimicrobianos. Após o repique, foi possível observar crescimento abundante durante sete dias de

repiques consecutivos. Os repiques foram sempre realizados em triplicata com idêntica reprodutibilidade de resultados.

Nas placas oriundas do cocultivo em caldo GC, foi possível observar crescimento abundante em todas as placas controles. Na placa com o meio seletivo, houve crescimento de poucas colônias após 20 horas em apenas uma das triplicatas. Essas colônias foram novamente repicadas em uma nova placa contendo a mesma associação de antimicrobianos. Após o repique, foi possível observar crescimento abundante durante sete dias de repiques consecutivos. Os repiques foram sempre realizados em triplicata, porém, neste caso, a transformação ocorreu apenas na triplicata C.

Nas placas oriundas do cocultivo em meio sólido, foi possível observar crescimento abundante em todas as placas controles e na placa contendo o meio seletivo. As colônias foram novamente repicadas em uma nova placa contendo a mesma associação de antimicrobianos. Após o repique, foi possível observar crescimento abundante durante sete dias de repiques consecutivos. Os repiques foram sempre realizados em triplicata com obtenção de resultados idênticos (Figura 8).

Figura 8- Avaliação do crescimento em placa após protocolo de cocultivo em meio sólido



Legenda: A) Placa contendo CRO 0,5 mg/L. B) Placa contendo SPT 64 mg/L. C) Placa contendo CRO 0,5 mg/L + SPT 64 mg/L. D) Placa sem antimicrobiano. Avaliação de crescimento em placas após incubação de 20 horas. As placas são oriundas do cocultivo em meio sólido ágar chocolate. Fonte: o autor, 2023

Portanto, foi possível obter cepas transformantes por meio da técnica de cocultivo em diferentes condições de meio (sólido e líquido) com resultados reprodutíveis. Somente o cocultivo com caldo GC não obteve reprodutibilidade dos resultados. Ainda assim, foi possível obter cepas transformantes a partir de uma das triplicatas testadas em caldo GC. No Quadro 4 pode-se observar a identificação das cepas transformantes utilizadas neste estudo.

Quadro 4- Identificação das cepas transformantes selecionadas para o estudo

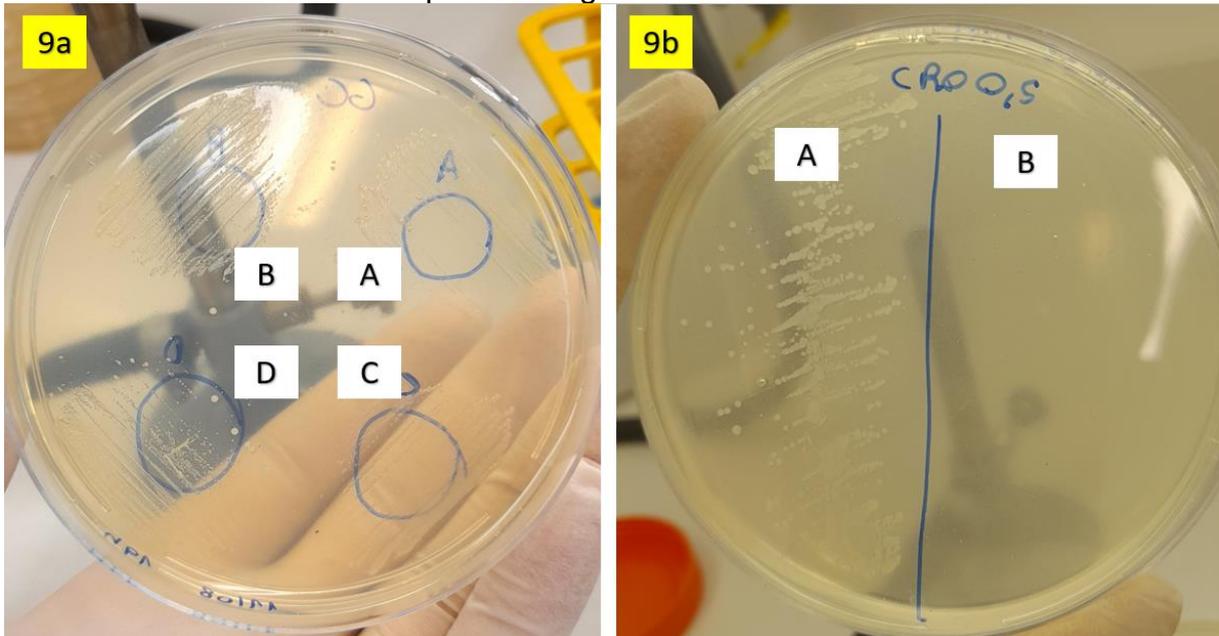
Identificação:	Origem da cepa transformante:
T1	Cocultivo WHO O + WHO X em ágar chocolate
T2	Cocultivo WHO O + WHO X em ágar chocolate
T3	Cocultivo WHO O + WHO X em ágar chocolate
T4	Cocultivo WHO O + WHO X em caldo Casoy
T5	Cocultivo WHO O + WHO X em caldo Casoy
T6	Cocultivo WHO O + WHO X em caldo Casoy
T7	Cocultivo WHO O + WHO X em caldo GC
T8	Cultivo WHO O + amplicons do gene <i>penA</i> da WHO X

Legenda: Cada abordagem experimental para transformação foi realizada em triplicata. Portanto, a partir de cada abordagem foram selecionadas três cepas transformantes para prosseguimento do estudo. Nas abordagens por cocultivo em caldo GC e cultivo com produto de PCR do gene *penA*, foi possível selecionar somente uma cepa transformante referente a triplicata que apresentou crescimento estável no meio seletivo. Fonte: o autor, 2023.

5.3 RESULTADOS DA TRANSFORMAÇÃO POR PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO PURIFICADOS

Conforme descrição em métodos, a cepa WHO O foi cultivada com produtos de PCR do gene *penA* da cepa WHO X. Após 20 horas de incubação foi possível observar crescimento de colônias nas áreas delimitadas pelos círculos contendo os amplicons incorporados ao meio ágar GC. Em seguida, com o auxílio de uma alça estéril, algumas colônias do interior dos quatro círculos (A, B, C e D) foram repicadas em uma nova placa contendo CRO 0,5 mg/L. Foi observado crescimento de colônias no meio seletivo apenas na placa oriunda do círculo A, conforme ilustrado na Figura 9.

Figura 9- Avaliação do crescimento em placa após protocolo de transformação com amplicons do gene de resistência



Legenda: 9a) Placa de ágar GC contendo quatro áreas delimitadas em círculos (A, B, C e D). No interior dos círculos foram colocados os produtos de PCR do gene *penA* da cepa WHO X. Na imagem é possível observar crescimento de colônias no interior dos círculos. Essas colônias foram selecionadas como cepas transformantes e, em seguida foram subcultivadas em nova placa contendo CRO 0,5 mg/L. B) Após incubação de 20 horas, foi possível observar crescimento apenas na área da placa relativa às colônias obtidas do círculo "a" da etapa anterior.

Fonte: o autor, 2023.

5.4 RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Conforme descrição em métodos, as cepas transformantes foram submetidas ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos por meio de ágar diluição e tira reagente. Foram testados os antimicrobianos ceftriaxona, espectinomicina e ciprofloxacino. Os resultados podem ser consultados na tabela abaixo:

Tabela 2- Resultados da determinação da CIM das cepas transformantes

CEPA	CRO (mg/L)	SPT (mg/L)	CIP (mg/L)
WHO O	0,032 (S)	>1024 (R)	0,008 (S)
WHO X	2 (R)	16 (S)	> 32 (R)
WHO F	0,002 (S)	16 (S)	0,004 (S)
WHO K	0,064 (S)	16 (S)	>32 (R)
T1	2 (R)	>1024 (R)	0,008 (S)
T2	2 (R)	>1024 (R)	0,008 (S)
T3	2 (R)	>1024 (R)	0,008 (S)
T4	1 (R)	>1024 (R)	0,008 (S)
T5	2 (R)	>1024 (R)	0,008 (S)
T6	2 (R)	>1024 (R)	0,008 (S)
T7	2 (R)	>1024 (R)	0,008 (S)
T8	2 (R)	>1024 (R)	0,008 (S)

Legenda: A classificação das cepas foi realizada utilizando os pontos de corte estabelecidos pelo BrCAST (2023). De acordo com a CIM, as cepas podem ser classificadas em sensíveis (S) ou (I) e resistentes (R). Foram utilizadas cepas WHO F e K para validação e controle de qualidade.

Fonte: o autor, 2023.

De acordo com os valores da tabela, foi observado que as cepas transformantes adquiriram um fenótipo resistente à ceftriaxona com CIM >0,25 mg/L (BrCAST, 2023). Ademais, as cepas transformantes mantiveram sensibilidade ao ciprofloxacino (CIM<0,06 mg/L) e alta resistência à espectinomicina (CIM >1024 m), duas características fenotípicas observadas na cepa WHO O (Unemo, 2016).

Diante dos resultados observados no perfil da CIM, é possível afirmar que nas cepas transformantes ocorreu a manutenção das características fenotípicas de RAM da cepa WHO O, no tocante aos fármacos ciprofloxacino e espectinomicina. No entanto, as cepas transformantes adquiriram fenótipo de alta resistência à ceftriaxona característico da WHO X, alcançando uma CIM 62 vezes superior ao valor inicial, antes da transformação, com exceção da cepa T4. Atribui-se que a aquisição desse novo fenótipo de resistência das cepas transformantes ocorreu devido à incorporação do gene *penA* tipo mosaico ao seu cromossomo.

A fundamentação desse fenômeno de aquisição do gene *penA* tipo mosaico pelas cepas transformantes pode ser explicada pela capacidade natural de transmissão de genes cromossômicos descrita no gênero *Neisseria* (Frye, 2013). A maioria das bactérias precisa adquirir um estado de competência para incorporar DNA exógeno através de transformação. As bactérias do gênero *Neisseria* são

constantemente competentes para realizar transformação devido a presença das sequências de captação de DNA (DUS, do inglês *DNA uptake sequences*). As DUS são compostas de 10 pb com a sequência 5'-GCCGTCTGAA-3' e atuam como um marcador de DNA específico exógeno permitindo a absorção de DNA em condições de pressão seletiva (Spencer-Smith, 2016; Młynarczyk-Bonikowska et al., 2020).

Existem 1965 cópias de DUS no cromossomo de 2,5 Mb do gonococo, ou seja, essas sequências ocorrem em média a cada 1966 pb (Hamilton et al., 2006). As DUS foram observadas a montante e a jusante da região do gene *penA*, portanto, a localização dessas sequências próximas ao gene *penA* poderia facilitar o reconhecimento e integração do alelo mosaico ao cromossomo das cepas transformantes. Diante disso, acredita-se que a interação entre cepas resistentes e cepas sensíveis na placa com a associação dos antimicrobianos estabeleceu um ambiente de pressão seletiva no qual as transformantes que realizaram efetivamente a recombinação do gene *penA* tipo mosaico adquiriram uma vantagem adaptativa que permitiu sua sobrevivência no meio com uma concentração de antimicrobiano superior ao tolerado por essas antes da transformação.

Porém, é importante ressaltar que as mutações adquiridas para expressar o fenótipo resistente propicia uma vantagem de sobrevivência durante a condição de pressão seletiva, entretanto, essas mutações podem ter desfechos deletérios em funções fisiológicas, atividades metabólicas, capacidade de colonização e virulência das cepas transformantes (Młynarczyk-Bonikowska et al., 2020). Portanto, as mutações podem apresentar vantagens e desvantagens evolutivas para a bactéria.

Sendo assim, a associação entre capacidade natural de transformação com a pressão seletiva exercida pelo meio resultou na obtenção de cepas transformantes que são geneticamente distintas das cepas que as originaram. A partir desse resultado, foi demonstrado experimentalmente que a transformação é um fenômeno adaptativo que garante novos mecanismos de resistência frente aos antimicrobianos em *N. gonorrhoeae*, principalmente em condições de pressão seletiva. É muito provável que essas modificações ocorreram em outras regiões do DNA cromossômico, principalmente nas abordagens de cocultivo visto que nesse protocolo ambas as cepas estão viáveis e podem interagir sem nenhum controle. Porém, devido às limitações de recursos, o sequenciamento total do genoma deverá ser realizado

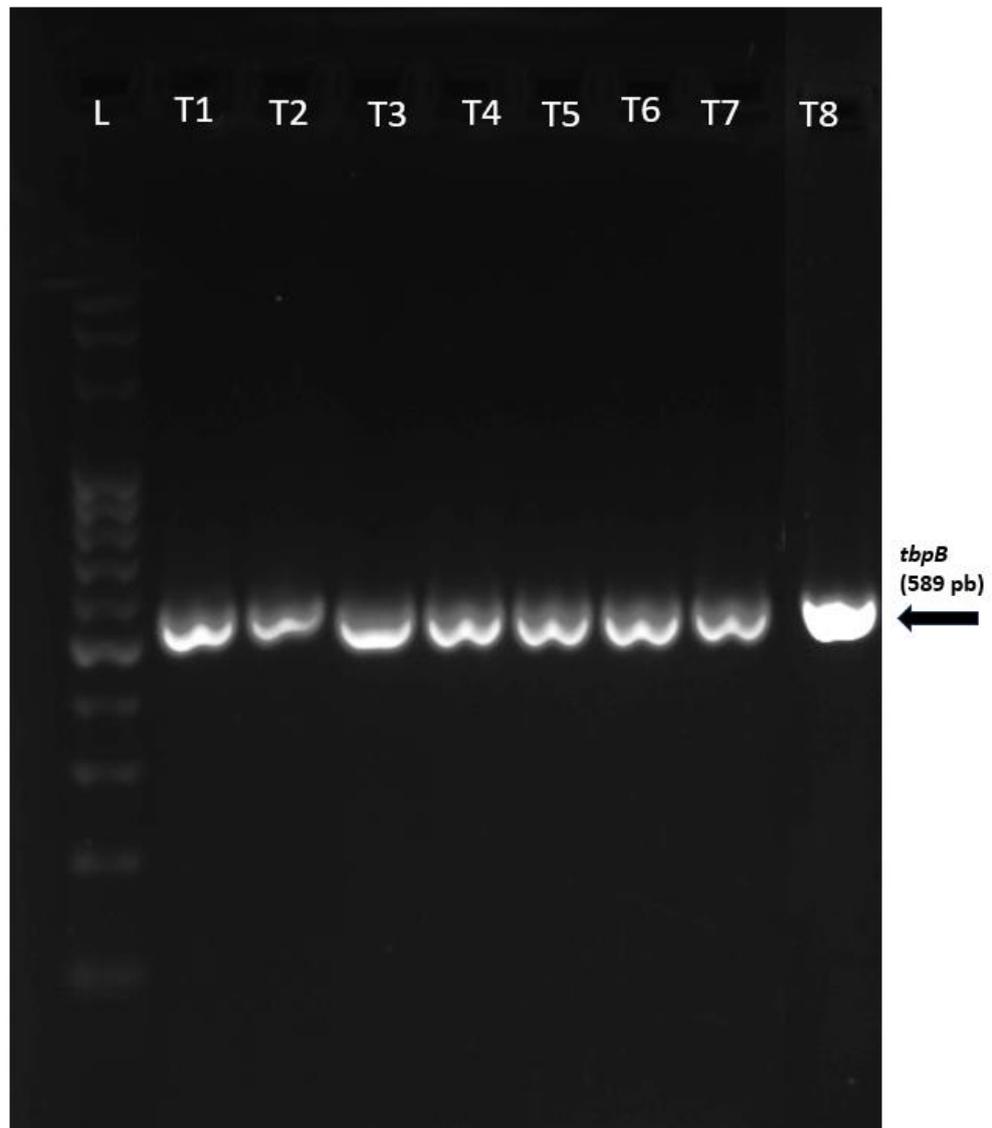
em trabalhos futuros para comparação de outros marcadores cromossômicos importantes na resistência à ceftriaxona como o *mtrR*, *porB* e *ponA*.

Na abordagem de cultivo da cepa sensível WHO O com o amplicon do gene *penA*, o processo de transformação é mais controlado visto que o cultivo é realizado apenas com o produto de amplificação do gene tipo mosaico da cepa WHO X, ou seja, nessa abordagem não havia interação com a cepa resistente viável. A interação ocorreu somente entre a cepa WHO O e o DNA exógeno incorporado ao meio de cultivo. Sendo assim, esse protocolo evidenciou que as cepas transformantes, ao adquirirem o alelo do gene *penA* tipo mosaico isoladamente, apresentaram um fenótipo de alta resistência à ceftriaxona conforme descrito anteriormente em outros trabalhos (Ohnishi, 2010; Ohnishi, 2011; Schörner, 2022).

5.5 PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE IDENTIFICAÇÃO

Conforme descrito em métodos, foram realizadas reações de PCR convencionais com revelação em gel de agarose 2% para avaliação da integridade e qualidade dos produtos de amplificação dos genes *porB*, *tbpB* e *penA* das cepas analisadas.

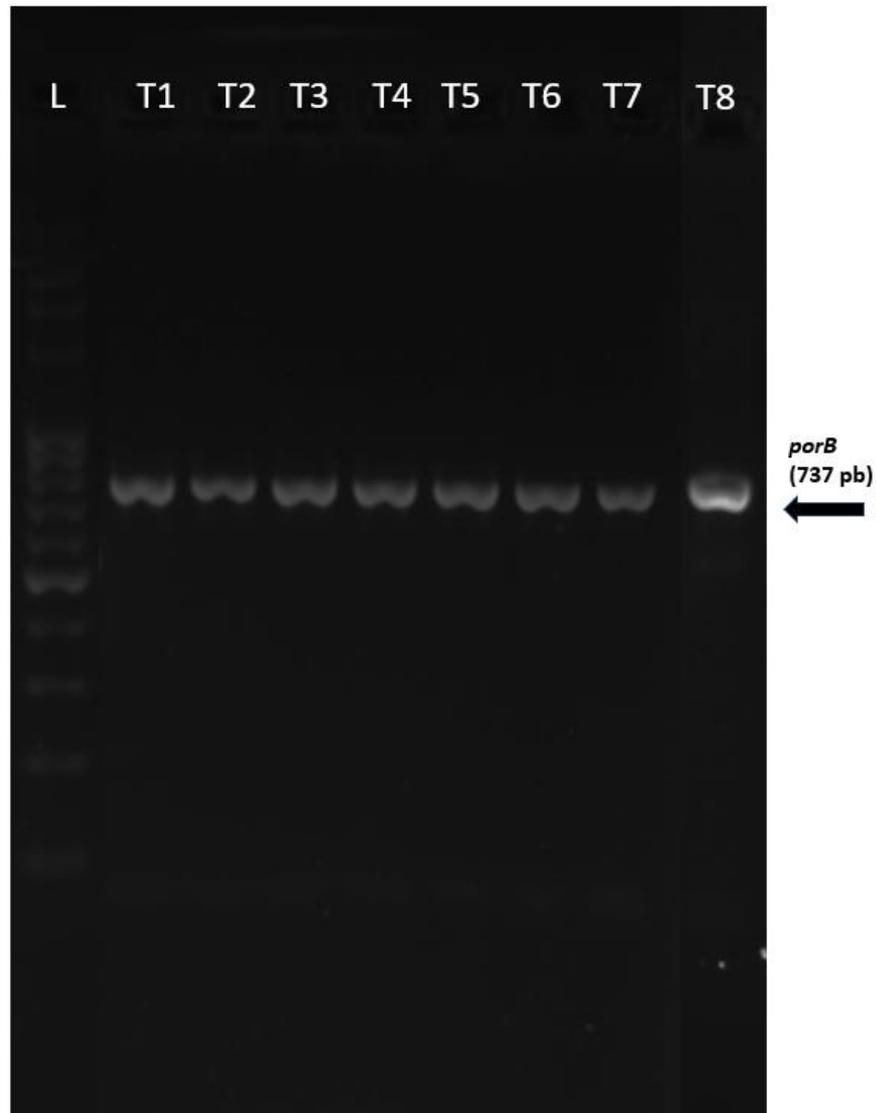
Figura 10- Gel de agarose 2% com produtos de amplificação do gene *tbpB*



Legenda: Bandas do produto de amplificação do gene *tbpB* marcadas com brometo de etídio e reveladas por transiluminador UV. Observa-se bandas na região esperada e de acordo com o tamanho do produto (589 pb). L: Ladder (padrão de tamanho molecular) de 100 pb.

Fonte: o autor, 2023.

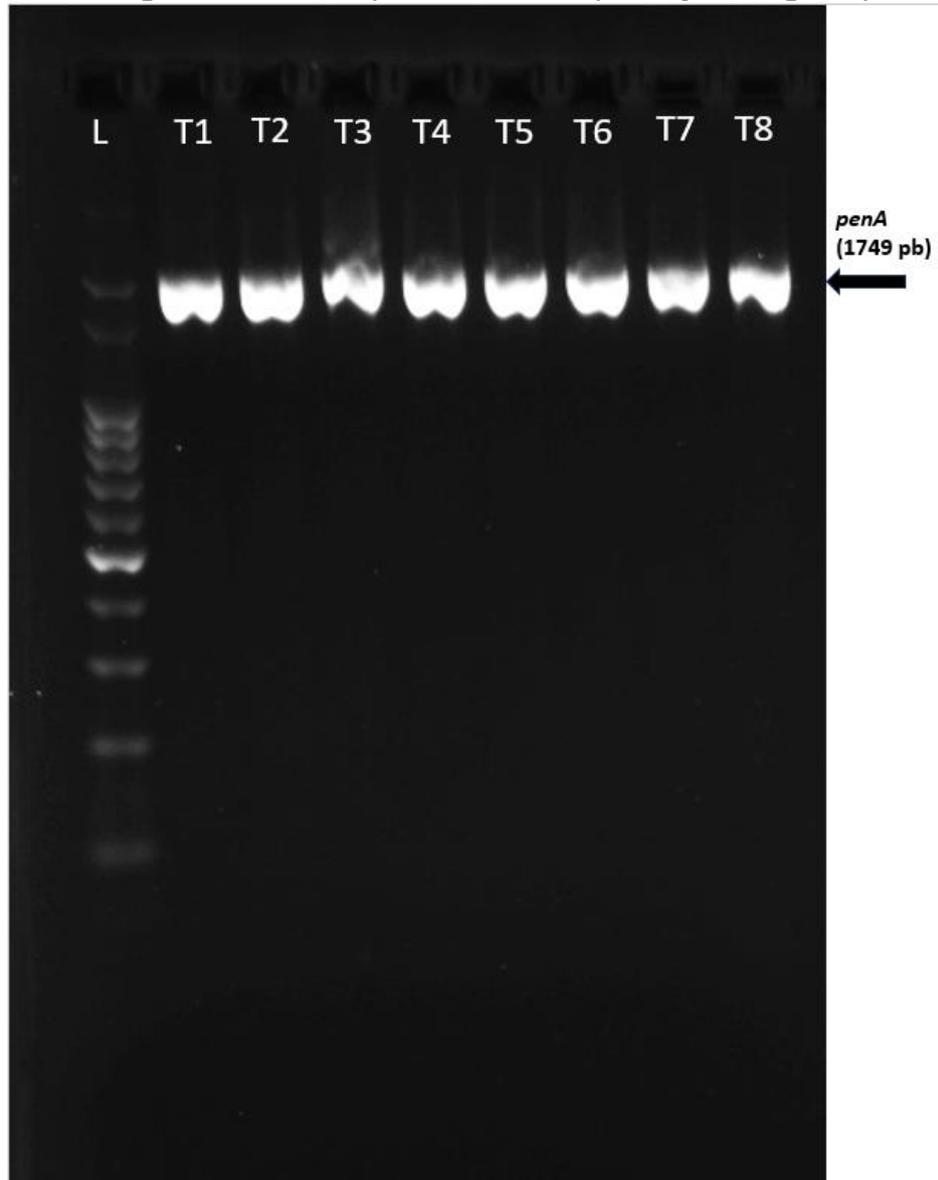
Figura 11- Gel de agarose 2% com produtos de amplificação do gene *porB*



Legenda: Bandas do produto de amplificação do gene *porB* marcadas com brometo de etídio e reveladas por transiluminador UV. Observa-se bandas na região esperada e de acordo com o tamanho do produto (737 pb). L: Ladder (padrão de tamanho molecular) de 100 pb. Fonte: o autor, 2023.

Conforme foi observado no gel, as bandas apresentam tamanho homogêneo com intensidade de fluorescência adequada, indicando a presença e integridade do produto de amplificação do gene analisado. Após a purificação, os produtos foram quantificados no espectrofotômetro NanoVue para determinação das concentrações de DNA que variaram entre 10,2 ng/ μ L e 46 ng/ μ L. Os resultados obtidos da razão A260/280 apresentaram valores entre 1,68 e 1,78 indicando boa qualidade de pureza do DNA.

Figura 12- Gel de agarose 2% com produtos de amplificação do gene *pena*



Legenda: Bandas do produto de amplificação do gene *penA* marcadas com brometo de etídio e reveladas por transiluminador UV. Observa-se bandas na região esperada e de acordo com o tamanho do produto (1749 pb). L: Ladder (padrão de tamanho molecular) de 100 pb.

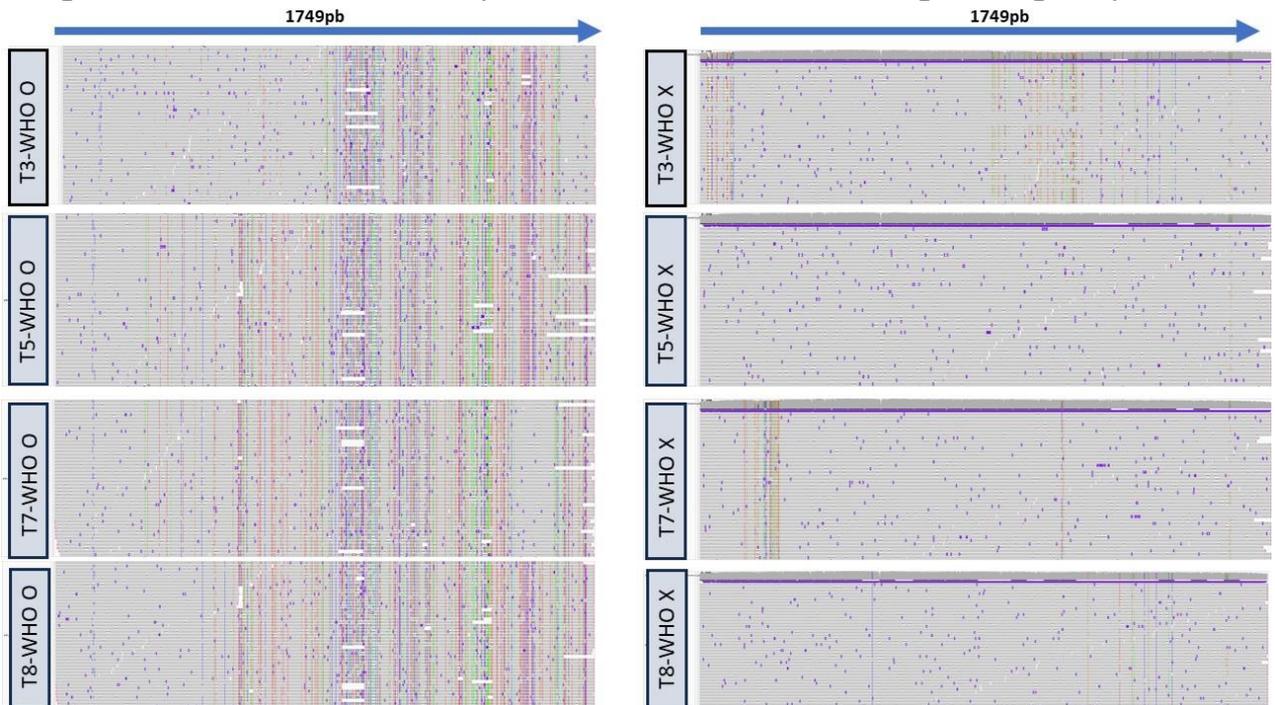
Fonte: o autor, 2023.

Conforme foi observado na figura 12, as bandas apresentam tamanho homogêneo com intensidade de fluorescência adequada, indicando a presença e integridade do produto de amplificação do gene analisado. Após a purificação, os produtos foram quantificados no espectrofotômetro NanoVue para determinação das concentrações de DNA que variaram entre 19 ng/μL e 78,5 ng/μL. Os resultados obtidos da razão A260/280 apresentaram valores entre 1,79 e 1,91 indicando alta qualidade de pureza do DNA.

5.6 MUTAÇÕES DE UM NUCLEOTÍDEO ÚNICO ENCONTRADAS NAS CEPAS TRANSFORMANTES

Após os resultados do sequenciamento, foi realizada a avaliação da qualidade e montagem dos contigs, conforme descrito em métodos. As sequências de nucleotídeos do gene *penA* das cepas transformantes foram alinhadas por meio dos programas Mega (do inglês, *Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 11.0.13*) e IGV (do inglês, *Integrative Genomics Viewer, version 2.16.2*). Durante o alinhamento, foram utilizadas as sequências da cepa de referência de *N. gonorrhoeae* WHO O (ID: SAMEA2448466) e WHO X (ID: SAMEA2448468) para comparação filogenética com as cepas transformantes obtidas experimentalmente.

Figura 13- Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da região do gene *penA*



Legenda: representação do alinhamento da seqüência de nucleotídeos do gene *penA* das cepas transformantes em comparação com as seqüências das cepas de referência WHO O e WHO X. À esquerda estão as seqüências das cepas transformantes T3, T5, T7 e T8 alinhadas com a WHO O. À direita estão as seqüências das cepas transformantes T3, T5, T7 e T8 alinhadas com a WHO X. O preenchimento na cor cinza indica regiões conservadas e as regiões coloridas indicam mutações de nucleotídeos. Imagem obtida pelo programa IGV.

Fonte: o autor, 2023.

Conforme pode ser observado na imagem dos alinhamentos, observa-se que as cepas transformantes alinhadas com a seqüência da cepa WHO O apresentam maior variabilidade de nucleotídeos. A variabilidade está representada pelas linhas coloridas presentes principalmente a partir da posição da base 300. Por outro lado, o alinhamento da direita (entre transformantes e WHO X) apresenta poucas regiões com variação de nucleotídeos, indicando semelhança de identidade em termos de composição de nucleotídeos do gene *penA*. Sendo assim, é possível afirmar que a seqüência da região do gene *penA* das cepas transformantes é quase idêntica à região do gene *penA* da cepa WHO X. Portanto, o sequenciamento permitiu confirmar a aquisição do gene de resistência pela cepa WHO O durante o processo de transformação.

Esse dado é concordante com as informações da literatura, visto que, em trabalhos anteriores, foi observado que na região 5' proximal (entre 1 e 293 nucleotídeos) do gene *penA* de isolados de *N. gonorrhoeae* com diferentes perfis de

resistência, não apresentava variabilidade significativa na composição de nucleotídeos. No entanto, nas regiões entre 300 a 1749 nucleotídeos, ocorre maior variabilidade, principalmente quando se comparam as sequências de isolados resistentes em relação aos isolados sensíveis às cefalosporinas. Ademais, foi observado que essa região variável pode ser conservada e difundida por expansão clonal, favorecendo a dispersão de isolados resistentes (Ohnishi, 2010; Tomberg, 2013; Kubanova, 2014; Nakayama, 2016; Singh, 2019; Shalaby, 2020).

A hipótese para explicar a maior variabilidade de nucleotídeos nas regiões distais da sequência do gene *penA* pode ser justificada devido ao domínio de ligação da PBP2 com a ceftriaxona. Os aminoácidos críticos para a interação com o fármaco no sítio-ativo da PBP2 estão localizados principalmente nos resíduos Ser310, Ile312, Val316, Thr483 (Powell et al., 2009a; Singh et al., 2020; Tomberg et al., 2013, 2010). Portanto, essas modificações de nucleotídeos em regiões específicas podem resultar na alteração do código de leitura dos códons durante a tradução, resultando na expressão de uma PBP2 alterada, com modificações na composição de aminoácidos que podem alterar a afinidade da ceftriaxona com o sítio-ativo (Ohnishi, 2010; Singh, 2020; Fenton, 2021; Krivitskaya, 2022).

Partindo do resultado anterior que demonstrou a aquisição do gene *penA* tipo mosaico pelas cepas transformantes, foi realizada a análise dos SNPs. As sequências do gene *penA* das cepas transformantes foram alinhadas com a sequência do gene *penA* da cepa WHO X. Os polimorfismos de nucleotídeo único encontrados foram anotados e podem ser observados na tabela a seguir:

Tabela 3- Polimorfismos de nucleotídeo único do gene *penA* das cepas transformantes

Nº	Mutação	Confiança (%)	Profundidade	Cepa
1	T534C	92%	2753	T8
2	A1198G	93%	2578	T8
3	C1294T	83%	2535	T8
4	A1333G	88%	2576	T8
5	G1339A	91%	2347	T8
6	T1372C	86%	2585	T8
7	A1384G	80%	2553	T8
8	A1408C	90%	2594	T8
9	C1447A	82%	2516	T8
10	T1456C	93%	2456	T8
11	C139T	94%	2831	T7
12	A145G	82%	2720	T7
13	C169G	87%	2152	T7
14	A172G	81%	2537	T7
15	G196A	78%	2500	T7
16	A199C	76%	2793	T7
17	G202A	78%	2504	T7
18	G203C	79%	2702	T7
19	A205G	84%	2664	T7
20	A216T	90%	2589	T7
21	A217G	92%	2369	T7
22	G220C	91%	2605	T7
23	G223A	89%	2686	T7
24	A226G	90%	2728	T7
25	A229G	94%	2709	T7
26	G232A	92%	2749	T7
27	A235G	82%	2729	T7
28	A240G	83%	2794	T7
29	C241T	81%	2801	T7
30	A244G	92%	2567	T7
31	T1108C	75%	2604	T7
32	C1110G	86%	2822	T7
33	A1114G	90%	2704	T7
34	A1621G	70%	3054	T5
35	A1629G	75%	2881	T5
36	C895A	73%	3773	T3
37	A914G	75%	3765	T3
38	T919G	73%	3753	T3
39	A937G	72%	3404	T3
40	A994G	74%	3776	T3
41	A1009G	71%	3747	T3
42	A1014G	70%	3763	T3
43	A1042G	76%	3413	T3
44	G1066T	72%	3550	T3
45	T1123A	75%	3052	T3
46	G1126A	71%	3388	T3
47	A1135G	76%	3331	T3
48	A1152G	73%	3474	T3
49	A1153G	76%	3509	T3
50	C1232T	71%	3525	T3
51	A1333G	70%	3629	T3
52	G1339A	71%	3414	T3
53	C1372C	86%	3720	T3
54	A1384G	71%	3658	T3
55	A1408C	73%	3718	T3
56	T1456C	74%	3607	T3

Legenda: Mutações de nucleotídeos observadas no gene *penA* das cepas transformantes em relação à sequência do gene *penA* da cepa de referência WHO X. A primeira letra indica a base na sequência de referência (WHO X), o número indica a posição da base e a segunda letra indica a nova base

incorporada. A confiabilidade do sequenciamento é representada pelo percentual de frequência com que um determinado nucleotídeo em uma posição específica foi lido durante o processo de sequenciamento por nanopore. Por outro lado, a profundidade refere-se ao número de vezes que essa base foi lida durante o sequenciamento. Fonte: o autor, 2023.

5.7 CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDOS NA PBP2

A partir das leituras dos nucleotídeos obtidas pelo sequenciamento da região do gene *penA*, conforme descrito em métodos, foi obtida a sequência da composição preditiva de aminoácidos da PBP2 das cepas transformantes utilizando o programa Mega (*do inglês, Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 11.0.13*). O alinhamento das sequências de aminoácidos com a sequência das cepas de referência também foi realizado no mesmo programa. Conforme descrito na tabela abaixo, foi observado que as cepas transformantes adquiriram as mutações de aminoácidos já descritas na cepa WHO X e WHO O, enfatizando que, durante o experimento de transformação ocorreu uma incorporação de regiões do gene *penA* tipo mosaico, fato este que pode justificar o aumento da CIM das cepas transformantes.

Tabela 4- Caracterização das substituições de aminoácidos na PBP2.

Nº	Mutação	T3	T5	T7	T8	WHO X
1	Y201H	X	S	S	S	S
2	G202A	X	S	S	S	S
3	E203G	X	S	S	S	S
4	Q214E	X	S	S	S	S
5	E274K	S				
6	I275S	S				
7	L276S	S				
8	L278W	S				
9	A279V	X	S	S	S	S
10	N280I	S				
11	T281R	S				
12	A283P	S				
13	D285E	X	S	S	S	S
14	N287T	S				
15	R288K		S	S	S	S
16	R288N	S				
17	G290V	S				
18	R291Q		S	S	S	S
19	A292Q	S				
20	D293T	S				
21	E295N	S				
22	R296G	S				
23	R298V	S				
24	N299T	S				
25	R300A	S				
26	A301P	S				
27	A311V	*	S	S	S	S
28	I312M	*	S	S	S	S
29	V316P	*	S	S	S	S
30	A323S	*	S	S	S	
31	L328T	*	S	S	S	S
32	N239T	*	S	S	S	S
33	E330D	*	S	S	S	S
34	R331T	*	S	S	S	S
35	L332F	*	S	S	S	S
36	Q335L	*	S	S	S	S
37	S342A	*	S	S	S	S
38	P343T	*	S	S	S	S
39	R345Q	*	S	S	S	S
40	D347T	*	S	S	S	S
41	T348H	*	S	S	S	S
42	H349V	*	S	S	S	S
43	V350Y	*	S	S	S	S
44	Y351P	*	S	S	S	S
45	P352T	*	S	S	S	S
46	S353L	*	S	S	S	S
47	L354D	*	S	S	S	S
48	D355V	*	S	S	S	S
49	V356R	*	S	S	S	S
50	R357G	*	S	S	S	S
51	G358I	*	S	S	S	S

Tabela 4. Caracterização das substituições de aminoácidos PBP2.

Nº	Mutação	T3	T5	T7	T8	WHO X
52	I359M	*	S	S	S	S
53	M360Q	*	S	S	S	S
54	Q361K	*	S	S	S	S
55	K362S	*	S	S	S	S
56	S364N	*	S	S	S	S
57	N365V	*	S	S	S	S
58	V366G	*	S	S	S	S
59	G367T	*	S	S	S	S
60	T368S	*	S	S	S	S
61	S369K	*	S	S	S	S
62	K370L	*	S	S	S	S
63	L371S	*	S	S	S	S
64	S372A	*	S	S	S	S
65	A373M	*	S	S	S	S
66	R374F	*	S	S	S	S
67	F375T	*	S	S	S	S
68	G376P	*	S	S	S	S
69	A377K	*	S	S	S	S
70	E379M	*	S	S	S	S
71	M380Y	*	S	S	S	S
72	Y381D	*	S	S	S	S
73	D382F	*	S	S	S	S
74	F383Y	*	S	S	S	S
75	Y384H	*	S	S	S	S
76	H385D	*	S	S	S	S
77	E386L	*	S	S	S	S
78	L387G	*	S	S	S	S
79	G388V	*	S	S	S	S
80	I389G	*	S	S	S	S
81	G390V	*	S	S	S	S
82	V391R	*	S	S	S	S
83	R392M	*	S	S	S	S
84	M393H	*	S	S	S	S
85	H394S	*	S	S	S	S
86	S395G	*	S	S	S	S
87	G396F	*	S	S	S	S
88	F397P	*	S	S	S	S
89	P398G	*	S	S	S	S
90	G399K	*	S	S	S	S
91	E400A	*	S	S	S	S
92	T401R	*	S	S	S	S
93	G403C	*	S	S	S	S
94	L404C	*	S	S	S	S
95	L405V	*	S	S	S	S
96	R406I	*	S	S	S	S
97	N407G	*	S	S	S	S
98	W408G	*	S	S	S	S
99	R409N	*	S	S	S	S
100	R410G	*	S	S	S	S
101	W411G	*	S	S	S	S
102	R412L	*	S	S	S	S

Tabela 4. Caracterização das substituições de aminoácidos na PBP2.

Nº	Mutação	T3	T5	T7	T8	WHO X
103	P413S	*	S	S	S	
104	I414N	*	S	S	S	
105	E415R	*	S	S	S	
106	Q416R	*	S	S	S	
107	A417R	*	S	S	S	
108	T418C	*	S	S	S	
109	M419L	*	S	S	S	
110	F421V	*	S	S	S	
111	G422M	*	S	S	S	
112	Y423A	*	S	S	S	
113	G424C	*	S	S	S	
114	L425N	*	S	S	S	
115	T483S	*	S	*	S	
116	T486I	*	S	*	S	
117	N512Y	*	S	*	S	
118	G517A	*	S	*	S	
119	G545S	*	S	*	S	

Legenda: T3, T5, T7 e T8: cepas transformantes. WHO X: cepa resistente de referência. S: presença da substituição. *: indica gap da sequência de aminoácidos durante o alinhamento. X: indica resultado indeterminado. Foram observadas 114 substituições de aminoácidos na PBP2 das cepas transformantes tendo como parâmetro de referência a sequência aminoacídica da cepa WHO O. Mutações: a primeira letra em maiúsculo indica o aminoácido presente na sequência da cepa WHO O, o número indica a posição da substituição na sequência e a segunda letra indica o novo aminoácido sintetizado na cadeia peptídica. As substituições próximas ao sítio-ativo da ceftriaxona estão em negrito.

Fonte: Unemo, 2016; o autor, 2023.

Foram observadas 119 substituições de aminoácidos na PBP2 das cepas transformantes em comparação com a sequência de referência da cepa WHO O. É possível notar a presença de mutações críticas que foram descritas e associadas na literatura com o fenótipo resistente às cefalosporinas de terceira geração (Krivitskaya; Khrenova, 2022; Kubanova et al., 2014; Powell et al., 2009; Singh et al., 2020; Tomberg et al., 2013, 2010). Devido à baixa qualidade do sequenciamento da cepa T3, essa apresentou um gap durante o alinhamento, limitando a análise das substituições. Ademais, a partir do perfil de substituições de aminoácidos é possível afirmar maior similaridade das mutações das cepas transformantes com a cepa WHO X, contribuindo para a hipótese de incorporação do gene *penA* tipo mosaico.

Segundo a Tabela 4, observa-se a aquisição das mutações da cepa WHO X que são consideradas críticas para o desenvolvimento do fenótipo resistente à ceftriaxona, sendo elas A311V, I312M, V316P e T483S. Este resultado corrobora com

as hipóteses descritas em estudos anteriores de identificação dos aminoácidos na composição da PBP2 que foram associados com a resistência às cefalosporinas de terceira geração (Nakayama *et al.*, 2016; Ohnishi *et al.*, 2010). A proximidade das mutações A311V, I312M, V316P com o sítio ativo nucleófilo que forma o complexo acil-enzima próximo ao resíduo Ser310 pode afetar a afinidade de ligação da ceftriaxona à PBP2 (Krivitskaya, 2022). O resíduo Ser310 é um aminoácido chave no sítio-ativo pois atua como nucleófilo que reage com substratos peptídicos e com os antibióticos betalactâmicos para formar o complexo acil-enzima (Singh *et al.*, 2019). Os resíduos Ala311 e Val316 estão presentes na mesma hélice $\alpha 2$ que contém o nucleófilo Ser310, portanto, mudanças no empacotamento hidrofóbico de $\alpha 2$ devido a mutações de aminoácidos alteram a dinâmica de formação do estado de transição e levar a diminuição da taxa de acilação (Singh *et al.*, 2019).

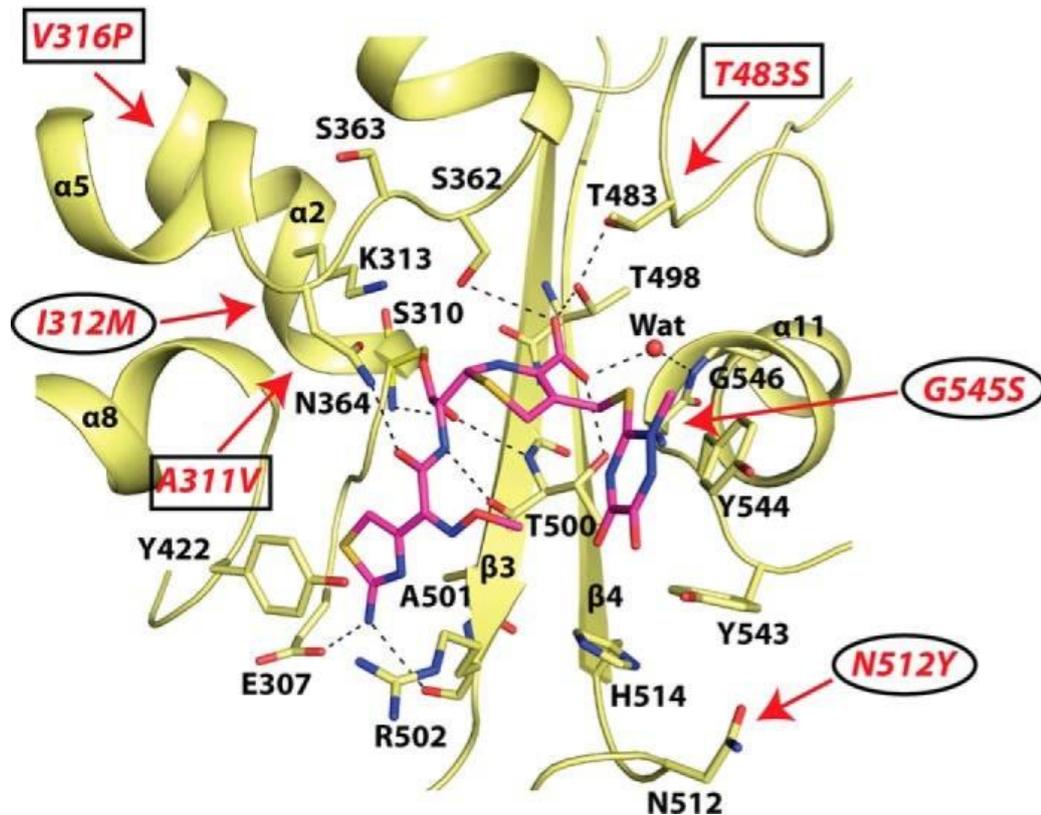
O mecanismo de ação da ceftriaxona ocorre em três etapas, sendo primeiro o ataque nucleofílico da Ser310, depois a clivagem da ligação C-N do anel betalactâmico e eliminação do grupo de saída da ceftriaxona (Krivitskaya, 2022). A primeira etapa envolve a transferência de prótons do átomo de oxigênio da cadeia lateral do resíduo Ser310 para o grupo amino da cadeia lateral do resíduo Lys313, resultando na formação de uma ligação covalente entre a carbonila da ceftriaxona e o átomo de oxigênio da cadeia lateral de Ser310. Após, ocorre a clivagem do anel betalactâmico seguida da clivagem da ligação covalente entre o grupo de saída da ceftriaxona, o anel C3 dioxo-triazina (Krivitskaya, 2022; Singh, 2019).

Nas cepas resistentes, as duas últimas etapas ocorrem simultaneamente. A conformação das alças $\beta 3$ e $\beta 4$ facilitam a estabilização do substrato, nas cepas resistentes ocorre uma conformação desfavorável das alças $\beta 3$ e $\beta 4$ (Krivitskaya, 2022; Singh *et al.*, 2019; Tomberg *et al.*, 2010). A mutação G545S dificulta a rotação da cadeia $\beta 3$ necessária para formar uma cavidade oxianion para a acilação. A rotação prejudicada é justificada com base na inserção de uma hidroxila que forma uma ligação de hidrogênio com a hidroxila do resíduo Thr498. A perda da flexibilidade da cadeia $\beta 3$ aumenta o custo energético necessário para a formação do estado de transição (Singh *et al.*, 2019).

O sítio de ligação dos betalactâmicos na PBP2 ocorre nas regiões entre 240 e 581aa. As modificações de aminoácidos anteriores ao resíduo 300 não apresentam

efeito sobre a CIM, ainda que essa seja uma região com maior conservação entre as cepas sensíveis e resistentes (Tomberg et al.,2013). As mutações críticas podem ser observadas na figura 14.

Figura 14- Mutações críticas em PBP2 para resistência às cefalosporinas



Legenda: Estrutura da PBP2 acilada pela ceftriaxona em amarelo. A ceftriaxona é mostrada com ligações roxas e as potenciais ligações de hidrogênio são indicadas por linhas tracejadas. As mutações críticas estão destacadas em fonte vermelha.

Fonte: Adaptado de Singh et al., 2019.

As mutações A311V, I312M, V316P, T483S são ausentes na WHO O, presentes na WHO X e foram encontradas nas cepas transformantes (Unemo, 2016). A mutação P551S que é presente na WHO O e ausente na WHO X não foi observada nas cepas transformantes (Unemo, 2016). Esse dado corrobora com a hipótese de aquisição do gene *penA* da WHO X pelas cepas transformantes durante a transformação.

Outra mutação crítica da WHO X que foi observada nas cepas transformantes foi a T483S. A perda do grupo metil da Thr483 apresenta impacto no aumento da

energia de ativação para a formação do estado de transição, levando assim a uma diminuição da taxa de acilação (Krivitskaya, 2022). Sendo assim, conclui-se que o conjunto de mutações presentes no gene *penA* tipo mosaico adquirido pelas cepas transformantes resulta na modificação do sítio-ativo da ceftriaxona em PBP2, processo que ocasiona menor afinidade do fármaco à enzima e, portanto, permite a expressão do fenótipo resistente à ceftriaxona pelas cepas transformantes.

5.8 TIPAGEM GENOTÍPICA POR NG-MAST

O gene *porB* codifica a porina PIB e o *tbpB* codifica a subunidade da proteína de ligação à transferrina. Esses genes são polimórficos e variáveis, permitindo a discriminação filogenética de isolados do gonococo. A partir dos resultados do sequenciamento dos genes *tbpB* e *porB*, foi possível tipificar as cepas transformantes pelo método NG-MAST. As sequências foram comparadas no banco de dados PubMLST onde foi gerado o ST correspondente às cepas transformantes:

Quadro 5- Tipagem genotípica por NG-MAST

CEPA	NG-MAST ST
WHO O	ST 495
WHO X	ST 4220
T1	ST 495
T2	ST 495
T3	ST 495
T4	ST 495
T5	ST 495
T6	ST 495
T7	ST 495
T8	ST 495

Legenda: determinação de tipagem das cepas transformantes pelo método NG-MAST ST. A partir dos dados do sequenciamento dos genes *porB* e *tbpB*, esses genes foram comparados com as sequências depositadas no banco de dados da plataforma PubMLST para identificação do ST (*do inglês, sequence type*) relativo a estes perfis alélicos.

Fonte: o autor, 2023.

O quadro acima mostra que as cepas transformantes apresentam o mesmo ST da cepa WHO O, ou seja, esse resultado torna mais robusta a demonstração de que

ocorreu a transformação de cepas WHO O em cepas transformantes com perfil de resistência às cefalosporinas adquirido da cepa WHO X por meio do processo de transformação.

5.9 IDENTIFICAÇÃO ALÉLICA DO GENE DE RESISTÊNCIA

As sequências do gene *penA* das cepas transformantes foram comparadas com as sequências depositadas no banco de dados PubMLST para identificação de correspondência do perfil alélico. O quadro abaixo mostra o resultado da identificação dos alelos e o percentual de identidade obtido:

Quadro 6- Identificação alélica do gene *penA* das cepas transformantes

Cepa	Alelo <i>penA</i>	Percentual de identidade
WHO O	21 (12.001) não mosaico	100 %
WHO X	545 (37.001) tipo mosaico	100%
T3	-	-
T5	545 (37.001) tipo mosaico	99%
T7	545 (37.001) tipo mosaico	98%
T8	545 (37.001) tipo mosaico	99%

Legenda: a partir dos dados do sequenciamento do gene *penA*, foram geradas as sequências aminoácidas das cepas T3, T5, T7 e T8. As sequências foram comparadas com o banco de dados do PubMLST por meio do *locus penA* (NEIS1753). O resultado expresso define o tipo de alelo com base na similaridade da composição aminoácida ou de nucleotídeos. O percentual de identidade indica o grau de semelhança com a sequência de referência do alelo depositada no banco de dados.

Fonte: o autor, 2023.

A cepa T3 apresentou um resultado de perfil alélico distinto, porém, esta diferença pode ser justificada pela qualidade do sequenciamento que, apesar da profundidade adequada, não apresentou o mesmo tamanho de cobertura que as outras cepas. Os gaps de sequenciamento devido à falta de cobertura ou erros durante a fase de leitura podem gerar artefatos ou limitações do alinhamento com as sequências de referência. Por essa razão o resultado da cepa T3 foi prejudicado.

Com base na comparação da identidade dos alelos, foi possível observar que o perfil alélico das cepas transformantes é quase idêntico ao perfil do gene *penA* tipo mosaico da cepa WHO X. A tipagem alélica é concordante com os outros resultados obtidos, confirmando que a cepa WHO O adquiriu o gene *penA* tipo mosaico da WHO X, tornando as cepas transformantes resistentes à ceftriaxona.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados alcançados neste trabalho foi possível demonstrar experimentalmente que o fenômeno da transformação em *Neisseria gonorrhoeae* é uma adaptação evolutiva importante para a aquisição de novos mecanismos de resistência aos antimicrobianos. Além disso, ao longo do estudo foi possível evidenciar que o gene *penA* tipo mosaico é um marcador relevante para o monitoramento epidemiológico e genômico da resistência do gonococo à classe das cefalosporinas de terceira geração. Ademais, conclui-se que os protocolos de transformação genética desenvolvidos neste trabalho são aplicáveis como ferramentas importantes para o estudo de genes associados com a resistência à ceftriaxona e outros antimicrobianos em *N. gonorrhoeae*.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Considerando que origem do gene *penA* tipo mosaico advém da interação entre o gonococo com outras espécies do gênero *Neisseria*, mostra-se necessário novos trabalhos que busquem investigar a contribuição dessas interações interespecíficas entre *Neisseria gonorrhoeae* e bactérias comensais, principalmente em sítios extragenitais como a orofaringe. Dessa maneira, para a compreensão exata dos fenômenos de transmissão da infecção e aquisição de resistência aos antimicrobianos em *N. gonorrhoeae*, é fundamental compreender essas relações interespecíficas em sítios extragenitais.

Como perspectivas para trabalhos posteriores, pretende-se realizar a investigação do efeito da pressão seletiva sobre o perfil de mutações da PBP2 por meio dos protocolos de indução. Novos estudos serão fundamentais para determinar os efeitos físico-químicos dessas mutações na afinidade do complexo fármaco-enzima através de parâmetros como a taxa de acilação da ceftriaxona com a PBP2, análise estrutural *in silico* e por cristalografia da proteína PBP2.

REFERÊNCIAS

- ATTRAM, N. *et al.* Antimicrobial resistance (AMR) and molecular characterization of *Neisseria gonorrhoeae* in Ghana, 2012-2015. **PloS one**, v. 14, n. 10, 1 out. 2019.
- BAARDA, B. I.; SIKORA, A. E. Proteomics of *Neisseria gonorrhoeae*: The treasure hunt for countermeasures against an old disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. OCT, p. 167278, 26 out. 2015.
- BAZZO, M. L. *et al.* First nationwide antimicrobial susceptibility surveillance for *Neisseria gonorrhoeae* in Brazil, 2015–16. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 7, p. 1854–1861, 1 jul. 2018.
- BISWAS, G. D.; BURNSTEIN, K. L.; SPARLING, P. F. Linearization of donor DNA during plasmid transformation in *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Bacteriology**, v. 168, n. 2, p. 756–761, 1986.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Diagnóstico laboratorial de doenças sexualmente transmissíveis, incluindo o vírus da imunodeficiência humana**. Brasília. 2013.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **NOTA INFORMATIVA Nº 6-SEI/2017-COVIG/CGVP/ DIAHV/SVS/MS**, 2017. Disponível em: <http://sei.saude.gov.br/sei/controlador_externo.php? >. Acesso em: 01 junho. 2023
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **ATENÇÃO INTEGRAL ÀS PESSOAS COM INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS (IST) PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS**. Brasília, 2022.
- BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **PORTARIA Nº 1.553, DE 17 DE JUNHO DE 2020**. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2020/prt1553_18_06_2020.html>. Acesso em: 3 maio. 2023.
- CDC, CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Recommendations for the Laboratory-Based Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 63, n. 2, 2014.
- CHANG, S. X. *et al.* Cross-sectional study of asymptomatic *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infections in sexually transmitted disease related clinics in Shenzhen, China. **PloS one**, v. 15, n. 6, 1 jun. 2020.

- CHAUSSEE, M. S.; HILL, S. A. Formation of single-stranded DNA during DNA transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 19, p. 5117–5122, 1998.
- CHOW, E. P. F.; FAIRLEY, C. K. The role of saliva in gonorrhoea and chlamydia transmission to extragenital sites among men who have sex with men: new insights into transmission. **Journal of the International AIDS Society**, v. 22 Suppl 6, n. Suppl Suppl 6, 2019.
- CHRISTODOULIDES, M. ***Neisseria gonorrhoeae: Methods and Protocols***. Springer, 2023. Disponível em: <<http://www.springer.com/series/7651>>. Acesso em: 07.junho.2023
- CLARKE, J. *et al.* Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. **Nature Nanotechnology 2009 4:4**, v. 4, n. 4, p. 265–270, 22 fev. 2009.
- 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, 1 out. 2017.
- CROSSLEY, B. M. *et al.* Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 32, n. 6, p. 767, 1 nov. 2020.
- DEMCZUK, W. *et al.* *Neisseria gonorrhoeae* Sequence Typing for Antimicrobial Resistance, a Novel Antimicrobial Resistance Multilocus Typing Scheme for Tracking Global Dissemination of *N. gonorrhoeae* Strains. **Journal of clinical microbiology**, v. 55, n. 5, p. 1454–1468, 1 maio 2017.
- DILLARD, J. P. Genetic Manipulation of *Neisseria gonorrhoeae*. **Current protocols in microbiology**, v. 0 4, n. SUPPL.23, p. Unit4A.2, nov. 2011.
- DONÀ, V. *et al.* Recent advances in the development and use of molecular tests to predict antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 17, n. 9, p. 845–859, 2 set. 2017.
- DUFFIN, P. M.; SEIFERT, H. S. Genetic transformation of *Neisseria gonorrhoeae* shows a strand preference. **FEMS Microbiology Letters**, v. 334, n. 1, p. 44–48, 1 set. 2012.

ESPINOSA MIRANDA, A. *et al.* Políticas públicas em infecções sexualmente transmissíveis no Brasil. **Artigo de opinião Epidemiol. Serv. Saude**, n. 1, 2021.

EUCAST, EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. **EUCAST Breakpoint Tables**. 2023.

FEDAROVICH, A. *et al.* Structural Effect of the Asp345a Insertion in Penicillin-Binding Protein 2 from Penicillin-Resistant Strains of *Neisseria gonorrhoeae*. **Biochemistry**, v. 53, n. 48, p. 7596, 12 dez. 2014.

FENTON, B. A. *et al.* Mutations in PBP2 from ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* alter the dynamics of the β 3– β 4 loop to favor a low-affinity drug-binding state. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 297, n. 4, p. 101188, 1 out. 2021.

FINKEL, S. E.; KOLTER, R. DNA as a Nutrient: Novel Role for Bacterial Competence Gene Homologs. **Program in Molecular Biology**, v. 183, p. 6288–6293, 2001.

FRYE, S. A. *et al.* Dialects of the DNA Uptake Sequence in Neisseriaceae. **PLOS Genetics**, v. 9, n. 4, p. e1003458, abr. 2013.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections**, 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240027077>>. Acesso em: 27 set. 2023.

GOLPARIAN, D. *et al.* Multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolate SE690: mosaic penA-60.001 gene causing ceftriaxone resistance internationally has spread to the more antimicrobial-susceptible genomic lineage, Sweden, September 2022. **Eurosurveillance**, v. 28, n. 10, 3 mar. 2023a.

GOLPARIAN, D. *et al.* Antimicrobial resistance prediction and phylogenetic analysis of *Neisseria gonorrhoeae* isolates using the Oxford Nanopore MinION sequencer OPEN. **Sci Rep**. 2018.

GOODMAN, S. D.; SCOCCA, J. J. Identification and arrangement of the DNA sequence recognized in specific transformation of *Neisseria gonorrhoeae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 18, p. 6982–6986, 1 set. 1988.

GOODSTADT, L.; PONTING, C. P. CHROMA: consensus-based colouring of multiple alignments for publication. **Bioinformatics**, v. 17, n. 9, p. 845–846, 1 set. 2001.

GUNN, J. S.; STEIN, D. C. Use of a non-selective transformation technique to construct a multiply restriction/modification-deficient mutant of *Neisseria gonorrhoeae*. **Molecular and General Genetics MGG** 1996 **251:5**, v. 251, n. 5, p. 509–517, jul. 1996.

HAMILTON, H. L.; SCHWARTZ, K. J.; DILLARD, J. P. Insertion-duplication mutagenesis of *Neisseria*: use in characterization of DNA transfer genes in the gonococcal genetic island. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 16, p. 4718–4726, 2001.

HAMILTON, L. *et al.* Natural transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: from DNA donation to homologous recombination. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 376–385, 1 jan. 2006.

HARRIS, S. R. *et al.* Public health surveillance of multidrug-resistant clones of *Neisseria gonorrhoeae* in Europe: a genomic survey. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 18, n. 7, p. 758, 1 jul. 2018.

HEPP, C. *et al.* Single-stranded DNA uptake during gonococcal transformation. **Journal of Bacteriology**, v. 198, n. 18, p. 2515–2523, 2016.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. **Genome Research**, v. 9, n. 9, p. 868–877, 1 set. 1999.

HUI, B. *et al.* Oral and anal sex are key to sustaining gonorrhoea at endemic levels in MSM populations: a mathematical model. **Sexually Transmitted Infections**, v. 91, n. 5, p. 365–369, 1 ago. 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, jan. 2005.

JOSE, P. P. *et al.* Gonorrhea: Historical outlook. **Journal of Skin and Sexually Transmitted Diseases**, v. 2, n. 2, p. 110–114, 15 out. 2020.

KATZUNG, Bertram G.; TREVOR, Anthony J. (Orgs.). **Farmacologia básica e clínica**. ed.13. Porto Alegre: McGraw-Hill, 2017.

KIRKCALDY, R. D. *et al.* Epidemiology of Gonorrhea: A Global Perspective. **Sexual health**, v. 16, n. 5, p. 401, 2019.

KOJIMA, N.; DAVEY, D. J.; KLAUSNER, J. D. Pre-exposure prophylaxis for HIV infection and new sexually transmitted infections among men who have sex with men. **AIDS**, v. 30, n. 14, p. 2251–2252, 2016.

KRIVITSKAYA, A. V.; KHRENOVA, M. G. Evolution of Ceftriaxone Resistance of Penicillin-Binding Proteins 2 Revealed by Molecular Modeling. **International Journal of Molecular Sciences** 2023, Vol. 24, Page 176, v. 24, n. 1, p. 176, 22 dez. 2022.

KUBANOVA, A. A. *et al.* The role of some individual amino acid substitutions in penicillin-binding protein (PBP2) of *Neisseria gonorrhoeae* in the emergence of resistance to ceftriaxone. **Molecular Biology**, v. 48, n. 6, p. 858–863, 17 dez. 2014.

LEBER, A. L. **Clinical microbiology procedures handbook**. 4th edition. ed. Washington, DC: ASM Press, 2016.

LEE, S.-G. *et al.* Various *penA* mutations together with *mtrR*, *porB* and *ponA* mutations in *Neisseria gonorrhoeae* isolates with reduced susceptibility to cefixime or ceftriaxone. **Antimicrob Chemother**. 2010.

LEFEBVRE, B. *et al.* Ceftriaxone-Resistant *Neisseria gonorrhoeae*, Canada, 2017. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 2, p. 381, 1 fev. 2018.

LIAO, Y. *et al.* Dissemination of *Neisseria gonorrhoeae* with decreased susceptibility to extended-spectrum cephalosporins in Southern China, 2021: a genome-wide surveillance from 20 cities. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 22, n. 1, p. 39, 1 dez. 2023.

LIN, E. Y. *et al.* Establishing Novel Molecular Algorithms to Predict Decreased Susceptibility to Ceftriaxone in *Neisseria gonorrhoeae* Strains. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 223, n. 7, p. 1232, 4 abr. 2021.

LINDBERG, R. *et al.* *Neisseria gonorrhoeae* Isolates with Reduced Susceptibility to Cefixime and Ceftriaxone: Association with Genetic Polymorphisms in *penA*, *mtrR*, *porB1b*, and *ponA*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 6, p. 2117, jun. 2007.

LIU, G.; TANG, C. M.; EXLEY, R. M. Non-pathogenic *Neisseria*: Members of an abundant, multi-habitat, diverse genus. **Microbiology**. v. 161, n. 7, p. 1297–1312, 1 jul. 2015.

LUETKEMEYER, A. F. *et al.* Postexposure Doxycycline to Prevent Bacterial Sexually Transmitted Infections. **New England Journal of Medicine**, v. 388, n. 14, p. 1296–1306, 6 abr. 2023.

MACHEBOEUF, P. *et al.* Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. **FEMS microbiology reviews**, v. 30, n. 5, p. 673–691, set. 2006a.

MARTIN, I. M. C. *et al.* Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. **Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 8, p. 1497–1505, 15 abr. 2004.

MEYER, T.; BUDER, S. The Laboratory Diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*: Current Testing and Future Demands. **Pathogens 2020, Vol. 9, Page 91**, v. 9, n. 2, p. 91, 31 jan. 2020.

MŁYNARCZYK-BONIKOWSKA, B. *et al.* Multiresistant *Neisseria gonorrhoeae*: a new threat in second decade of the XXI century. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 209, n. 2, p. 95, 1 abr. 2020.

MŁYNARCZYK-BONIKOWSKA, B. *et al.* Molecular Mechanisms of Drug Resistance and Epidemiology of Multidrug-Resistant Variants of *Neisseria gonorrhoeae*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 18, 1 set. 2022.

NABU, S. *et al.* Proteochemometric model for predicting the inhibition of penicillin-binding proteins. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 29, n. 2, p. 127–141, 26 out. 2015.

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, 1 jul. 2016.

NDAGI, U. *et al.* Antibiotic resistance: bioinformatics-based understanding as a functional strategy for drug design. **RSC Advances**, v. 10, n. 31, p. 18451–18468, 10 maio 2020.

OHNISHI, M. *et al.* Spread of a Chromosomal Cefixime-Resistant *penA* Gene among Different *Neisseria gonorrhoeae* Lineages. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 1060, mar. 2010.

OHNISHI, M.; SAIKA, T.; *et al.* Ceftriaxone-Resistant *Neisseria gonorrhoeae*, Japan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 148, jan. 2011.

OHNISHI, M.; GOLPARIAN, D.; *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, jul. 2011.

OMEERSHFFUDIN, U. N. M.; KUMAR, S. Emerging threat of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: pathogenesis, treatment challenges, and potential for vaccine development. **Archives of microbiology**, v. 205, n. 10, p. 330, 1 out. 2023.

OSAKA, K. *et al.* Analysis of amino acid sequences of penicillin-binding protein 2 in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone. **Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy**, v. 14, n. 3, p. 195–203, 2008.

PAREEK, C. S.; SMOCZYNSKI, R.; TRETYN, A. Sequencing technologies and genome sequencing. **Journal of Applied Genetics**, v. 52, n. 4, p. 413, nov. 2011.

PATHELA, P. *et al.* HIV incidence among men with and those without sexually transmitted rectal infections: estimates from matching against an HIV case registry. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 57, n. 8, p. 1203–1209, 15 out. 2013.

PENESYAN, A.; GILLINGS, M.; PAULSEN, I. T. Antibiotic Discovery: Combatting Bacterial Resistance in Cells and in Biofilm Communities. **Molecules 2015, Vol. 20, Pages 5286-5298**, v. 20, n. 4, p. 5286–5298, 24 mar. 2015.

PETERSON, S. W. *et al.* Molecular Assay for Detection of Genetic Markers Associated with Decreased Susceptibility to Cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 7, p. 2042, 1 jul. 2015.

POWELL, A. J. *et al.* Crystal Structures of Penicillin-binding Protein 2 from Penicillin-susceptible and -resistant Strains of *Neisseria gonorrhoeae* Reveal an Unexpectedly Subtle Mechanism for Antibiotic Resistance. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 2, p. 1202, 1 jan. 2009.

PROCOP, G. W.; CHURCH, D. L. **Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorado**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

QUILLIN, S. J.; SEIFERT, H. S. *Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 226–240, 1 abr. 2018.

REN, Y. *et al.* Prediction of antimicrobial resistance based on whole-genome sequencing and machine learning. **Bioinformatics**, v. 38, n. 2, p. 325–334, 3 jan. 2022.

RICE, P. A. *et al.* *Neisseria gonorrhoeae*: Drug Resistance, Mouse Models, and Vaccine Development. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093530>, v. 71, p. 665–686, 8 set. 2017.

SADER, H. S.; PIGNATARI, A. C. E Test: a novel technique for antimicrobial susceptibility testing. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 112, n. 4, p. 635–638, 1994.

SALOMÃO, R. **Infectologia: Bases clínicas e tratamento**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

SANCHEZ-BUSÓ, L.; HARRIS, S. R. Using genomics to understand antimicrobial resistance and transmission in *Neisseria gonorrhoeae*. **Microbial Genomics**, v. 5, n. 2, 1 fev. 2019.

SAUVAGE, E. *et al.* The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. **FEMS microbiology reviews**, v. 32, n. 2, p. 234–258, mar. 2008a.

SCHÖRNER, M. A. *et al.* *In vitro* selection of *Neisseria gonorrhoeae* unveils novel mutations associated with extended-spectrum cephalosporin resistance. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 924764, 27 jul. 2022.

SEOANE, A.; BOU, G. Bioinformatics approaches to the study of antimicrobial resistance. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 34, n. Suppl1, p. 15, 1 set. 2021.

SEOW, V. Y.; TSYGELNYTSKA, O.; BIAIS, N. Multisite transformation in *Neisseria gonorrhoeae*: insights on transformations mechanisms and new genetic modification protocols. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1178128, 20 jun. 2023.

SHAKU, M. *et al.* Peptidoglycan biosynthesis and remodeling revisited. **Advances in Applied Microbiology**, v. 112, p. 67–103, 1 jan. 2020.

SHALABY, M. A. W. *et al.* Penicillin binding protein 2a: An overview and a medicinal chemistry perspective. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 199, p. 112312, 1 ago. 2020.

SINGH, A. *et al.* Recognition of the β -lactam carboxylate triggers acylation of *Neisseria gonorrhoeae* penicillin-binding protein 2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 38, p. 14020, 9 set. 2019.

SINGH, A. *et al.* Mutations in penicillin-binding protein 2 from cephalosporin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* hinder ceftriaxone acylation by restricting protein dynamics. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 21, p. 7529, 5 maio 2020.

- SPARLING, P. F. Genetic Transformation of *Neisseria gonorrhoeae* to Streptomycin Resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 92, n. 5, p. 1364, 1966.
- SPENCER-SMITH, R. *et al.* DNA uptake sequences in *Neisseria gonorrhoeae* as intrinsic transcriptional terminators and markers of horizontal gene transfer. **Microbial genomics**, v. 2, n. 8, p. e000069, 1 ago. 2016.
- SPRATT, B. G. Hybrid penicillin-binding proteins in penicillin-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. **Nature**, v. 332, n. 6160, p. 173–176, 1988.
- TACCONELLI, E. *et al.* Articles Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. 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 gonorrhoeae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 11, p. 3638, nov. 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, jan. 2006.
- TANAKA, M. *et al.* Antimicrobial resistance and molecular characterisation of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Fukuoka, Japan, 1996-2016. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 17, p. 3–7, 1 jun. 2019.
- TERESA VALLEJO-ORTEGA, M. *et al.* Systematic review A systematic review of the prevalence of selected sexually transmitted infections in young people in Latin America. **Rev Panam Salud Publica**, v. 46, 2022.
- TOMBERG, J. *et al.* Molecular and structural analysis of mosaic variants of penicillin-binding protein 2 conferring decreased susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae*: role of epistatic mutations. **Biochemistry**, v. 49, n. 37, p. 8062, 9 set. 2010.
- TOMBERG, J.; UNEMO, M.; OHNISHI, M.; DAVIES, C.; NICHOLAS, ROBERT A. Identification of Amino Acids Conferring High-Level Resistance to Expanded-Spectrum Cephalosporins in the penA Gene from *Neisseria gonorrhoeae* Strain H041. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 3029, jul. 2013.

TOMBERG, J. *et al.* Alanine-501 Mutations in Penicillin-Binding Protein 2 from *Neisseria gonorrhoeae*: Structure, Mechanism, and Effects on Cephalosporin Resistance and Biological Fitness. **Biochemistry**, v. 56, n. 8, p. 1140, 2 fev. 2017.

TONGTOYAI, J. *et al.* Prevalence and Correlates of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by Anatomic Site Among Urban Thai Men Who Have Sex With Men. **Sexually transmitted diseases**, v. 42, n. 8, p. 440–449, 25 ago. 2015.

TRAEGER, M. W. *et al.* Association of HIV Preexposure Prophylaxis With Incidence of Sexually Transmitted Infections Among Individuals at High Risk of HIV Infection. **JAMA**, v. 321, n. 14, p. 1380, 4 abr. 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, mar. 2012.

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. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 71, n. 11, p. 3096–3108, 1 nov. 2016.

UNEMO, M. *et al.* Gonorrhoea. **Nature Reviews Disease Primers 2019 5:1**, v. 5, n. 1, p. 1–23, 21 nov. 2019.

UNEMO, M. *et al.* WHO global antimicrobial resistance surveillance for *Neisseria gonorrhoeae* 2017-18: a retrospective observational study. **The Lancet. Microbe**, v. 2, n. 11, p. e627–e636, 1 nov. 2021.

UNEMO, M.; KONG, F. Y. S. Doxycycline-PEP - novel and promising but needs monitoring. **Nature reviews. Urology**, v. 20, n. 9, p. 522–523, 1 set. 2023.

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.

URSU, R. G. *et al.* The Optimal Management of *Neisseria gonorrhoeae* Infections. **Microorganisms**, v. 10, n. 12, 1 dez. 2022.

WALENSKY, R. P. *et al.* Morbidity and Mortality Weekly Report Sexually Transmitted Infections **Treatment Guidelines**, 2021 Centers for Disease Control and Prevention MMWR Editorial and Production Staff (Serials) MMWR Editorial Board. 2021.

WALKER, S. E.; LORSCH, J. Sanger Dideoxy Sequencing of DNA. **Methods in Enzymology**, v. 529, p. 171–184, 1 jan. 2013.

WANG, F. *et al.* Surveillance and molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Shenzhen, China, 2010–2017. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 23, p. 269–274, 1 dez. 2020.

WHILEY, D. M. *et al.* Diversity of penA Alterations and Subtypes in *Neisseria gonorrhoeae* Strains from Sydney, Australia, That Are Less Susceptible to Ceftriaxone. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3111, set. 2007.

WHO. Global Health Sector Strategies on HIV, Viral Hepatitis and the sexually transmitted infections. Junho. p. 2022–2030, 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global action plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae***. 2012.

YAHARA, K. *et al.* Emergence and evolution of antimicrobial resistance genes and mutations in *Neisseria gonorrhoeae*. **Genome medicine**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2021.

YANG, M. R.; WU, Y. W. Enhancing predictions of antimicrobial resistance of pathogens by expanding the potential resistance gene repertoire using a pan-genome-based feature selection approach. **BMC Bioinformatics**, v. 23, n. 4, p. 1–16, 1 abr. 2022.

YUAN, Q. *et al.* Identification of multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates with combined resistance to both ceftriaxone and azithromycin, China, 2017–2018. **Emerging Microbes & Infections**, v. 8, n. 1, p. 1546, 1 jan. 2019.

YUE, X. L. *et al.* Gonorrhea in China, 2018. **International Journal of Dermatology and Venereology**, v. 2, n. 2, p. 65–69, 1 jun. 2019.

ZAPUN, A.; CONTRERAS-MARTEL, C.; VERNET, T. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. **FEMS microbiology reviews**, v. 32, n. 2, p. 361–385, mar. 2008.

ZAPUN, A.; MORLOT, C.; TAHA, M. K. Resistance to β -Lactams in *Neisseria* ssp Due to Chromosomally Encoded Penicillin-Binding Proteins. **Antibiotics**, v. 5, n. 4, 1 dez. 2016.

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, 2009.