

**Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan**  
**Programa de Pós-graduação *Lato Sensu***  
**Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos**

**Michele Batista dos Santos**

**Vesículas de Membrana Externa (OMVs) extraídas de *Escherichia coli* e de  
*Klebsiella pneumoniae***

**São Paulo**  
**2024**

**Michele Batista dos Santos**

**Vesículas de Membrana Externa (OMVs) extraídas de *Escherichia coli* e de  
*Klebsiella pneumoniae***

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos.

Orientador (a): Noemi Furuyama

**São Paulo**

**2024**

**Catálogo na Publicação  
Instituto Butantan  
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Santos, Michele Batista dos

Vesículas de Membrana Externa (OMVs) extraídas de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae* / Michele Batista dos Santos ; orientador(a) Noemi Furuyama - São Paulo, 2024.

57 p. : il.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos.

1. Vesículas de Membrana Externa 2. Gram negativa. 3. Gel filtração. 4. Ultracentrifugação I. Furuyama, Noemi. II. Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos. IV. Título.

## AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, michele Batista dos Santos, aluno(a) do Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato  
 06 meses  
 12 meses  
 Outro prazo \_\_\_\_\_ Justifique:

São Paulo, 3 de Janeiro de 2024

michele B. Santos  
aluno(a)

De acordo: .....  
Orientador(a):

  
**Noemi Furuyama**  
Pesquisador Científico  
RG 19 819.808-5

## **AGRADECIMENTOS**

A Dr. Noemi Furuyama pela dedicação, orientação, oportunidade, amizade e ensinamentos.

Aos amigos e amigas, Gabrielly Matos, Gabriel Lusvarghi, Camila Correia, Joyce Voltolini, Ana Carolina de Aguiar e Vinicius Peres, por estarem ao meu lado e me auxiliarem em muitos momentos.

A todos da equipe do Laboratório de Genética pelas contribuições e ensinamentos.

A Simone do Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional pela realização das imagens de microscopia eletrônica.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização da minha pesquisa.

Este trabalho teve apoio financeiro da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo.

## RESUMO

SANTOS, Michele Batista dos. **Vesículas de Membrana Externa (OMVs) extraídas de *Escherichia coli* e de *Klebsiella pneumoniae***. 2024. 55 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2024.

As bactérias Gram-negativas são patógenos que apresentam resistência a diversos antibióticos. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência antimicrobiana é um problema de saúde pública. A *Escherichia coli* e a *Klebsiella pneumoniae* são multirresistentes e prevalentes nos ambientes hospitalares. Estas bactérias produzem vesículas de membrana externa (OMVs) e possuem diversas funções como: contribuição para a sobrevivência das bactérias através da neutralização de componentes tóxicos, eliminação de proteínas desnaturadas, estabelecimento do nicho de colonização, formação de biofilme, entrega de drogas, modulação do sistema de defesa e resposta imune. Este trabalho avaliou a produção e extração de OMVs produzidas por cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae* comparando os métodos de extração das mesmas por da gel filtração e ultracentrifugação. Além disso, através do teste de viabilidade bacteriana avaliamos a interferência das OMVs no crescimento de *E. coli* enteropatogênica, *E. coli* uropatogênica e *K. pneumoniae* hematopatogênica. A purificação das OMVs por gel filtração apresentou uma concentração elevada quando comparada com o método de ultracentrifugação. Identificamos, para ambos os métodos, através da eletroforese e imunoensaio a presença da proteína de membrana externa a OmpA, responsável pela estrutura das OMVs. Demonstramos pelos resultados que as EC086-UC, EC086-GF e OMV-KP70 interferiram no crescimento da cepa E2348/69 com padrão diretamente proporcional quando comparado com a concentração das vesículas. O contrário ocorreu na interferência da OMV KP70-UC, atuando sobre o crescimento de EC086 e KP70 de forma inversamente proporcional quando comparado com a concentração das vesículas. Concluimos que a interferência das vesículas sobre o crescimento deve levar em conta os parâmetros de densidade óptica e a viabilidade bacteriana. Assim, com as diversas ferramentas da biotecnologia como a engenharia genética podemos desenvolver OMVs capazes de carrear diversas moléculas e ser aplicada em vários campos da imunologia, diagnósticos e na medicina clínica.

**Palavras-chave:** Vesículas de Membrana Externa. Gram negativa. *Escherichia coli*. *Klebsiella pneumoniae*. Gel filtração. Ultracentrifugação

## ABSTRACT

SANTOS, Michele Batista dos. **Outer Membrane Vesicles (OMVs) extracted of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae***. 2024. 55 p. Monograph (Specialist in Biotechnology for Health – Vaccines and Biopharmaceuticals) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2024.

Gram-negative bacteria are major pathogens that develop antibiotic resistance and cause distinct types of infections. According to the WHO (World Health Organization), bacterial resistance is considered a public health problem. Multiresistance *Klebsiella pneumoniae* and *E. coli* are prevalent in many hospitals. These bacteria produce outer membrane vesicles (OMVs) these vesicles can contribute to bacterial survival by eliminating toxic compounds, removing misfolded periplasmic proteins, establishing a colonization niche, biofilm formation, drug delivery, and modulation of host defense and response. This work aimed to evaluate the production and extraction of OMVs produced by *E. coli* and *K. pneumoniae*, comparing two different gel filtration and ultracentrifugation methods. Furthermore, we evaluated the interference of OMVs on the growth of enteropathogenic *E. coli*, uropathogenic *E. coli*, and hematophagous *K. pneumoniae* strains verifying the viability test. The gel filtration extraction system obtained an elevated concentration when compared to ultracentrifugation method. We observed the presence of OmpA by electrophoresis and Dot blotting, responsible for the structure of OMVs. The results showed interferences of OMV EC086-UC, EC086-GF and OMV-KP70 on E2348/69 growth were directly proportional to the concentration of OMVs but inversely proportional to the concentration of OMVs with OMV-KP70 on EC086 and KP70 growth. We concluded that vesicle interference on EC086, E2348/69, and KP70 growth should not be based only on optical density parameters but complemented with the viability test of each bacterium strain. The use of biotechnology tools like genetic modifications, OMVs can perform multiple functions carrying molecules with many capabilities to be applied in many fields such as immunology, diagnostics, clinical medicine.

**Keywords:** Outer Membrane Vesicles. Gram negative. *Escherichia coli*. *Klebsiella pneumoniae*. Gel filtration. Ultracentrifugation.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura da bactéria Gram-negativa .....	15
Figura 2 - Gênese de vesícula de membrana externa .....	17
Figura 3 – Ultracentrifugação .....	23
Figura 4 - Gel filtração .....	24
Figura 5 - Filtração tangencial .....	24
Figura 6 - Transporte feito por OMVs .....	26
Figura 7 - Preparo do lote trabalho .....	28
Figura 8 - Cultivo para extração de OMVs .....	29
Figura 9 - Extração por Ultracentrifugação .....	30
Figura 10 - Extração por gel filtração .....	30
Figura 11 - Corrida de eletroforese SDS-PAGE .....	33
Figura 12 - Dot-Blot .....	34
Figura 13 - Preparo da amostra .....	35
Figura 14 - Microscópio eletrônico .....	35
Figura 15 - Crescimento bacteriano para viabilidade com resazurina .....	36
Figura 16 - Diagrama da placa de crescimento bacteriano .....	37
Figura 17 - Diagrama da placa do teste de viabilidade .....	38
Figura 18 – Eletroforese SDS-PAGE das OMVs extraídas das cepas EC086 por UC e GF e da cepa KP70 por UC .....	411
Figura 19 – OmpA de OMVs extraídas detectada por Dot-Blot .....	41
Figura 20 - Microscopia eletrônica das amostras OMV KP70-UC, OMV EC086-UC e OMV EC086-GF .....	42
Figura 21 - Curva de crescimento bacteriano das cepas E23, EC086 e KP70 na presença de OMVs extraídas .....	43
Figura 22 – Interferência das OMVs extraídas sobre as cepas bacterianas E2348/69, EC086 e KP70 .....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Meio Luria-Bertani.....	28
Tabela 2 – Concentração de albumina.....	31
Tabela 3 – Diluições das amostras.....	32
Tabela 4 – Composição do Reagente A.....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA - Ácido Desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)

DO – Densidade óptica

*E. coli* – *Escherichia coli*

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (Ethylenediamine Tetraacetic Acid)

GF – Gel Filtração

HU – Hospital Universitário

IM – Membrana Interna (Inner Membrane)

*K. pneumoniae* – *Klebsiella pneumoniae*

LB – Luria-Bertani

LPS - Lipopolissacarídeo

MV – Vesículas de Membrana (Membrane Vesicles)

NADPH - Fosfato Dinucleótido Nicotinamida Adenina (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)

NK – Natural Killer

*N. meningitidis* – *Neisseria meningitidis*

OM – Membrana Externa (Outer Membrane)

OMP – Proteína de Membrana Externa (Outer Membrane Protein)

OmpA – Proteína de Membrana Externa A (Outer Membrane Protein A)

OMS – Organização Mundial da Saúde

OMV – Vesícula de Membrana Externa (Outer Membrane Vesicle)

PAMP – Padrões Moleculares Associados a Patógenos (Pathogen Associated Molecular Patterns)

PBS - Tampão Fosfato-Salino (Phosphate-Buffered Saline)

pH - Potencial Hidrogeniônico

RNA - Ácido Ribonucleico (Ribonucleic Acid)

SDS-PAGE - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (Sodium Dodecyl Sulfate

Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

UC – Ultracentrifugação

## LISTA DE SÍMBOLOS

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio

μm – micrômetro

Bexsero® – vacina adsorvida meningocócica B (recombinante)

VA-MENGOCC-BC® – vacina à base de OMV extraída com detergente

MenBVac® - vacina meningocócica baseada em vesículas de membrana externa

μL – microlitro

mL – mililitro

°C – graus Celcius

RPM – rotação por minuto

nm – nanômetro

% - porcentagem

g/L – gramas por litro

L – litro

mg/mL – miligramas por mililitro

μL/mL – microlitros por mililitro

μg – micrograma

mg - miligrama

## SUMÁRIO

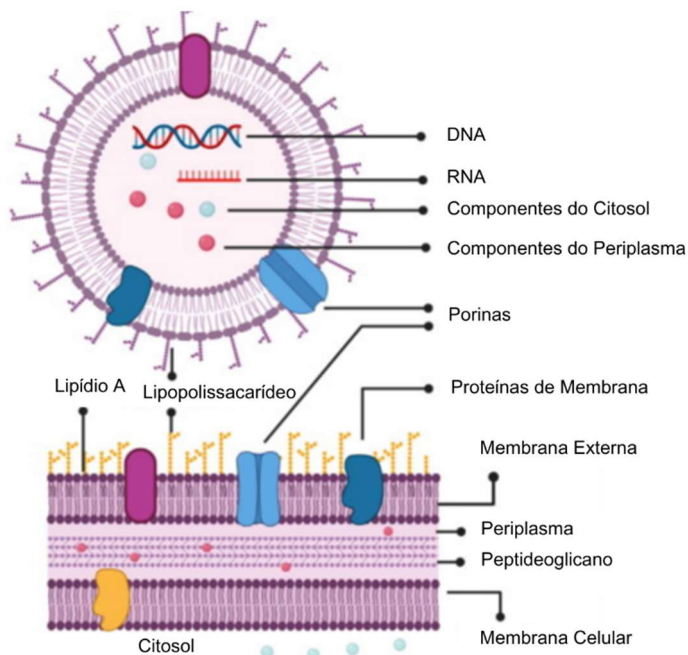
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>1.1</b>	<b><i>Vesículas de Membrana Externa (OMVs)</i></b>	<b>16</b>
1.1.1	<i>Biogênese e fatores de stress</i>	16
1.1.2	<i>Funções</i>	19
<b>1.2</b>	<b><i>Resistência a antibióticos</i></b>	<b>20</b>
<b>1.3</b>	<b><i>Extração de OMVs</i></b>	<b>22</b>
1.3.1	<i>Ultracentrifugação</i>	22
1.3.2	<i>Gel filtração ou Cromatografia por exclusão</i>	23
1.3.3	<i>Filtração tangencial</i>	24
<b>1.4</b>	<b><i>Possibilidades de uso de OMV em biotecnologia</i></b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b><i>Preparo do Lote de trabalho</i></b>	<b>28</b>
<b>3.2</b>	<b><i>Cultivo para extração de OMVs</i></b>	<b>28</b>
<b>3.3</b>	<b><i>Extração de OMV</i></b>	<b>29</b>
3.3.1	<i>Ultracentrifugação</i>	29
3.3.2	<i>Gel filtração</i>	30
<b>3.4</b>	<b><i>Caracterização das OMVs extraídas</i></b>	<b>31</b>
3.4.1	<i>Determinação da concentração de OMVs</i>	31
3.4.2	<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE)</i>	32
3.4.3	<i>Dot-Blot</i>	33
3.4.4	<i>Microscopia Eletrônica</i>	34
<b>3.5</b>	<b><i>Crescimento bacteriano com OMV</i></b>	<b>35</b>

<b>3.6</b>	<b><i>Teste de viabilidade bacteriana com resazurina</i></b> .....	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>48</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>49</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As bactérias Gram negativas representam microrganismos de importância relevante na área da saúde pública. Sua estrutura é composta por lipopolissacarídeo (LPS), membrana externa (OM), membrana interna (IM), fosfolipídeos e periplasma, além de componentes como DNA, RNA e proteínas (Figura 1) (Kulkarni; Jagannadham, 2014; Schwechheimer; Kuehn, 2015; Beveridge, 1999). Estes microrganismos podem ser encontrados de forma comensal fazendo parte da microbiota de humanos e animais ou causadores de diversas infecções, inclusive as hospitalares.

**Figura 1** - Estrutura da bactéria Gram-negativa



**Fonte:** adaptado de JAHROMI; FUHRMANN, 2021.

A *Escherichia coli* (*E. coli*) e a *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) são bactérias Gram negativas responsáveis por causarem infecções hospitalares devido a presença de genes de resistência e multirresistência (Vila *et al.*, 2016; Eusébio *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2020). Ambas estão citadas na lista de patógenos resistentes a diversos antibióticos pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2017). Causam infecções do trato gastrointestinal, urinárias, respiratório, sepse, entre outras (Martin; Bachman, 2018; Wang *et al.*, 2020; Kobayashi *et al.*, 2021).



Bactérias Gram negativas e Gram positivas têm um mecanismo de produção e liberação de vesículas provenientes da membrana celular, chamadas de Vesículas de Membrana (MVs). Estas têm diversas funções, e uma das mais relevantes é a capacidade de carrear diversos componentes como: proteínas, material genético, enzimas, fatores de virulência, toxinas, antibióticos (Deatherage; Cookson, 2012; Lee *et al.*, 2009). Neste projeto foi abordado apenas as vesículas produzidas pelas Gram negativas denominadas de vesículas de membrana externa (OMVs = *outer membrane vesicles*) (Schwechheimer *et al.*, 2014; Deatherage; Cookson, 2012).

### 1.1 Vesículas de Membrana Externa (OMVs)

Há mais de 50 anos estuda-se sobre as OMVs, tanto quanto a sua biogênese como as suas funções. As primeiras descrições na literatura ocorreram por volta dos anos de 1960, citado por muitos pesquisadores como secreção de LPS em forma de bolsas (Bishop; Work, 1965) ou segundo Knox e colaboradores (1966) como sendo bolhas causadas por lise. Observaram que apresentavam as mesmas características da membrana externa de bactérias Gram negativas e posteriormente foram definidas como vesículas de membrana externa. Consideradas estruturas fundamentais para a sobrevivência destas bactérias, pois são responsáveis por diversas funções tanto defensivas assim como ofensivas.

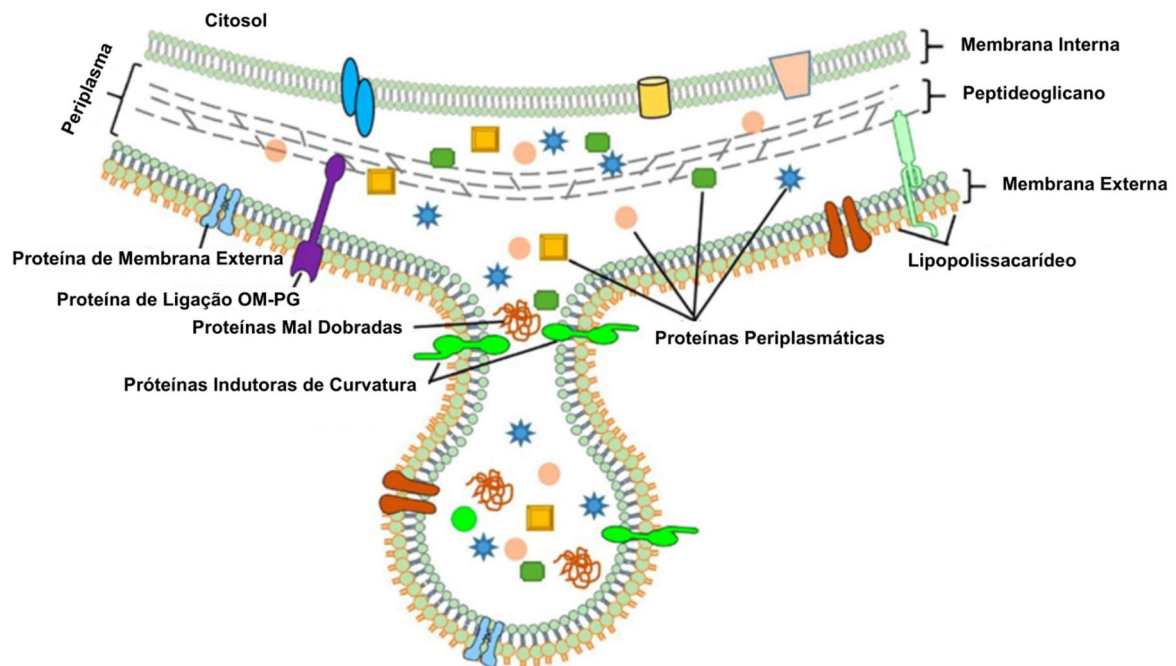
As OMVs são nanopartículas que medem aproximadamente 20 a 250 nm de diâmetro, são secretadas da membrana externa das bactérias Gram negativas, sendo que a quantidade liberada depende: da fase de crescimento da bactéria, das condições do ambiente de crescimento, de fatores de estresse como a falta de nutrientes, mudança de pH, temperatura de incubação e presença de antibióticos (Kulkarni; Jagannadham, 2014; Baker *et al.*, 2014). Dessa forma as vesículas são reflexo da membrana externa das bactérias pois apresentam diversos Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMP = Pathogen Associated Molecular Patterns), característica que as tornam excelentes candidatas vacinais pois ativam o sistema imune (Deatherage; Cookson, 2012; Li *et al.*, 2020).

#### 1.1.1 Biogênese e fatores de stress

A formação das vesículas ocorre inicialmente pelo surgimento natural de protuberâncias na membrana externa de bactérias Gram negativas composta por proteínas de membrana externa (OMPs), LPS, glicerofolipídeos e proteínas

periplasmáticas, enzimas, proteínas, DNA, RNA, peptideoglicano, sinalizadores entre outros componentes do periplasma e do citoplasma (Figura 2) (Roier *et al.*, 2016; Collins; Brown, 2021; Li *et al.*, 2020; Furuyama; Sircili, 2021). No geral, se forma uma pequena bolha na membrana externa e subsequentemente esta porção é estrangulada e a vesícula se separa da membrana externa. Alguns autores acreditam que este processo não é espontâneo e sim que as bactérias desenvolveram estratégias, diminuindo assim o gasto de energia para dessa forma selecionar o conteúdo das OMVs que irão se formar (Guerrero-Mandujano *et al.*, 2017; Klimentová; Stulík, 2015).

**Figura 2** - Gênese de vesícula de membrana externa



**Fonte:** adaptado de CARUANA; WALPER, 2020.

Como já dito anteriormente, vários fatores de estresse provocam a formação de OMVs, podendo ser: temperatura, pH, detrimento de nutrientes, ação de antibiótico, exposição a agentes químicos e estresse relacionado a interação hospedeiro-patógeno (Klimentová; Stulík, 2015; Furuyama; Sircili, 2021). Estes fatores de estresse agem de forma a simular o ambiente do hospedeiro e consequentemente o microrganismo produz maior quantidade de vesículas.

A alteração de temperatura/choque térmico provoca a desnaturação de proteínas e elas são eliminadas através das OMVs como um sistema de defesa das bactérias.

Nesta situação, a bactéria se torna hipervesiculante, metodologia que pode ser utilizada para criar uma “fábrica” de vesículas para serem utilizadas, por exemplo, como carreadores (Klimentová; Stulík, 2015; Baumgarten *et al.*, 2012).

O tipo de meio de cultura, o ambiente em que a bactéria se encontra deve estar em um pH ideal para que possa se multiplicar. A mudança do pH no ambiente de crescimento bacteriano pode alterar o empacotamento de proteínas, o que causa uma maior ou menor taxa de vesiculação (Johnston *et al.*, 2023). Johnston *et al.* (2023) abordaram o efeito de diferentes condições de crescimento com alteração de pH em *Helicobacter pylori*, afim de analisar a produção de OMVs nestas condições. O grupo de cientistas, observou uma menor taxa na produção de vesículas quando as bactérias cresceram em pH ácido se comparada com a quantidade de OMV produzida em uma condição de pH neutro.

A exposição a agentes químicos é outra forma de estresse que resulta em uma hipervesiculação. Baumgarten *et al.* (2012) fizeram um estudo no qual foi testado agentes químicos como EDTA e cloreto de sódio no crescimento de *Pseudomonas putida* DOT-T1E, neste estudo ele observou que estes agentes agem estressando a membrana desta bactéria que foi causada por uma perturbação na interação dos íons com componentes da membrana, acarretando na formação das vesículas de membrana e diminuição do tamanho das mesmas.

Para um crescimento bacteriano adequado é necessário a presença de nutrientes específicos para o microrganismo. A depleção de nutrientes, ou seja, a falta dele no meio de cultura causa uma maior taxa de liberação de vesículas (Gerritzen *et al.*, 2019). Gerritzen *et al.* (2019) testaram a depleção de sulfato em *Neisseria meningitidis* mostrando que houve uma maior quantidade de liberação de OMVs, justificado devido a um aumento na biossíntese de fosfolipídios, causado pela alta reposição de NADPH. O NADPH é um dos principais cofatores na rede metabólica e é influenciado por muitas reações, o que pode ser visto como uma perturbação causando um aumento na produção de OMVs. Em outros estudos também foram testados a depleção de cisteína que provocou uma elevação na taxa de vesículas liberadas. Neste caso ocorreu perturbação na montagem de proteína ferro-enxofre causado por um estresse oxidativo (Van de Waterbeemd *et al.*, 2013).

O estresse oxidativo é um desequilíbrio na geração de compostos oxidantes, dentro do meio de crescimento bacteriano, como por exemplo o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). O tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> age de forma semelhante a explosão

reativa de oxigênio produzida por células de defesa do sistema inato do hospedeiro e assim as OMVs são secretadas em uma maior taxa (Macdonald; Kuehn, 2013).

A presença de antibióticos também age como um fator de estresse quando adicionado no meio de cultura, alterando o crescimento bacteriano e aumentando a quantidade de vesículas liberadas. Quando em ambiente de hospedeiro estas vesículas agem como defesa à ação destes antibióticos, e com isso aumentando a taxa de vesiculação (Ye *et al.*, 2021). Ye *et al.* (2021) observaram que a estimulação de antibiótico no meio fez com que houvesse um rendimento de 2,6 vezes maior de OMV em comparação a um meio sem antibiótico. Este aumento de OMVs se deu pela apresentação de GroEL na membrana, uma proteína que promove macrófagos a reconhecer OMVs e liberar citocinas pró-inflamatórias e mediadoras.

### 1.1.2 Funções

As OMVs contêm diversas funções que são indispensáveis para a sobrevivência das bactérias: carreadoras de moléculas, a participação na formação de biofilme, competição ou defesa contra outros microrganismos, defesa contra antibióticos e às células de resposta imune do hospedeiro, além de carregar fatores de virulência (Collins; Brown, 2021; Kulkarni; Jagannadham, 2014; Furuyama; Sircili, 2021).

Devido a constituição das OMVs apresentarem diversos PAMPs na membrana externa e conterem uma variedade de moléculas como o LPS, podem agir como potentes adjuvantes ativando o sistema imune do hospedeiro. Essa é uma característica que torna estas vesículas potenciais candidatas vacinais. No entanto LPS é um componente tóxico, sendo necessário utilizar de técnicas para minimizar a sua toxicidade, por exemplo através das técnicas de biologia molecular, e então se tornam de fato uma molécula para o uso como adjuvante (Van Der Pol; Stork; Van Der Ley, 2015; Kulkarni, Jagannadham, 2014).

As OMVs estão correlacionadas a formação de biofilme pois ambos se formam devido ao estresse sofrido pelas bactérias em seu ambiente de crescimento. Os biofilmes são formados por matrix de exopolissacarídeos que está relacionada com a proteção das bactérias e que contém moléculas como proteínas e ácidos nucleicos (Furuyama; Sircili, 2021; Leite *et al.*, 2017). Além disto as OMVs e os biofilmes estão ambos associados a co-agregação de células. A formação deste biofilme restringe a mobilidade bacteriana e aumenta a comunidade celular, o que torna um ambiente ideal para a troca de DNA, como por exemplo em forma de plasmídeo, isto faz com

que essa formação de biofilme auxilie as bactérias a se defenderem contra agentes antimicrobianos (Van Der Pol; Stork; Van Der Ley, 2015; Kulkarni; Jagannadham, 2014; Rabin *et al.*, 2015; Culler *et al.*, 2018).

A capacidade de transportar moléculas a grandes distâncias é uma das principais e mais importantes características das OMVs, pois as vesículas protegem o conteúdo contra ação enzimática. São excelentes carreadoras de material genético, proteínas, fatores de virulência, nutrientes, íons, estimulando o sistema de defesa do hospedeiro a liberar moléculas de ações inflamatórias (Collins; Brown, 2021; Mancini *et al.*, 2020; Van Der Pol; Stork; Van Der Ley, 2015; Kulkarni; Jagannadham, 2014; Furuyama; Sircili, 2021).

Outra função relevante das OMVs é a capacidade de transferir genes entre as bactérias, podendo inclusive transferir genes de resistência a antibióticos, transformando cepas não resistentes em resistentes. As bactérias utilizam deste mecanismo para se protegerem e se alastrarem no hospedeiro, no caso de infecções (Van Der Pol; Stork; Van Der Ley, 2015)

As proteínas de membrana externa (OMPs) que são uma classe de proteínas ancoradas na membrana externa, possuem função de regulação de adesão, virulência e formação de biofilme (Nie *et al.*, 2020). Dentre elas está a OmpA de peso molecular entre 28kDa e 36kDa, uma das proteínas de membrana mais estudadas.

## **1.2 Resistência a antibióticos**

O tratamento das infecções bacterianas estão continuamente aumentando devido ao aparecimento de microrganismos resistentes as diversas classes de antibióticos (Collins; Brown, 2021). Segundo a Associação Médica Brasileira, anualmente mais de 45 mil brasileiros morrem devido a infecções hospitalares e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que este número pode chegar a 100 mil (BRASIL, 2021). A descoberta dos antibióticos representou um marco significativo para a ciência, proporcionando um aumento expressivo na expectativa de vida. Mesmo diante aos avanços resultantes dessa descoberta, Alexander Fleming destacou: “Provavelmente não existe nenhum medicamento quimioterápico ao qual, em circunstâncias adequadas, a bactéria não possa reagir, adquirindo de alguma ‘rapidez’ (resistência)”. Ou seja, apesar da diversidade de classes de antibióticos disponíveis, os microrganismos têm a capacidade de desenvolver resistência tornando o tratamento

das infecções mais complexas (Rosini *et al.*, 2020; Alekshun; Levy, 2007). Atualmente a resistência a antibióticos é um problema global acarretando aumento de mortes por infecções que anteriormente não eram consideradas preocupantes (Davies; Davies, 2010; Rosini *et al.*, 2020).

A *E. coli* e a *K. pneumoniae* foram citadas na lista de patógenos prioritários pela OMS como sendo preocupantes devido a sua multirresistência a antibióticos, ambos os patógenos são encontrados em infecções nosocomiais. Existe a necessidade de desenvolver novos métodos de combate a estes microrganismos (WHO, 2017; Livermore, 2004).

A resistência se manifesta quando o microrganismo é capaz de se proliferar mesmo na presença de antibióticos que possibilita a disseminação imprevisível do microrganismo. A transferência de material genético entre diferentes estirpes bacterianas amplia ainda mais a resistência, comprometendo o tratamento eficaz de diversas doenças (WHO, 2014; WHO, 2016; Livermore, 2004).

A resistência a antibióticos pode ser causada por inúmeros mecanismos de defesa do microrganismo, um destes é o mecanismo de resistência intrínseca, que é a habilidade de uma bactéria restringir a eficácia de um antibiótico através de características funcionais ou estruturais, como bomba de efluxo, enzimas de inativação de antibióticos e baixa permeabilidade de envelopes celulares (Alvarez-Ortega *et al.*, 2011).

A resistência adquirida, ocorre normalmente através da transferência horizontal, podendo ser por plasmídeos, transposons ou por elementos conjugativos e integrativos, esta transferência pode ocorrer tanto entre bactérias de mesmo gênero como entre bactérias de gêneros distintos. Estes mecanismos adquiridos podem ser de: hidrólise, mutação e modificação dos alvos do antibiótico, baixa permeabilidade da membrana, aumento da expressão da bomba de efluxo, entre muitos outros mecanismos (Antonelli *et al.*, 2021).

Uma outra forma de resistência é a resistência adaptativa, que é a capacidade de uma bactéria de enfrentar antibióticos através de alterações transientes, ou seja, é um fenótipo adquirido que é reversível, ocorrendo apenas quando o microrganismo recebe o estímulo estressante. Exemplo de resistência adaptativa é a formação de biofilme, que é um agregado de células bacterianas presentes em uma superfície podendo ser viva ou não onde as bactérias ficam encapsuladas em uma matriz que irá lhes proporcionar os metabólitos e proteínas necessárias para o seu

desenvolvimento (Antonelli *et al.*, 2021). A produção de OMVs age como um mecanismo vital para a sobrevivência dentro da comunidade bacteriana, favorecendo a persistência de bactérias devido a capacidade destas vesículas de conter elementos de resistência em sua composição. Além disto, através do seu mecanismo de carregamento de moléculas, as OMVs têm a capacidade de transportar moléculas de resistência, podendo causar uma resistência a antibióticos em bactérias que inicialmente não possuem resistência. Esse fenômeno desempenha um papel significativo na promoção da resistência bacteriana, tanto em infecções agudas quanto crônicas (Guerrero-Mandujano *et al.*, 2017; Chattopadhyay; Jagannadham, 2015).

As vesículas de membrana externa são reconhecidas como potenciais candidatas para a utilização como entrega de medicamentos, devido a seu tamanho são capazes de adentrar sistemas e viajar por todo o hospedeiro. Além disto as OMVs têm a capacidade de se comunicarem com comunidades bacterianas, sendo mais um ponto positivo para o seu uso como carreador de antibióticos e moléculas terapêuticas (Jain; Pillai, 2017)

### **1.3 Extração de OMVs**

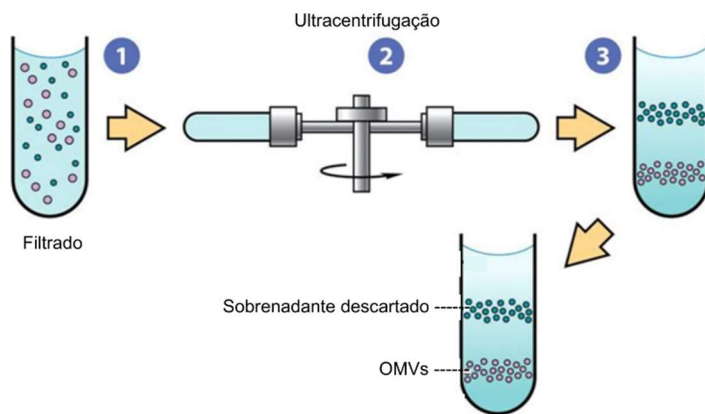
Existem vários métodos de extração de OMVs, os pesquisadores realizam a combinação dos mesmos como: centrifugação, filtração, ultrafiltração, ultracentrifugação. Inicialmente as células bacterianas são descartadas através da centrifugação e filtração. Utiliza-se o filtrado para a realização do processo de purificação das vesículas de interesse (Klimentová; Stulík, 2015; Çelik, *et al.*, 2023). Os principais métodos de extração são:

#### **1.3.1 Ultracentrifugação**

A ultracentrifugação é o método mais utilizado para a extração de OMVs. Primeiramente ocorre uma centrifugação do cultivo bacteriano a uma velocidade de 100.000 x g a fim de remover células e debris celulares, o sobrenadante obtido é submetido a filtração utilizando filtros de porosidade entre 0,22µm a 0,45µm. O produto obtido é denominado de filtrado e segue para o processo de ultracentrifugação em elevada velocidade em torno de 100.000 a 200.000 x g por um tempo aproximado de 1 a 4 horas, sendo necessário a padronização destes parâmetros dependendo da vesícula a ser extraída. A vantagem da utilização desta técnica é a obtenção de

produto extremamente purificado. O uso deste método apresenta algumas desvantagens devido ao baixo rendimento e a necessidade de conhecimento especializado e estrutura específica, necessita de várias etapas de ultracentrifugação. Outra desvantagem é o alto custo que deve ser empregado em plantas de produção em larga escala necessita, pois, os equipamentos são extremamente caros (Figura 3) (Çelik, *et al.*, 2023; Coughlan *et al.*, 2020).

**Figura 3 – Ultracentrifugação**



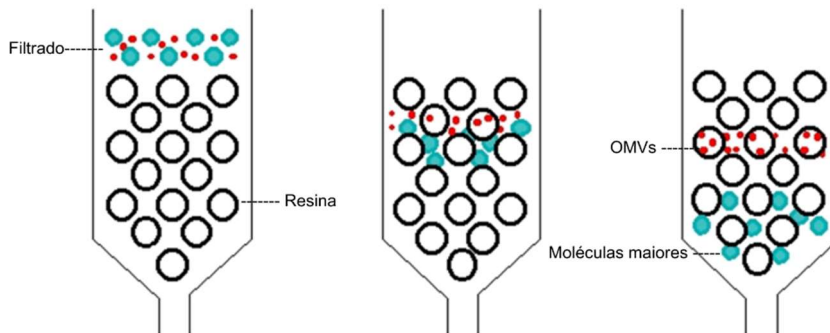
**Fonte:** adaptado de KARP, 2007

### 1.3.2 Gel filtração ou Cromatografia por exclusão

A gel filtração ou cromatografia por exclusão é outra alternativa para purificação das OMVs. Este método é baseado pela exclusão das moléculas através da diferença de tamanho, no caso das vesículas de membrana externa elas são isoladas facilmente e rapidamente. Utiliza-se tampões de lavagem/eluição onde as moléculas maiores de tamanhos são primeiramente eliminadas e as OMVs são eluídas posteriormente. Tem a vantagem de ser um processo mais simples que a ultracentrifugação, além de preservar a integridade das vesículas. Uma de suas desvantagens é devido o volume da amostra inicial ser definido pelo tamanho da coluna utilizada e, conseqüentemente, necessita da complementação do processo de purificação com a utilização de outras técnicas. Em virtude das diferenças dos tamanhos de vesículas, é necessário que haja a definição do tipo de resina que será utilizada de forma precisa, para que não haja perdas significativas do produto de interesse (Figura 4) (Batt *et al.*, 2014; Salwan; Sharma, 2023).



**Figura 4 - Gel filtração**

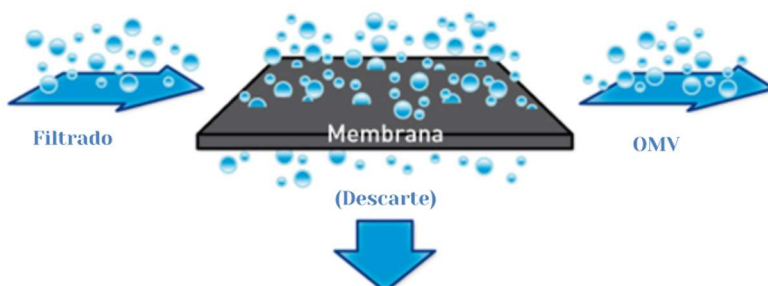


Fonte: adaptado de ALI, 2022

### 1.3.3 Filtração tangencial

Para a realização do processo de purificação pode-se utilizar a ultrafiltração que inclui a filtração tangencial. Esta filtração é um processo em que a amostra (filtrado) é bombeada de forma paralela a membrana que apresenta poros de tamanho específico. Existe um fluxo associado a uma pressão tangencial durante todo o processo que impede o entupimento da membrana permitindo que as vesículas de membrana passem através do sistema de filtração de maneira eficiente (Klimentová; Stulík, 2015; Çelik, *et al.*, 2023). Este método também pode ser utilizado para a etapa de concentração das OMVs e possui diversas vantagens que incluem: o equipamento de filtração é simples de operar, é um sistema que permite a purificação de forma rápida, além de o processo de escalonamento ser menos oneroso quando comparado ao da ultracentrifugação. No entanto apresenta desvantagens de ter maior probabilidade de contaminação por moléculas de mesmo tamanho, pois o processo de filtração está baseado na porosidade da membrana (Figura 5).

**Figura 5 - Filtração tangencial**



Fonte: adaptado de CORDEIRO *et al.*, 2021

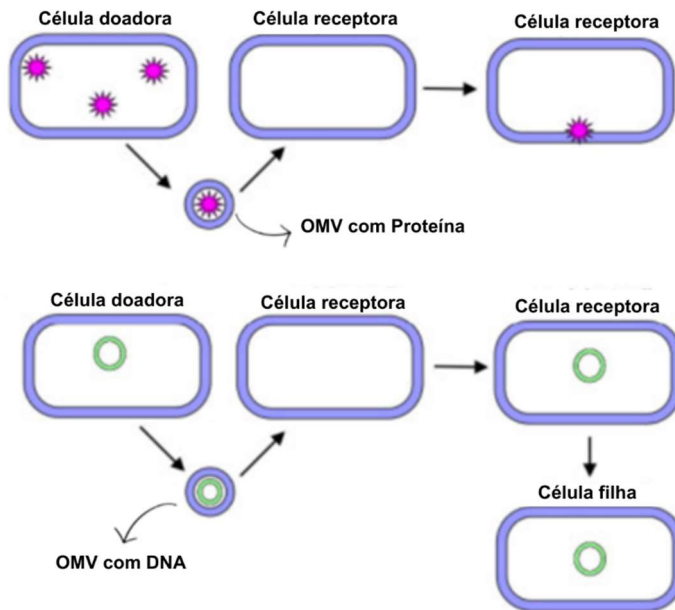
#### 1.4 Possibilidades de uso de OMV em biotecnologia

As OMVs como foi detalhado nos itens anteriores, são importantes estruturas e podem ser aplicadas na área da saúde.

A aplicação das vesículas em plataformas vacinais é um dos usos mais significativos para o tratamento e prevenção de várias doenças infecciosas. Atualmente já existem algumas vacinas licenciadas como: Bexsero®, VA-MENGOC-BC® e a MenBVac®, contra *N. meningitidis* (Vernikos; Medini, 2014; Ochoa-Azze, 2018). O sucesso para o avanço nesta área se dá devido a capacidade da OMV de carrear diversos componentes em virtude de sua composição com a presença de diversos PAMPs assim como a existência de LPS, conferindo características imunogênicas. Isso ocorre através de um mecanismo de comunicação entre OMV-hospedeiro e reconhecimento dos receptores com alta especificidade, gerando uma boa memória imunológica (Van Der Pol; Stork; Van Der Ley, 2015; Li; Liu, 2020; Roier, *et al.*, 2016; Collins; Brown, 2021; Mancini, *et al.*, 2020)

Ação adjuvante é outra possibilidade de uso pois potencializa a resposta imune e dessa forma é possível diminuir a concentração requerida do antígeno. Um dos principais componentes das vesículas responsáveis pela ação adjuvante é o LPS, no entanto é tóxica, assim é necessário realizar modificação através da engenharia genética para obter uma molécula que provoque menores efeitos colaterais. (Li; Liu, 2020).

Infecções bacterianas estão cada vez mais difíceis de serem tratadas através de terapias convencionais de antibióticos, devido ao aumento de bactérias resistentes. Assim a descoberta de que as vesículas também são capazes de carrear antibióticos é um importante sistema para debelar as infecções causadas pelas bactérias Gram-negativas, pois as OMVs são capazes de atravessar a camada dupla do envelope celular destes microrganismos (Figura 6) (Roier, *et al.*, 2016; Collins; Brown, 2021; Mancini, *et al.*, 2020; Çelik, *et al.* 2023).

**Figura 6 - Transporte feito por OMVs**

**Fonte:** adaptado de COLLINS; BROWN, 2021.

Estas vesículas de membrana têm a capacidade de se ligarem as células cancerígenas com auxílio de anticorpos específicos do alvo, podendo proporcionar um diagnóstico precoce através de uma técnica de bioimagem (Gujrati *et al.*, 2019; Jahromi; Fuhrmann, 2021). Além disto as OMVs também podem ser utilizadas na terapia do câncer devido a sua capacidade de ativar o sistema imune do hospedeiro e de se ligar as células tumorais, com isto, facilitando a infiltração de células Natural Killers (NK) e células T em tecidos cancerígenos (Çelik *et al.*, 2023).

## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral do projeto é avaliar a produção de OMV de *E. coli* e de *K. pneumoniae* através da extração por ultracentrifugação e por gel filtração. Objetivo específico é a avaliação da interferência das vesículas sobre o crescimento bacteriano de *E. coli* e *K. pneumoniae*.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Preparo do Lote de trabalho

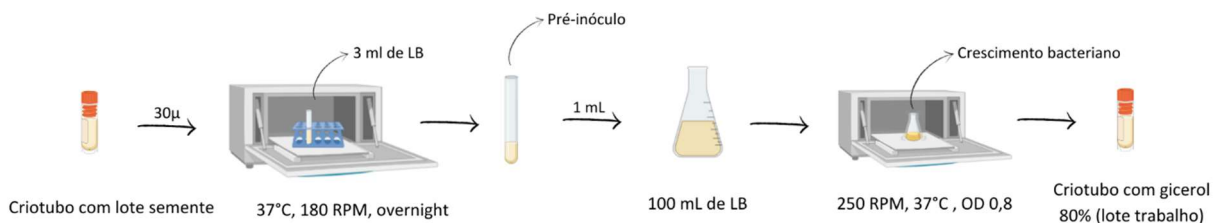
O lote de trabalho foi produzido a partir do Lote semente cedido pelo Hospital Universitário de São Paulo (HU). Foram utilizadas cepas de *E. coli* uropatogênica (EC086) e *K. pneumoniae* hemopatogênica (KP70) sendo que uma alíquota de 30µL foi inicialmente inoculado em tubo de ensaio contendo 3 mL de meio Luria-Bertani (LB) (Tabela 1) para o preparo do pré-inóculo e mantido a temperatura de 37°C e período “overnight” sob agitação. Após este tempo de incubação um volume de 1 mL foi transferido para Erlenmeyer contendo 100 mL de meio LB e mantido sob agitação de 250 RPM em shaker a 37°C até densidade óptica (DO) 600nm de 0,6 a 0,8. O crescimento bacteriano então foi aliqotado em criotubos com glicerol 80% (estéreis) e armazenado a -70°C para a utilização neste estudo (Figura 7).

**Tabela 1** - Meio Luria-Bertani

Triptona	5 g/L
Extrato de Levedura	5 g/L
Cloreto de Sódio NaCl	10 g/L
Água destilada	1 L

Fonte: próprio autor, 2023

**Figura 7** - Preparo do lote trabalho



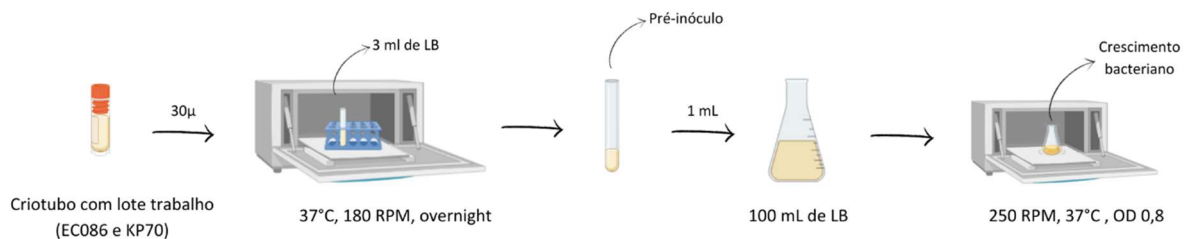
Fonte: próprio autor, 2023

#### 3.2 Cultivo para extração de OMVs

Neste item detalhamos o preparo do cultivo das bactérias para a realização do processo de extração das OMVs. Todos os cultivos iniciaram com o preparo do pré-inóculo em tubo de ensaio e depois transferido para um Erlenmeyer contendo um

volume maior de meio de cultura, crescimento do qual foram extraídas as vesículas. Iniciamos com o preparo do pré-inóculo onde foi adicionado 30µL das cepas *E. coli* uropatogênica (EC086) ou *K. pneumoniae* hemopatogênica (KP70) do lote de trabalho em tubo de ensaio contendo 3 mL de meio Luria-Bertani (LB) e mantido a 37°C a 180 RPM “overnight”. Após este período demos continuidade para o cultivo transferindo 1 mL do pré-inóculo, para um Erlenmeyer contendo 100 mL de meio LB e mantido em agitação sob temperatura de 37°C a 250 RPM até que  $DO_{600nm}$  atingisse 0,8 (Figura 8).

**Figura 8** - Cultivo para extração de OMVs



Fonte: próprio autor, 2023

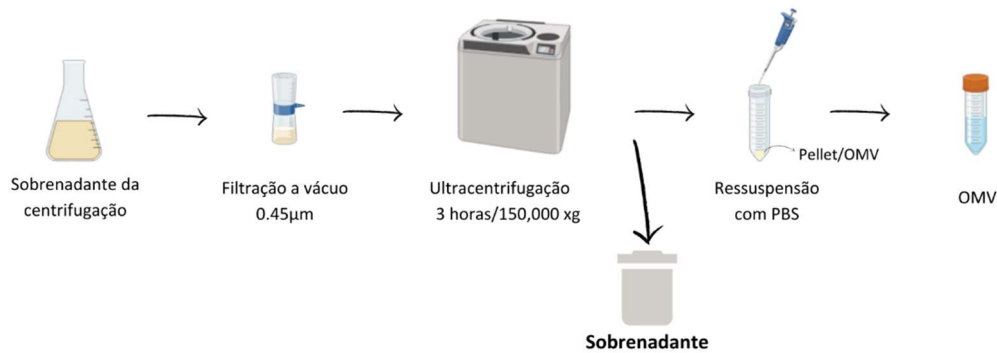
### 3.3 Extração de OMV

Para a extração das OMVs utilizamos dois métodos: ultracentrifugação e gel filtração. O crescimento bacteriano obtido do cultivo foi submetido a uma centrifugação a 7.000 RPM durante 15 minutos. As células foram descartadas e o sobrenadante foi submetido a uma filtração a vácuo utilizando o sistema *Stericup Quick Release Durapore* (Millipore) com filtro de porosidade 0,45µm. O filtrado obtido foi utilizado para ambos os métodos de extração.

#### 3.3.1 Ultracentrifugação

O filtrado 0,45µm obtido da etapa anterior foi ultracentrifugado por 3 horas sob rotação de 150.000 x g, mantido a uma temperatura de 4°C na ultracentrífuga OPTIMA MAX-TL (BECKMAN COULTER). O sobrenadante foi descartado e o “pellet” contendo as OMVs foi ressuscitado em PBS (Tampão Fosfato-Salino) (Figura 9). Com este método obtivemos a OMV EC086-UC e OMV KP70-UC.

**Figura 9** - Extração por Ultracentrifugação

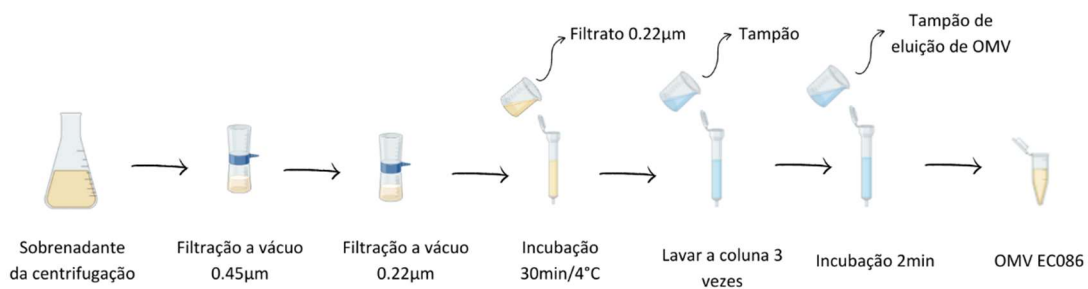


Fonte: próprio autor, 2023

### 3.3.2 Gel filtração

Utilizamos o kit da *System Biosciences* específico para a purificação de OMV, que foi desenvolvido para a extração das vesículas através do tamanho das mesmas. O filtrado 0,45µm foi submetido a uma filtração a vácuo utilizando sistema *Stericup Quick Release Durapore* (Millipore) com filtro de porosidade 0,22µm. A partir desta amostra seguimos o protocolo de extração. Foi transferido 20 mL do filtrado 0,22µm para uma coluna contendo 2 mL de resina (*OMV Binding Resin*) de gel filtração, mantido sob agitação lenta por 30 minutos a 4°C. Após este período de incubação, foram realizadas três lavagens de 15 mL com tampão (*Binding Buffer*). Ao final desta etapa foi então adicionado 1,5 mL de tampão de eluição (*OMV Elution Buffer*) incubando por 2 minutos a temperatura ambiente e sob leve agitação a cada 30 segundos. As OMVs foram então purificadas e recolhidas em microtubo e separado para análise (Figura 10). Foi obtido através deste método de purificação a OMV EC086-GF.

**Figura 10** - Extração por gel filtração



Fonte: próprio autor, 2023

### 3.4 Caracterização das OMVs extraídas

#### 3.4.1 Determinação da concentração de OMVs

A concentração das OMVs (OMV EC086-UC, OMV EC086-GF e OMV KP70-UC) foram verificadas através do método de Lowry que quantifica as proteínas presentes nas vesículas (Lowry, *et al.* 1951). A diluição das mesmas está indicada na Tabela 3. Este método se trata de um ensaio bioquímico colorimétrico responsável por quantificar proteínas, no qual ocorre a redução dos constituintes ativos do reagente folin-fenol, tornando a reação biureto mais sensível (Miwa *et al.*, 2008).

Inicialmente preparamos a curva padrão de proteína utilizando a albumina bovina em uma faixa de concentração de 6,25 µg/ml até 175 µg/ml de acordo com a tabela abaixo (Tabela 2).

**Tabela 2** - Concentração de albumina

Concentração (µL/mL)	Volume da solução de albumina (µL)	Volume da água purificada (µL)
Padrão diluído 10x		
6,25	50	350
12,5	100	300
25	200	200
50	400	0
Padrão estoque		
75	60	340
100	80	320
125	100	300
150	120	280
175	140	260

Fonte: próprio autor, 2023



**Tabela 3** – Diluições das amostras

Amostra	Diluição	Volume de amostra (µL)	Volume de água purificada (µL)
Filtrado 0,45µm/0,22µm	1:10	40	360
Sobrenadante de centrifugação/ ultracentrifugação	1:5	80	320
Eluídos	1:5	80	320
OMV extraída	1:4	100	300

Fonte: próprio autor, 2023

Para cada amostra no volume de 400µL foi adicionado 1,2 mL de reagente A (Tabela 4) previamente diluídas e mantidas em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente. Ao término deste período de incubação foi adicionado 120µL de reagente fenol de Folin 1N, mantido em repouso por 30 minutos em local escuro. A análise foi realizada em espectrofotômetro ASYS UVM 340 a um comprimento de onda de 750nm. O cálculo da concentração de OMVs em microgramas totais (µg) foi realizado através da comparação com a curva padrão de albumina com auxílio do Excel.

**Tabela 4** - Composição do reagente A

Tartarato de sódio 4%	0,5 mL
Sulfato de cobre 2%	0,5 mL
Carbonato de sódio 2%	100 mL

Fonte: próprio autor, 2023

### 3.4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE)

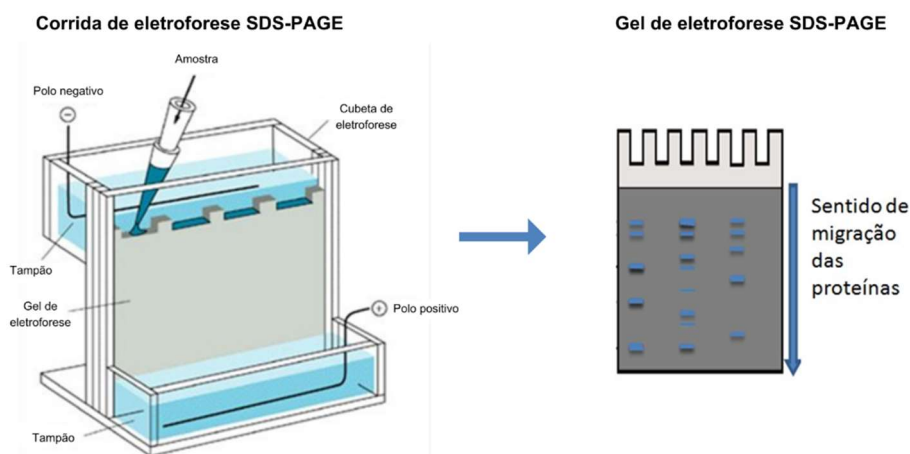
As amostras OMV EC086-GF e OMV KP70-UC foram submetidas a uma corrida de eletroforese para a visualização das proteínas de membrana (OMPs) foi preparado gel de poliacrilamida (SDS – PAGE) com *stacking* na concentração 5% e o *running gel* na concentração de 12%.

As amostras foram anteriormente concentradas, acrescentado 900µL de acetona gelada em 250µL de amostra e mantidas a -20°C por 10 minutos,

centrifugadas por 10 minutos a 7.000 RPM (MIKRO 22R Hettich Zentrifugem) a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado, o “pellet” foi ressuspendido em 15µL de tampão de amostra, fervido a 95°C por 5 minutos. As mesmas foram aplicadas no gel no volume de 15µL por poço. Inicialmente aplicamos a voltagem de 80volts para o *stacking gel* e no *running gel* 100volts (Figura 11).

Para a coloração do gel foi utilizado a prata utilizando o *kit ProteoSilver™*. Primeiramente foi feita a fixação (*Fixing Solution*) mantido sob agitação por 20 minutos, logo após foi feita uma lavagem com etanol 30%, deixado nesta solução por 10 minutos com agitação, seguida da lavagem com água ultrapura por 10 minutos com agitação. Posteriormente seguiu-se com o processo de sensibilização (*Sensitizer Solution*) onde o gel foi mantido nesta solução por 10 minutos sob agitação e feito duas lavagens com água ultrapura por 10 minutos sob agitação. A próxima etapa foi realizada o processo de equilíbrio com prata (*Silver Solution*) por 10 minutos em agitação. Realizou-se mais uma lavagem com água ultrapura por 1,5 minutos sob agitação e finalmente iniciou-se a revelação no qual foi adicionado à solução de *Developer Solution* mantido por 7 minutos. Ao término foi adicionada o *Stop Solution* para cessar a reação seguida da última lavagem com água ultrapura por 15 minutos sob agitação.

**Figura 11** - Corrida de eletroforese SDS-PAGE



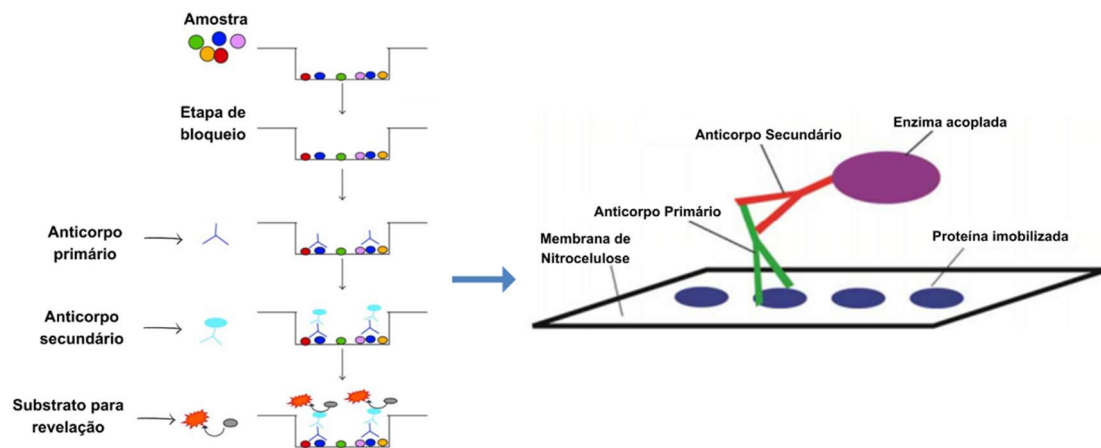
Fonte: próprio autor, 2023

### 3.4.3 Dot-Blot

Utilizamos ensaio imunoenzimático para detectar a presença de OmpA. À membrana de nitrocelulose cortadas em tiras de 1 a 2 cm de largura e 10 cm de

comprimento foi aplicado 10µL das seguintes amostras EC086-UC, EC086-GF e KP70-UC e mantidas a temperatura ambiente até a gota secar totalmente. A etapa de bloqueio foi realizada com uma solução de PBS/tween 20 0,1% leite em pó 3% e mantido sob agitação por período de 1 hora a temperatura ambiente. Na próxima etapa foi adicionado o anticorpo primário a uma concentração 1:1000 e deixado sob agitação a 4°C *overnight*. Posteriormente foram feitas 3 lavagens da membrana com PBS/tween 20 0,1%, sob agitação a cada 5 minutos. Após as lavagens, o conjugado foi preparado na concentração de 1:1000 em uma nova solução de PBS/tween 20 0,1% leite em pó 3% e a fita foi incubada sob agitação por 1 hora a temperatura ambiente. Seguiu-se com 3 lavagens da membrana com PBS/tween 20 0,1%. A revelação foi feita com o kit Sera Care - KPL (*TMB membrane peroxidase substrate system*), com uma solução contendo 1 parte de *Enhancer* para 5 partes de Reagente A e 5 partes do Reagente B. A nitrocelulose foi deixada sob imersão nesta solução reveladora até que fosse possível verificar a revelação (Figura 12).

**Figura 12 - Dot-Blot**



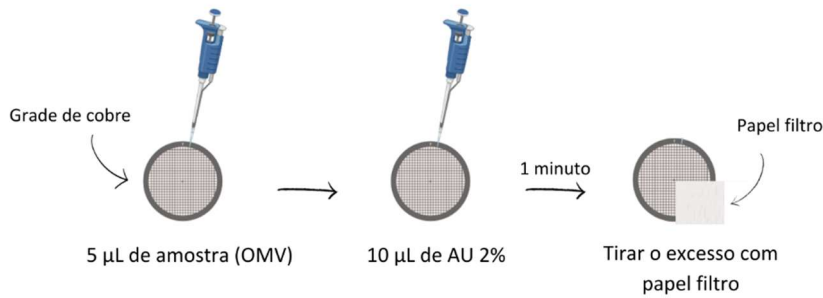
Fonte: adaptado de CAPPIONE *et al.*, 2012.

#### 3.4.4 Microscopia Eletrônica

Para a microscopia eletrônica foram utilizadas as amostras tanto da extração por ultracentrifugação quanto pelo método de gel filtração (EC086-UC, EC086-GF e KP70-UC), a identificação da presença de OMVs. As amostras (5µL) foram tratadas com 10µL de acetado de uranila 2% (AU 2%) sobre grades de cobre de 300 *mesh* recobertas por película de carbono, sendo deixado por 1 minuto. O excesso do

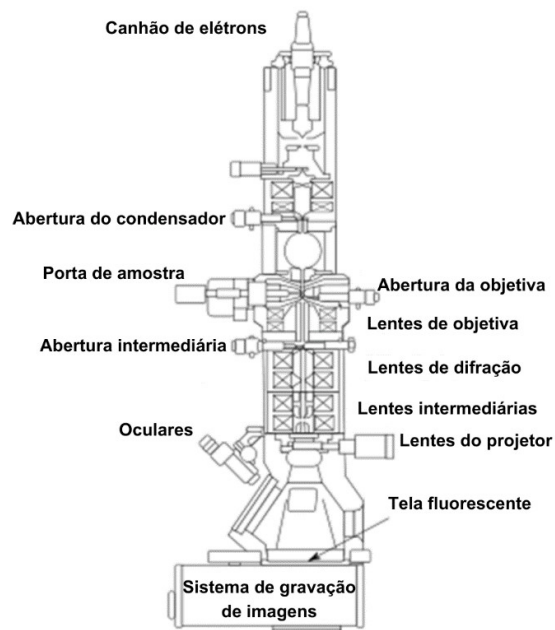
reagente foi absorvido com auxílio de um papel filtro e levado para análise (Figura 13 e Figura 14).

**Figura 13 – Preparo da amostra**



Fonte: adaptado de ALQAHEEM; ALOMAIR, 2020

**Figura 14 - Microscópio eletrônico**



Fonte: próprio autor, 2023; adaptado de ALQAHEEM; ALOMAIR, 2020

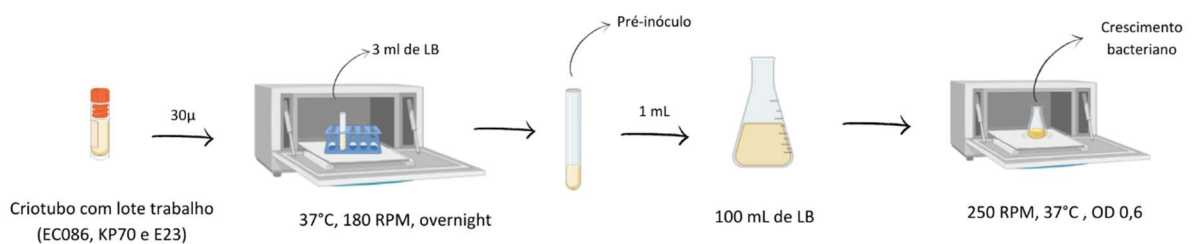
### 3.5 Crescimento bacteriano com OMV

Este teste foi realizado em placa de 96 poços Costar<sup>®</sup> 3599 para verificar o crescimento das cepas EC086, E23 e KP70 com a presença das OMVs extraídas: *E. coli* 086 extraída por ultracentrifugação (EC086-UC), *E. coli* 086 extraída por gel filtração (EC086-GF) e *K. pneumoniae* 70 extraída por ultracentrifugação (KP70-UC)

e mantida em condições pré-determinadas no equipamento Multiscan TECAN RCHISTO INFINITE mPlex.

Iniciamos com o preparo do pré-inóculo onde foi adicionado 30µL das cepas *E. coli* uropatogênica EC086, *E. coli* enteropatogênica E2348/69 ou *K. pneumoniae* hemopatogênica (KP70) dos respectivos lotes de trabalho em tubos de ensaio contendo 3 mL de meio Luria-Bertani (LB) e mantido a 37°C a 180 RPM “overnight”. Após este período demos continuidade para o cultivo transferindo 1 mL do pré-inóculo (de cada cepa) para um Erlenmeyer contendo 100 mL de meio LB e mantido em agitação sob temperatura de 37°C a 250 RPM até que DO<sub>600nm</sub> atingisse 0,6 (Figura 15).

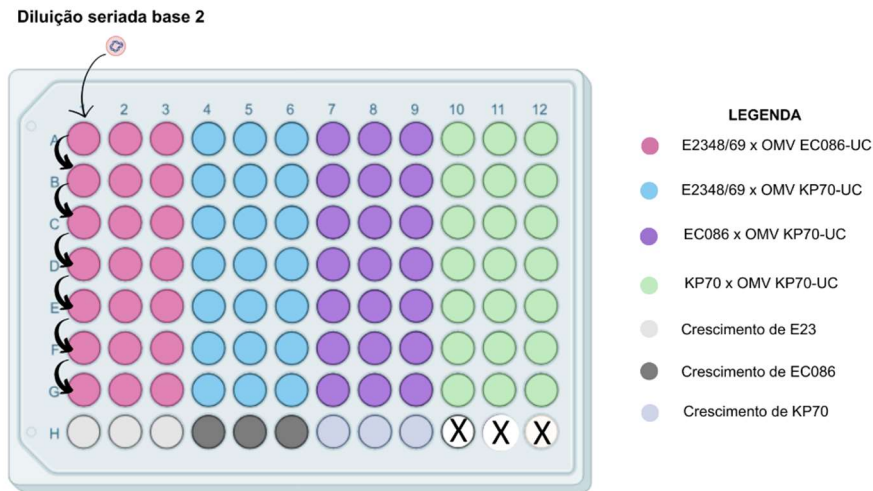
**Figura 15** - Crescimento bacteriano para viabilidade com resazurina



**Fonte:** próprio autor, 2023

Este crescimento foi transferido para a placa de 96 poços, onde previamente havia sido feito a diluição seriada base 2 das OMVs extraídas (EC086-UC, EC086-GF e KP70-UC) (Figura 16). Como verificado na placa, as fileiras de A a G (colunas 1 a 12) foram incubadas com os cultivos da Figura 15 e mantidas em contato com as vesículas extraídas. A fileira H foi dedicada para os controles, ou seja, cultivos da Figura 15 sem presença de OMVs. Esta placa foi mantida no equipamento Multiscan TECAN RCHISTO INFINITE mPlex por 12 horas a 37°C e leitura da DO<sub>600nm</sub> programada a cada 1 hora. Os valores das DOs foram plotadas no gráfico gerando as curvas de crescimento de cada condição.

**Figura 16** - Diagrama placa de crescimento bacteriano

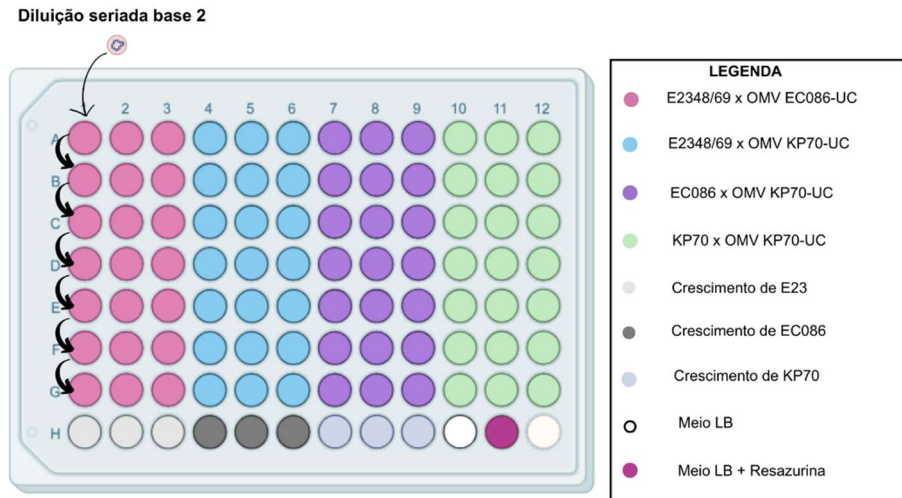


Fonte: próprio autor, 2023

### 3.6 Teste de viabilidade bacteriana com resazurina

Foi realizado um teste para verificar a viabilidade bacteriana sob a ação das seguintes OMVs extraídas: EC086-UC, EC086-GF e KP70-UC. A partir do resultado, foi possível analisar a interferência das vesículas sobre as bactérias eleitas (EC086, E23 e KP70). O resultado da interferência foi baseado na viabilidade bacteriana utilizando a resazurina, corante redox usado para estudos de toxicidade, proliferação e viabilidade. As OMVs foram previamente diluídas diretamente na placa de 96 poços utilizando diluição seriada com base 2 conforme indicado na Figura 17. Em seguida adicionou-se o crescimento bacteriano, das cepas citadas acima e estas foram incubadas conforme o diagrama da placa abaixo (Figura 17). Como verificado na placa, as fileiras de A a G (colunas 1 a 12) foram incubadas com os cultivos da Figura 15 e mantidas em contato com as vesículas extraídas. A fileira H foi dedicada para os controles, ou seja, cultivos da Figura 15 sem presença de OMVs. A placa foi incubada a 37°C no equipamento multiscan TECAN RCHISTO INFINITE mPlex programado para realização da leitura de  $DO_{600nm}$  mantida por período de 12 horas.

**Figura 17 - Diagrama da placa do teste de viabilidade**



Fonte: próprio autor, 2023

Após o período de incubação, foi adicionado 40µL de resazurina (0,2mg/mL) em todos os poços, com exceção do controle (somente meio LB – H10) que foi utilizado como “branco” para os cálculos. A placa foi incubada por mais 1 hora em ambiente escuro seguida de novas leituras no *multiscan* nos comprimentos de onda a 595nm e outra a 550nm. Após estas duas leituras, foram feitos cálculos para determinação da porcentagem de interferência causada pela presença de OMVs no crescimento bacteriano. O primeiro passo foi subtrair a absorbância do meio com resazurina (LBR) do meio sem resazurina (LB), tanto no comprimento de onda menor como no comprimento de onda maior, como visto:

$$Abs\ LBR - Abs\ LB$$

Os valores obtidos são chamados de  $AO_{LW}$  (Abs 550nm) e  $AO_{HW}$  (Abs 595nm), com estes valores foi feito o cálculo de fator de correção (RO), sendo:

$$RO = AO_{LW} \div AO_{HW}$$

Partimos então para o cálculo de porcentagem de resazurina reduzida (AR), com a fórmula:

$$AR = AO_{LW} - (AO_{HW} \times RO) \times 100$$

E finalmente para calcular a porcentagem de interferência, foi feito um cálculo no qual foi utilizado o resultado do AR do crescimento com OMV (ART) dividido pelo crescimento controle (ARC), ou seja:

$$\% \text{ de redução} = (ART \div ARC) \times 100$$

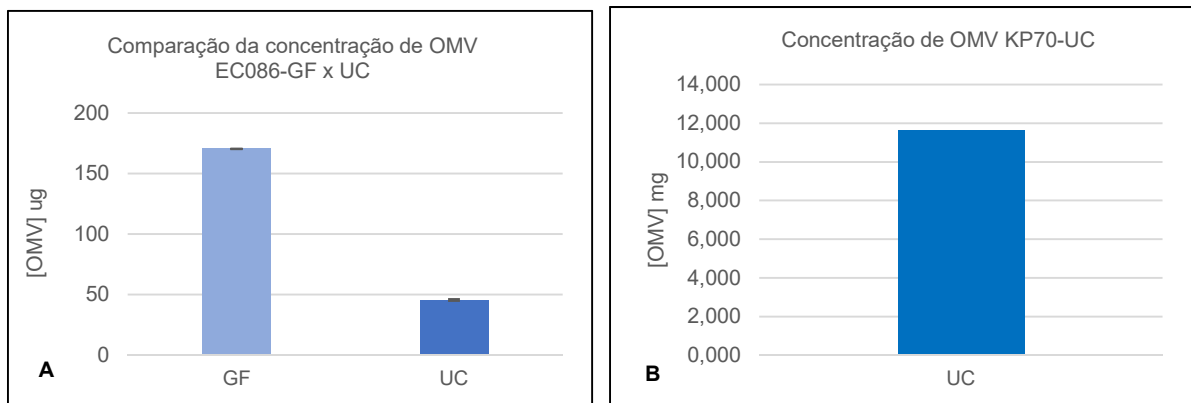
O resultado obtido neste último cálculo foi então subtraído por 100 para que assim obtivéssemos o correspondente a % de interferência.



## 4 RESULTADOS

A concentração de vesículas extraídas da cepa EC086 foi avaliada por Lowry como podemos verificar no Gráfico 1, comparando o método de Gel filtração (GF) e Ultracentrifugação (UC). Ambos os métodos se mostraram eficazes, sendo que houve uma diferença na concentração de rendimento. A primeira promoveu uma concentração de OMVs de 170,420 µg totais e a segunda foi de 45,634 µg totais. No caso da extração de *K. pneumoniae* (KP70) foi utilizado apenas o método de UC, tendo um resultado de 11,654 mg totais.

**Gráfico 1** – Concentração de OMVs extraídas

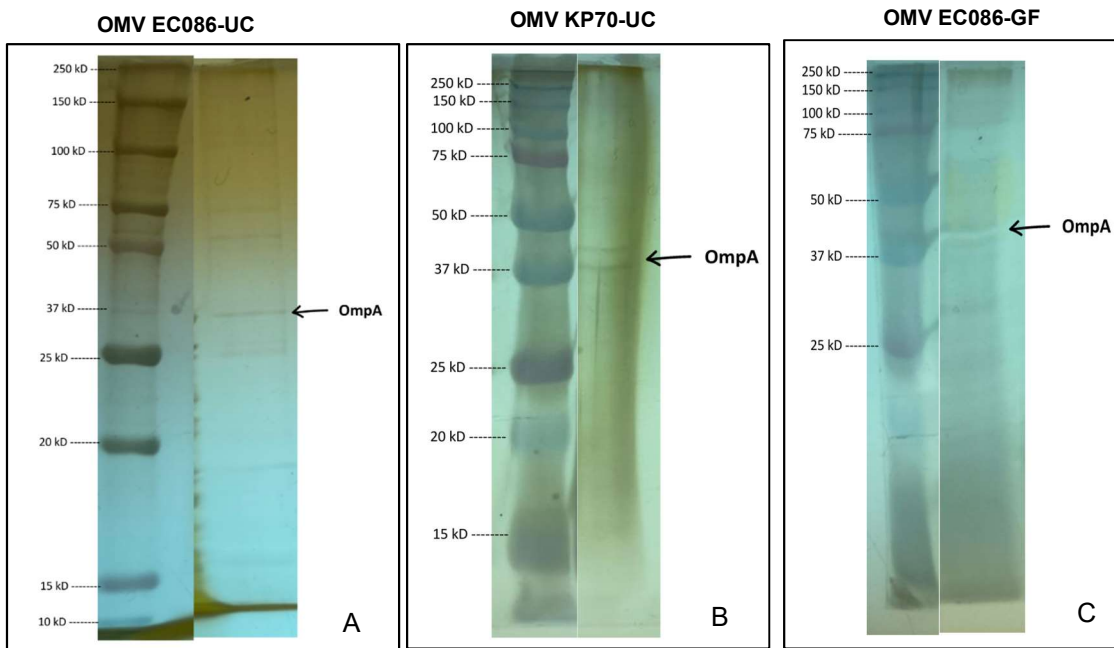


**Fonte:** próprio autor, 2023

**A)** Comparação de GF e UC utilizados para extração de OMVs de EC086; **B)** Extração de OMV de KP70 através de UC

Através da eletroforese em gel SDS-PAGE, observamos na Figura 18A, B e C as diferentes Omps contidas nas OMVs extraída por UC e Gel filtração de *K. pneumoniae* (OMV KP70-UC) e *E. coli* (EC086-UC e EC086-GF). Sinalizamos a OmpA pois está presente em ambas as espécies pois é uma das proteínas mais importantes.

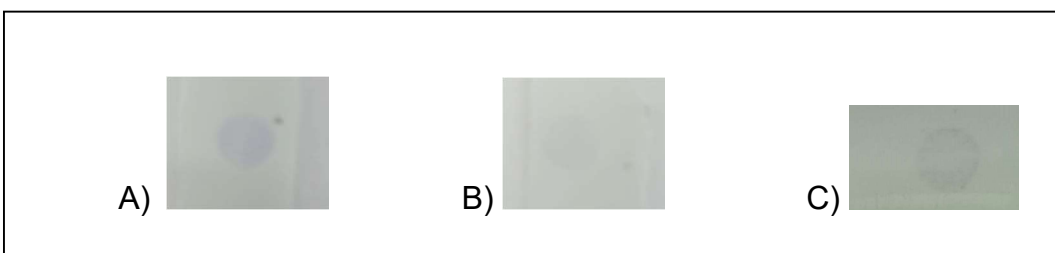
**Figura 18** – Eletroforese SDS-PAGE das OMVs extraídas das cepas EC086 por UC e GF e da cepa KP70 por UC



Fonte: próprio autor, 2023

A presença da OmpA foi comprovada pelo ensaio imunoenzimático DOT-BLOT apresentado na Figura 19 das amostras de OMV EC086-GF, OMV EC086-UC e OMV KP70-UC (Figura 19).

**Figura 19** – OmpA de OMVs extraídas detectada por Dot-Blot

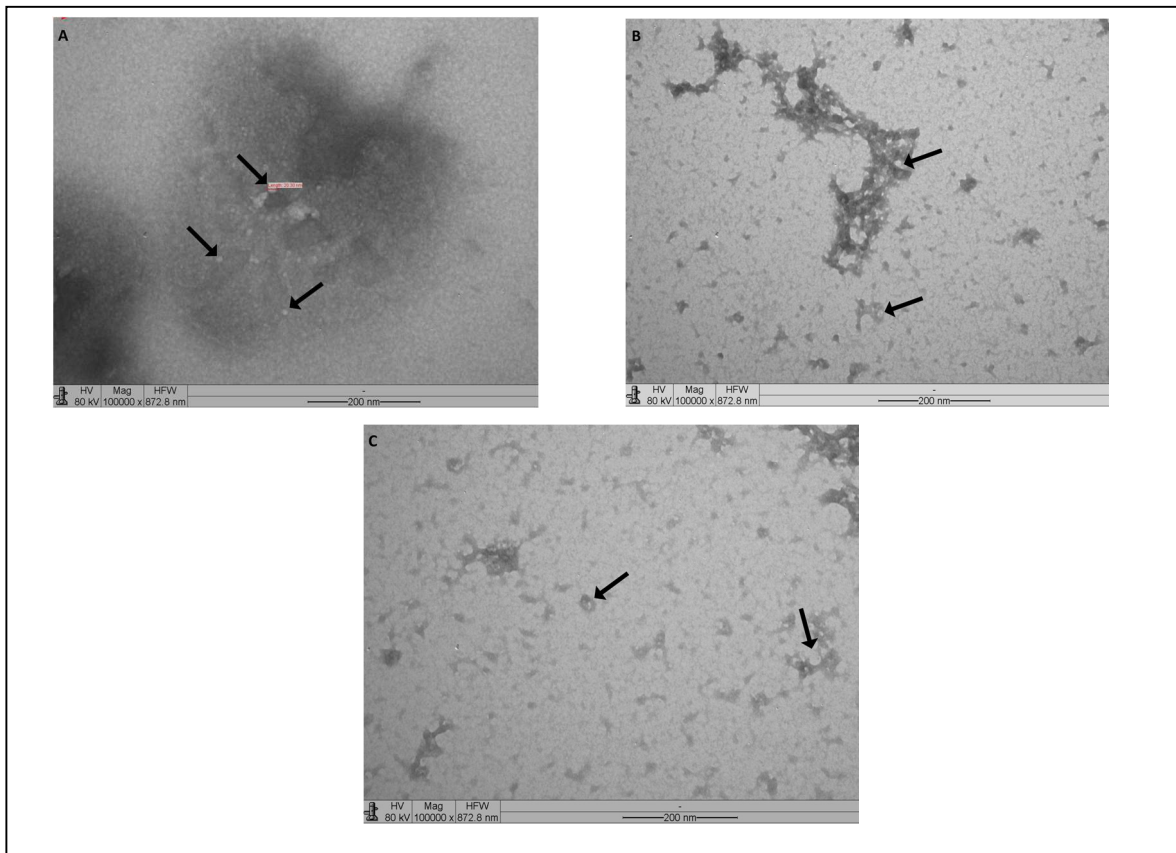


Fonte: próprio autor, 2023

OMVs visualizadas através do Dot-blo, utilizando anticorpo anti-OmpA: (A) OMV EC086-GF; (B) OMV EC086-UC; (C) OMV KP70-UC.

Seguimos com as análises e verificamos por microscopia eletrônica a presença das vesículas extraídas das amostras de OMV KP70-UC, OMV EC086-UC e OMV EC086-G como mostram as Figuras 20A, B, e C.

**Figura 20** - Microscopia eletrônica das amostras OMV KP70-UC, OMV EC086-UC e OMV EC086-GF

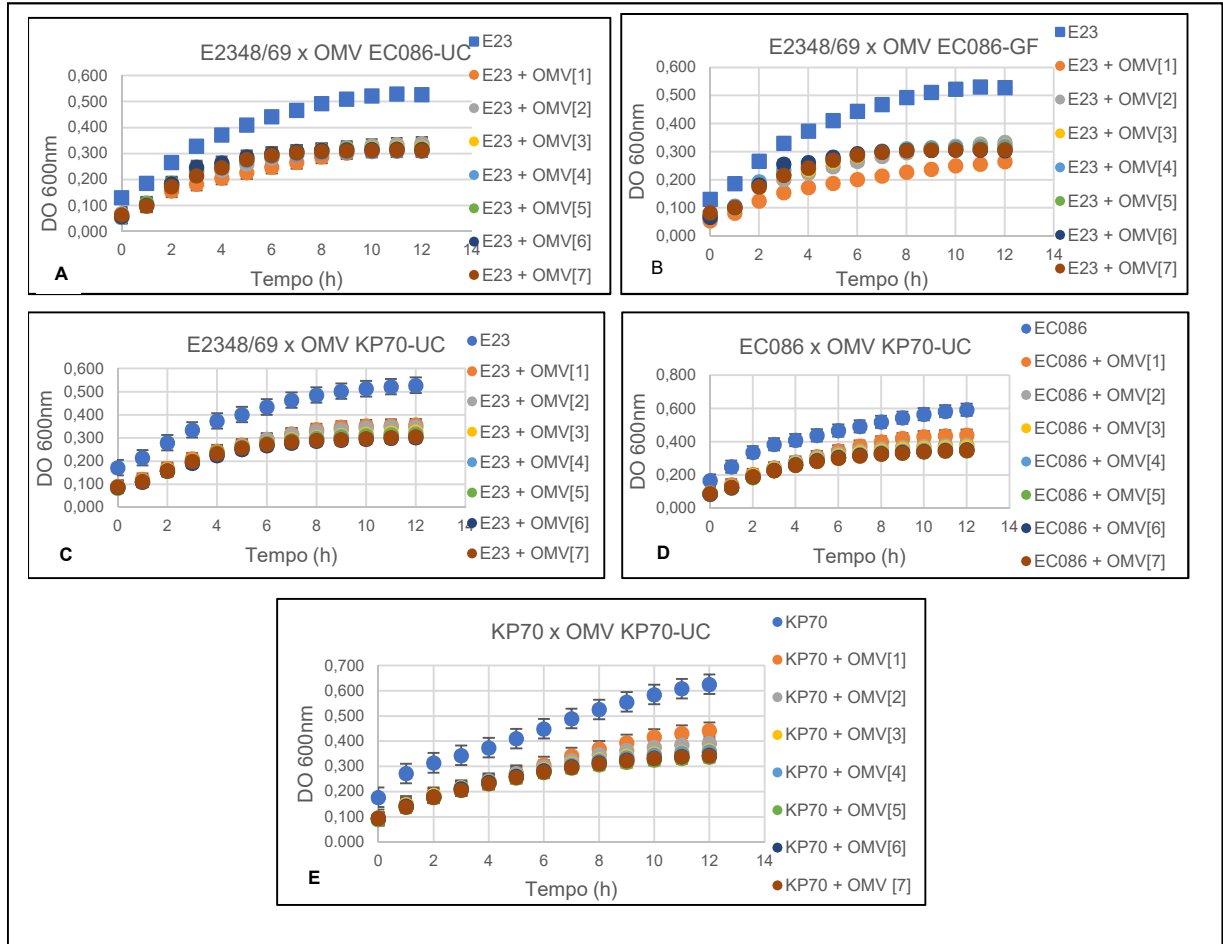


**Fonte:** próprio autor, 2023

Microscopia eletrônica de OMVs extraídas por UC e Gel Filtração: **A)** OMV KP70-UC; **B)** OMV EC086-UC; **C)** OMV EC086-GF

Realizamos o estudo para verificar o crescimento bacteriano das cepas E2348/69, EC06 e KP70 quando incubadas com a presença das OMVs extraídas: OMV EC086-UC, OMV EC086-GF e OMV KP70-UC. Para o controle utilizamos os cultivos sem a presença de OMVs. Nas Figuras 21A, B, C, D e E observamos que o crescimento do controle foi superior as diferentes condições em todos. Além disto foi possível notar que independente da concentração de OMV utilizada as curvas se mostraram semelhantes.

**Figura 21** - Curva de crescimento bacteriano das cepas E23, EC086 e KP70 na presença de OMVs extraídas



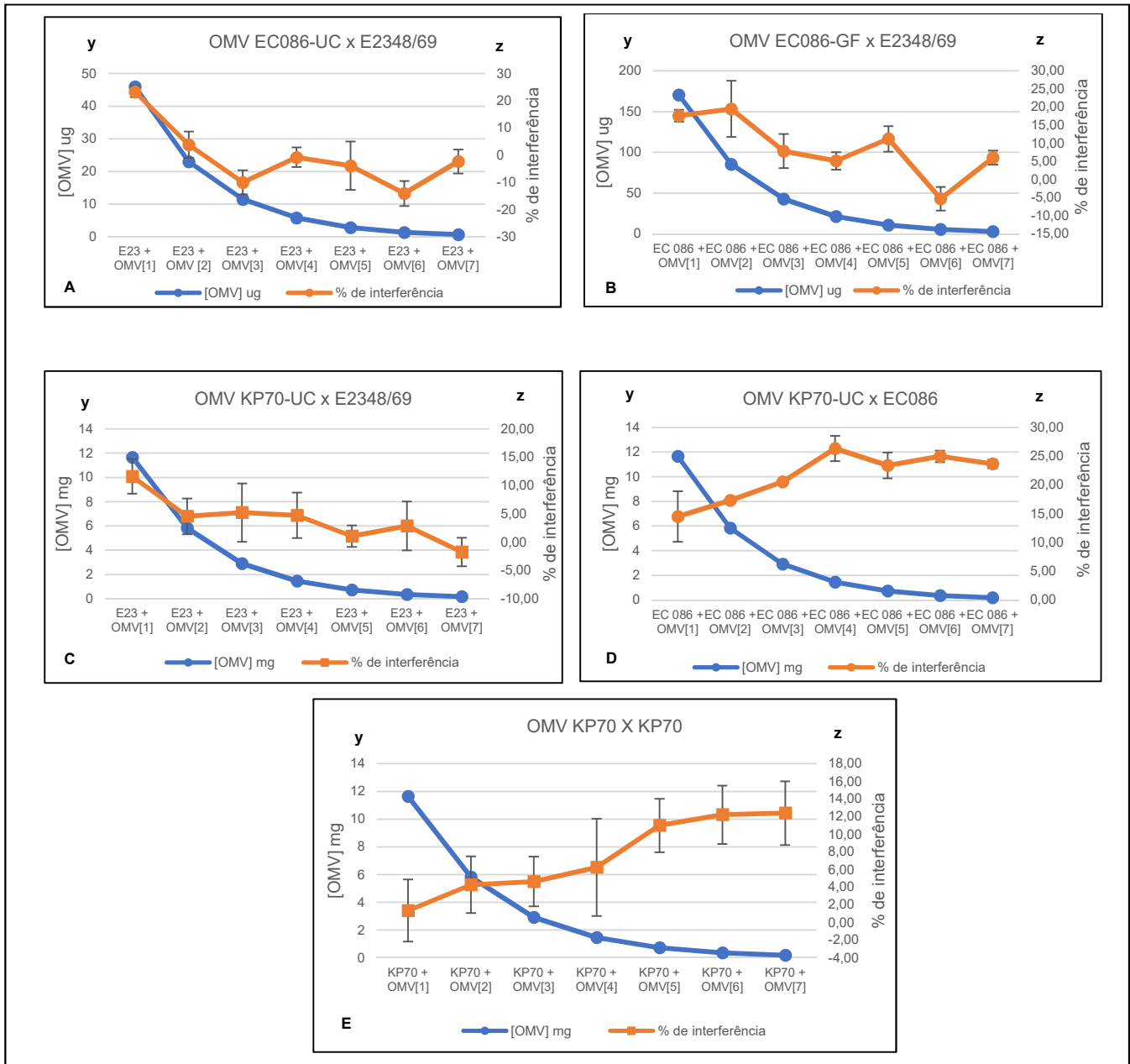
Fonte: próprio autor, 2023

Curva de crescimento das cepas em meio LB sob ação das OMVs extraídas: **A)** Crescimento de E2348/69 sob ação da OMV EC086 extraída por UC; **B)** Crescimento de E2348/69 sob ação da OMV EC086 extraída por GF **C)** Crescimento de E2348/69 sob ação da OMV KP70 extraída por UC; **D)** Crescimento de EC086 sob ação da OMV KP70 extraída por UC; **E)** Crescimento de KP70 sob ação de OMV KP70 extraída por UC;

O teste de viabilidade com resazurina foi feito com amostras de crescimento bacteriano E2348/69, EC06 e KP70 tratadas com OMVs (OMV EC086-UC, OMV EC086-GF e OMV KP70-UC). Observamos os resultados deste teste nas Figuras 22A, B, C, D e E. Plotamos os resultados da concentração de OMVs em  $\mu\text{g}/\text{mg}$  no eixo y e comparado a viabilidade em % no eixo z. É possível notar que a OMV-EC086-UC, OMV EC086-GF e OMV-KP70-UC causaram uma interferência diretamente proporcional quando em contato com a cepa E2348/69 (Figuras 22A, B e C), no

entanto a interferência das vesículas OMV-KP70-UC mantidas em contato com as cepas de EC086 and KP70 foram inversamente proporcionais (Figura 22D e E).

**Figura 22** – Interferência das OMVs extraídas sobre as cepas bacterianas E2348/69, EC086 e KP70



Fonte: próprio autor, 2023

O eixo y indica a concentração de OMVs enquanto o eixo z demonstra a porcentagem de interferência **A**) Interferência de OMV EC086 extraída por UC sob o crescimento de E2348/69; **B**) Interferência de OMV EC086 extraída por GF sob o crescimento de E2348/69; **C**) Interferência de OMV KP70 extraída por UC sob o crescimento de E2348/69; **D**) Interferência de OMV KP70 extraída por UC sob o crescimento de EC086; **E**) Interferência de OMV KP70 extraída por UC sob o crescimento de KP70.

## 5 DISCUSSÃO

Os experimentos realizados foram direcionados para comparar dois métodos de extração das OMVs das cepas de *Escherichia coli* (EC086) e *Klebsiella pneumoniae* (KP70), além da interferência das vesículas das mesmas quando em contato com crescimento das cepas *E. coli* E2348/69, *E. coli* 086 e *K. pneumoniae* 70. Demostramos que obtivemos resultados positivos tanto para a metodologia de extração utilizada assim como para a interferência das vesículas sobre as bactérias eleitas.

Quando comparamos a extração por gel filtração e a ultracentrifugação, observamos que a GF promoveu um maior rendimento do que a extração por UC, fato que provavelmente ocorreu devido a especificidade da resina utilizada no kit de extração de OMV desenvolvido pela empresa System Biosciences. Este kit foi escolhido para realizar as extrações pois avaliamos o protocolo e verificamos que se tratava de um método de extração robusto para atingirmos nossos objetivos. De acordo com Post *et al.* (2005) a gel filtração promove uma maior pureza da OMVs e isso foi verificado no caso das vesículas extraídas de *N. meningitidis* (Klimentová; Stulík, 2015).

Durante cada etapa do processo de extração, realizamos protocolos de controle de processo de caracterização das OMVs, como: verificar a presença proteínas de membrana externas (Omps), visualização das OMVs por microscopia eletrônica. (Klimentová; Stulík, 2015)

Primeiramente analisamos a concentração de Omps pelo método de Lowry da cepa *E. coli* 086 onde a concentração final de proteínas totais extraídas por gel filtração apresentou uma porcentagem de aproximadamente 27% superior quando comparada a ultracentrifugação. Isso provavelmente ocorreu devido a especificidade a resina utilizada na gel filtração, mas é possível obtermos rendimentos maiores na ultracentrifugação desde de que o volume de cultivo seja aumentado (Klimentová; Stulík, 2015; Post *et al.*, 2005).

Dando continuidade as análises, verificamos através da eletroforese (SDS-PAGE) nas amostras de OMVs de KP70-UC, EC086-UC e EC086-GF a existência de diversas bandas de proteínas, sendo que identificamos a OmpA com peso molecular de 37KDa. Pudemos verificar OmpA em todos os géis mostrando que tanto a *K. pneumoniae* e *E.coli* estudadas possuem esta proteína de membrana. Essa constatação também foi verificada por Jeannin *et al.* (2002), eles verificaram que as

bactérias da família *Enterobacteriaceae* apresentam esta proteína de forma bastante conservada. Esclarecemos, que a OmpA, como comentado anteriormente, é considerada muito importante para os microrganismos Gram-negativos, pois exerce diversas funções primordiais para a sua sobrevivência como: estrutura bacteriana; adaptação aos fatores de estresse; importantes na adesão, invasão de danos nos tecidos dos hospedeiros; atividade imunológica quando utilizada em vacinas (Jeannin *et al.*, 2002; Confer; Ayalew, 2013; Zanella *et al.*, 2021; Kurupati *et al.*, 2006).

Posteriormente, afim de comprovar a presença desta OmpA foi feito o ensaio imunoenzimático das seguintes amostras OMV EC086-GF, OMV EC086-UC e OMV KP70-UC, onde utilizamos o anticorpo primário anti-OmpA e o secundário marcado com peroxidase. Notamos uma revelação mais nítida na extração por GF de EC086 indicando uma possível maior quantidade OmpA, resultado condizente à concentração superior de proteínas totais das amostras extraídas por gel filtração (Zanella *et al.*, 2021; Kurupati *et al.*, 2006).

Após a análise dos resultados acima citados, seguimos com a microscopia eletrônica das mesmas amostras OMV EC086-GF, OMV EC086-UC e OMV KP70-UC, observamos então a presença de várias OMVs, independentemente do método de extração. A princípio não notamos nenhuma diferença estrutural entre as metodologias estudadas, no entanto necessitamos nos aprofundar para obtermos imagens mais elucidativas (Klimentová; Stulík, 2015).

Partimos então para a verificação da interferência das OMV EC086-GF, OMV EC086-UC e OMV KP70-UC nos cultivos das cepas de EC086, E2348/69 e KP70. A interferência das OMVs foi avaliada pelo conjunto dos resultados da densidade óptica (DO) da curva de crescimento das cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae* testadas e a viabilidade. Quando verificamos os gráficos da Figura 21 observamos semelhanças no padrão das curvas de crescimento nas diferentes combinações de vesículas extraídas e as bactérias cultivadas. Analisando somente os resultados destes gráficos (Figura 21) podemos inferir que a presença de OMV no crescimento bacteriano diminuiu a absorbância, ou seja, concluímos que houve a inibição do crescimento bacteriano na presença das OMVs. No entanto, após a análise dos resultados de viabilidade bacteriana com a adição da resazurina (Figura 22A, 22B, 22C, 22D e 22E), foi possível observar que as bactérias se mantiveram viáveis mesmo após 12 horas em contato com as OMVs. Ainda notamos uma relação diretamente proporcional entre a curva de concentração de OMV em relação a curva de interferência quando

mantidas em contato com a E2348/69 tanto de OMV EC086-GF, OMV EC086-UC como de OMV KP70-UC (Figura 22A, 22B e 22C). Este padrão foi inversamente proporcional quando testamos OMV KP70-UC tanto sobre o crescimento bacteriano da própria KP70 e EC086. Vários fatores de estresse interferem na proliferação bacteriana, e como verificamos as cepas que sofreram maior interferência foram aquelas testadas com OMVs extraídas de cepas diferentes, ou seja, provavelmente isso ocorreu, pois a OMV agiu como um fator de estresse no crescimento bacteriano. (Confer; Ayalew, 2013)



## 6 CONCLUSÃO

Os estudos realizados possibilitaram a conclusão de importantes aspectos. Inicialmente, verificamos que apesar da UC ter promovido menor rendimento quando comparado com a GF, diversos estudos mostram que ambos os métodos são escalonáveis. Existem outros métodos de extração de OMVs cada qual com suas vantagens e desvantagens, dessa forma são necessários estudos detalhados para a análise de qual é a melhor estratégia a ser utilizada, no caso da implementação de uma planta em larga escala.

Esclarecemos também que a interferência da OMVs sobre o crescimento das diversas bactérias testadas, não pode ser somente baseada na densidade óptica da curva de crescimento, mas sim fazer uma análise conjunta com a viabilidade bacteriana. Caso isso não ocorra, a conclusão baseada somente em um parâmetro gerará um resultado errado.

As OMVs são moléculas de grande utilidade para a área da medicina, possui diversas funções fundamentais para a sobrevivência das bactérias Gram negativas, no entanto é necessário definir as condições de cultivo para que as cepas sejam verdadeiras “fábricas” de produção destas vesículas. O conhecimento profundo da biogênese, proteômica, genômica, função, métodos de extração, mecanismos de estresse entre outros aspectos e com suporte da bioinformática é possível desenvolver bactérias hipervesiculantes. Assim utilizando as diversas ferramentas da biotecnologia conseguiremos gerar poderosas bionanopartículas com capacidade de carrear diversas moléculas e serem aplicadas em diversas áreas da imunologia especialmente para o tratamento de infecções hospitalares.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

ALEKSHUN, M; LEVY, S. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. **Cell**. v. 128, n. 6, p. 1037-1050, 2007

ALQAHEEM, Y; ALOMAIR A. Microscopy and Spectroscopy Techniques for Characterization of Polymeric Membranes. **Membranes**. v. 10, n. 2, p. 33, 2020. doi:10.3390/membranes10020033.

ALI, A. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A Review. **Annals of Advances in Chemistry**. v. 6, n. 1, p. 010–020, 2022. doi:10.29328/journal.aac.1001026.

ALVAREZ-ORTEGA, C. *et al.* The intrinsic resistome of *Pseudomonas aeruginosa* to  $\beta$ -lactams. **Virulence**. v. 2, n. 2, p. 144–146, 2011 doi: 10.4161/viru.2.2.15014

ANTONELLI, G. *et al.* Strategies to Tackle Antimicrobial Resistance: The Example of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **International journal of molecular sciences**. v. 22, n. 9, p. 4943, 2021 doi: 10.3390/ijms22094943

BAKER, J. *et al.* Microbial biosynthesis of designer outer membrane vesicles. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 29, Oct, p. 76-84, 2014. doi: 10.1016/j.copbio.2014.02.018.

BATT, C. *et al.* Encyclopedia of Food Microbiology, Three-Volume Set. **Academic Press**, 2014.

BAUMGARTEN, T. *et al.* Membrane Vesicle Formation as a Multiple-Stress Response Mechanism Enhances *Pseudomonas Putida* DOT-T1E Cell Surface Hydrophobicity and Biofilm Formation. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 78, n. 17, p. 6217–6224, 2012. doi:10.1128/aem.01525-12.

---

<sup>1</sup> ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro. ABNT, 2018

BEVERIDGE, T. Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles. **Journal of Bacteriology**. v. 181, n. 16, p. 4725–4733, 1999 doi:10.1128/jb.181.16.4725-4733.1999.

BISHOP, D; WORK, E. An extracellular glycolipid produced by *Escherichia coli* grown under lysine-limiting conditions. **Biochem J**. v. 96, n. 2, p. 567-76, 1965 doi: 10.1042/bj0960567.

BRASIL. Ministério da Saúde. AGÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE SUPLEMENTAR (ANS). **ANS alerta sobre o controle das infecções hospitalares**. Brasília, DF, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/ans/pt-br/assuntos/noticias/qualidade-da-saude/ans-alerta-sobre-o-controle-das-infecoes-hospitalares>

CAPPIONE, A. *et al.* Rapid Screening of the Epidermal Growth Factor Receptor Phosphosignaling Pathway via Microplate-Based Dot Blot Assays. **International Journal of Proteomics**. v. 2012, p. 1–7, 2012. doi:10.1155/2012/473843.

CARUANA, J; WALPER, S. Bacterial Membrane Vesicles as Mediators of Microbe – Microbe and Microbe – Host Community Interactions. **Frontiers in Microbiology**. v. 11, 2020. doi:10.3389/fmicb.2020.00432.

CHATTOPADHYA, M; JAGANANDHAM, M. Vesicles-Mediated Resistance to Antibiotics in Bacteria. **Frontiers in Microbiology**. v. 6, 2015, doi:10.3389/fmicb.2015.00758.

COLLINS, S; BROWN, A. Bacterial Outer Membrane Vesicles as Antibiotic Delivery Vehicles. **Front Immunol**. v. 20, n. 12, 2021. doi: 10.3389/fimmu.2021.733064.

CONFER, A; AYALEW, S. The OmpA family of proteins: Roles in bacterial pathogenesis and immunity. **Veterinary microbiology**. v. 163, n. 3–4, p. 207–222, 2013. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.08.019

COUGHLAN, C. *et al.* Exosome Isolation by Ultracentrifugation and Precipitation and Techniques for Downstream Analyses. **[Current Protocols in Cell Biology]**. v. 88, n. 1, p. e110, 2020. doi:10.1002/cpcb.110.

CORDEIRO, C. *et al.* Ciência e Tecnologia de Alimentos: Pesquisa e Práticas Contemporâneas - Volume 2. Editora Científica Digital, 2021.

CULLER, H. *et al.* Role of SdiA on Biofilm Formation by Atypical Enteropathogenic Escherichia Coli. **Genes**. v. 9, n. 5, p. 253, 2018. doi:10.3390/genes9050253.

ÇELIK, P. *et al.* Bacterial Membrane Vesicles as Smart Drug Delivery and Carrier Systems: A New Nanosystems Tool for Current Anticancer and Antimicrobial Therapy. **Pharmaceutics**. v. 15, n. 4, p. 1052, 2023. doi:10.3390/pharmaceutics15041052.

DAVIES, J; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiol Mol Biol Rev**. v. 74, p. 417–33, 2010. doi: 10.1128/MMBR.00016-10

DEATHERAGE, B; COOKSON, B. Membrane Vesicle Release in Bacteria, Eukaryotes, and Archaea: A Conserved yet Underappreciated Aspect of Microbial Life. **Infection and Immunity**. v. 80, n. 6, p. 1948–1957, 2012. doi:10.1128/iai.06014-11.

EUSÉBIO, A. *et al.* Escherichia coli nas infeções urinárias da comunidade: comensal ou patogénica? **Acta Urológica Portuguesa**. v. 33, n. 2, p. 37–42, 2016.

FURUYAMA, N; SIRCILI, M. Outer Membrane Vesicles (OMVs) Produced by Gram-Negative Bacteria: Structure, Functions, Biogenesis, and Vaccine Application. **BioMed Research International**. v. 2021, p. 1–16, 2021. doi:10.1155/2021/1490732.

GERRITZEN, M. *et al.* Sulfate Depletion Triggers Overproduction of Phospholipids and the Release of Outer Membrane Vesicles by *Neisseria Meningitidis*. **Scientific Reports**. v. 9, n. 1, 2019, doi:10.1038/s41598-019-41233-x.

GUERRERO-MANDUJANO, A. *et al.* The Outer Membrane Vesicles: Secretion System Type Zero. **Traffic**. v. 18, n. 7, p. 425–432, 2017. doi:10.1111/tra.12488.

GUJRATI, V. *et al.* Bioengineered Bacterial Vesicles as Biological Nano-Heaters for Optoacoustic Imaging. **Nature Communications**. v. 10, n. 1, p. 1–10, 2019. doi:10.1038/s41467-019-09034-y

JAHROMI, L; FUHRMANN, G. Bacterial Extracellular Vesicles: Understanding Biology Promotes Applications as Nanopharmaceuticals. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 173, p. 125–140, 2021. doi:10.1016/j.addr.2021.03.012.

JAIN, S; PILLAI, J. Bacterial Membrane Vesicles as Novel Nanosystems for Drug Delivery. **International Journal of Nanomedicine**. v. 12, p. 6329–6341, 2017 doi:10.2147/ijn.s137368.

JEANNIN, P. *et al.* Outer membrane protein A (OmpA): a new pathogen-associated molecular pattern that interacts with antigen presenting cells—impact on vaccine strategies. **Vaccine**. v. 20, p. A23–A27, 2002a. doi: 10.1016/s0264-410x(02)00383-3

JOHNSTON, E. *et al.* The effect of altered pH growth conditions on the production, composition, and proteomes of *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles. **Proteomics**. 2023. doi: 10.1002/pmic.202300269

KARP, G. Cell and Molecular Biology: Study Guide: Concepts and Experiments. 5th ed., John Wiley & Sons, 2007.

KLIMENTOVÁ, J; STULÍK, J. Methods of Isolation and Purification of Outer Membrane Vesicles from Gram-Negative Bacteria. **Microbiological Research**. v. 170, p. 1–9, 2015. doi:10.1016/j.micres.2014.09.006.

KNOX, K; VESK, M; WORK, E. Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysine-limited culture of *Escherichia coli*. **J Bacteriol.** v. 92, n. 4, p. 1206-17, 1966. doi: 10.1128/jb.92.4.1206-1217.1966.

KOBAYASHI, T. *et al.* Clinical and Microbiological Characteristics of Recurrent *Escherichia Coli* Bacteremia. **Microbiology Spectrum.** v. 9, n. 3, 2021. doi:10.1128/spectrum.01399-21.

KULKARNI, H; JAGANNADHAM, M. Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria. **Microbiology Society.** v. 160, n. 10, 2014. doi: 10.1099/mic.0.079400-0.

KURUPATI, P. *et al.* Identification of vaccine candidate antigens of an ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* clinical strain by immunoproteome analysis. **Proteomics.** v. 6, n. 3, p. 836–844, 2006. doi: 0.1002/pmic.200500214

LEE, E.-Y. *et al.* Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: Proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. **Proteomics.** v. 9, n. 24, p. 5425–5436, 2009. doi: 10.002/pmic.200900338.

LEITE, B. *et al.* Integration Host Factor Is Important for Biofilm Formation by *Salmonella Enterica* Enteritidis. **Pathogens and Disease.** v. 75, n. 6, p. ftx074, 2017. doi:10.1093/femspd/ftx074.

LI, M. *et al.* Bacterial outer membrane vesicles as a platform for biomedical applications: An update. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society.** v. 323, p. 253–268, 2020. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.04.031

LI, R.; LIU, Q. Engineered bacterial outer membrane vesicles as multifunctional delivery platforms. **Frontiers in materials.** v. 7, 2020. doi: 10.3389/fmats.2020.00202

LIVERMORE, M. The Need for New Antibiotics. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. v. 10, p. 1–9, 2004. doi:10.1111/j.1465-0691.2004.1004.x.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. v. 193, n. 1, p. 265–75, 1951.

MACDONALD, I; KUEHN M. Stress-Induced Outer Membrane Vesicle Production by *Pseudomonas Aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**. v. 195, n. 13, p. 2971–2981, 2013. doi:10.1128/jb.02267-12.

MANCINI, F. *et al.* OMV Vaccines and the Role of TLR Agonists in Immune Response. **Int J Mol Sci**. v. 21, n. 12, p. 4416, 2020. doi: 10.3390/ijms21124416.

MARTIN, R; BACHMAN, M. “Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella Pneumoniae*.” **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 8, 2018. doi:10.3389/fcimb.2018.00004.

MIWA, A. *et al.* Avaliação de métodos espectrofotométricos para determinação de proteína em amostras de lagoas de estabilização. **Engenharia sanitária e ambiental**. v. 13, n. 2, p. 236–242, 2008. doi:10.1590/s1413-41522008000200014.

NIE, D. *et al.* Outer Membrane Protein A (OmpA) as a Potential Therapeutic Target for *Acinetobacter Baumannii* Infection. **Journal of Biomedical Science**. v. 27, n. 1, 2020, doi:10.1186/s12929-020-0617-7.

OCHOA-AZZE, R. Cross-protection induced by VA-MENGOC-BC® vaccine. **Hum Vaccin Immunother**. v. 14, n. 5, p. 1064-1068, 2018. doi: 10.1080/21645515.2018.1438028.

POST, D. *et al.* Biochemical and functional characterization of membrane blebs purified from *Neisseria meningitidis* serogroup B. **The journal of biological chemistry**. v. 280, n. 46, p. 38383–38394, 2005. doi: 10.1074/jbc.M508063200

RABIN, N. *et al.* Biofilm Formation Mechanisms and Targets for Developing Antibiofilm Agents. **Future Medicinal Chemistry**. v. 7, n. 4, p. 493–512, 2015. doi:10.4155/fmc.15.6.

ROIER, S. *et al.* A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. **Nat Commun**, v. 7, p. 10515, 2016. doi: 10.1038/ncomms10515.

ROSINI, R. *et al.* Vaccines Against Antimicrobial Resistance. **Front. Immunol., Sec. Vaccines and Molecular Therapeutics**. v. 11, 2020. Doi: 10.3389/fimmu.2020.01048.

SALWAN, R; SHARMA, V. Laboratory Methods in Microbiology and Molecular Biology: Methods in Molecular Microbiology. Edited by Richa Salwan and Vivek Sharma, **Academic Press**, 2023.

SCHWECHHEIMER, C; KUEHN, M. Outer-Membrane Vesicles from Gram-Negative Bacteria: Biogenesis and Functions. **Nature Reviews. Microbiology**. v. 13, n. 10, p. 605–619, 2015. doi:10.1038/nrmicro3525.

SCHWECHHEIMER, C. *et al.* Modulation of Bacterial Outer Membrane Vesicle Production by Envelope Structure and Content. **BMC Microbiology**. v. 14, n. 1, 2014. doi:10.1186/s12866-014-0324-1.

TWIGG, R. Oxidation-Reduction Aspects of Resazurin. **Nature**. v. 155, n. 3935, p. 401-402, 1945. doi: 10.1038/155401a0

VAN DE WATERBEEMD, B. *et al.* Cysteine Depletion Causes Oxidative Stress and Triggers Outer Membrane Vesicle Release by *Neisseria Meningitidis*; Implications for Vaccine Development. **PLoS One**. v. 8, n. 1, 2013, p. e54314, doi:10.1371/journal.pone.0054314.



VAN DER POL, L.; STORK, M.; VAN DER LEY, P. Outer membrane vesicles as platform vaccine technology. **Biotechnology journal**. v. 10, n. 11, p. 1689–1706, 2015. doi: 10.1002/biot.201400395

VERNIKOS, G; MEDINI, D. Bexsero® chronicle. **Pathog Glob Health**. v. 108, n. 7, p. 305-16, 2014. doi: 10.1179/2047773214Y.0000000162.

VILA, J. *et al.* Escherichia coli: an old friend with new tidings. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 40, n. 4, p. 437–463, 2016. Doi: 10.1093/femsre/fuw005

Wang, G. *et al.* The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of Klebsiella Pneumoniae. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. v. 17, n. 17, p. 6278, 2020. doi:10.3390/ijerph17176278.

WHO. **World Health Organization**. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. Switzerland. 2014. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241564748>

WHO. **World Health Organization**. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. Switzerland. 2016. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763>

WHO. **World Health Organization**. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Switzerland. 2017. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

YE, C. *et al.* Inappropriate Use of Antibiotics Exacerbates Inflammation through OMV-Induced Pyroptosis in MDR Klebsiella Pneumoniae Infection. **Cell Reports**. v. 36, n. 12, p. 109750, 2021. doi:10.1016/j.celrep.2021.109750.

ZANELLA, I. *et al.* Proteome-minimized outer membrane vesicles from Escherichia coli as a generalized vaccine platform. **Journal of extracellular vesicles**. v. 10, n. 4, 2021. doi: 10.1002/jev2.12066