

**Adrianny Santana Lopes**

**Caracterização de Vesículas Extracelulares  
de *Clostridioides difficile***



**Monografia apresentada ao Instituto de  
Microbiologia Paulo de Góes, da  
Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
como pré-requisito para a obtenção do  
grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**

**RIO DE JANEIRO**

**DEZEMBRO 2017**

**Trabalho realizado pela aluna Adrianny Santana Lopes, no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do Professor Leandro Araújo Lobo e coorientação da professora Karla Rodrigues Miranda.**

## FICHA CATALOGRÁFICA

### CIP - Catalogação na Publicação

S864c      Santana Lopes, Adrianny  
              Caracterização de Vesículas Extracelulares de  
              Clostridioides difficile / Adrianny Santana Lopes.  
              - Rio de Janeiro, 2017.  
              64 f.

              Orientador: Leandro Araújo Lobo.  
              Coorientadora: Karla Rodrigues Miranda.  
              Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
              Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto  
              de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:  
              Microbiologia e Imunologia, 2017.

              1. Clostridioides difficile . 2. Vesículas  
              Extracelulares. I. Araújo Lobo, Leandro, orient.  
              II. Rodrigues Miranda, Karla, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

(FOLHA DE APROVAÇÃO)

## **Agradecimentos**

Digo (quer dizer, dígit) essas palavras do fundo do meu coração a todos vocês e apesar de eu não ser nem um pouco boa com palavras. Primeiramente, gostaria de agradecer aos professores que tive em minha vida. Apesar de eu não me lembrar de todos vocês, e cada um tendo importância maior ou menor na minha formação, foi tudo que vocês me passaram que me permitiu chegar aqui e ser quem eu sou. Inclusive, gostaria de dar ênfase aos que me influenciaram a amar Biologia e aos que salvaram de falar burrices como “Bolsomito 2018”, “Revolução de 64” ou “Bandido bom é bandido morto”. Obrigada, graças a vocês eu não sou uma completa idiota.

Em segundo lugar, eu gostaria de agradecer à Alexandria Elbakyan, a fundadora do site de ciência mais incrível do mundo, o Sci-Hub (por favor, não morra nunca). Graças a você a divulgação de conhecimento se torna universal de domínio público.

Além disso, gostaria de agradecer aos meus pais, Gleyci e Marcelo, que apesar de estarem em terceiro lugar nessa lista são os principais responsáveis por me proporcionar educação, saúde, carinho e oportunidades. Minha mãe, a pessoa mais mandona que eu conheço, mas também com o coração mais mole do mundo. Você é a melhor mãe do mundo (e eu não falo isso para ser puxa saco, porque você é tão boa nisso que você adota todos os meus amigos e primos) e é também meu grande exemplo como profissional e em honestidade, apesar de você não ver nem 10% disso. Meu pai, um grande reclamão e implicante, mas no final só quer o meu bem. Você me ensina a cada dia que problemas são passageiros e que a gente é capaz de lidar com eles e inclusive supera-los, apesar de você ser pessimista quanto a isso, é um grande exemplo. Vocês não medem esforços para me ajudar e eu sou muito grata, amo vocês.

À minha família, que a cada encontro é um motivo de felicidade diferente, e que é responsável pela inveja de alguns amigos por eu ansiar tanto chegar a época de Natal. Aos meus primos Denise (que é minha irmã de criação implicante), Stephanie (a nerd da família que parece comigo), Dany (a outra bióloga que me faz acreditar que um dia possa ser bem sucedida), Luiza Marina (a grande comediante) e Allan (o rapper com os bordões mais divertidos). Às minhas tias Lady, que tá sempre presente e do meu lado e Bel, a grande figura da família. Aos filhotes mais fofos do mundo, Heitor e Lucca, que trouxeram uma nova alegria pra família. E por fim à minhas avós, Nadir (não sei o que

seria da minha vida sem você, maravilhosa) e Mimi ou Míriam que infelizmente não está mais entre nós, mas tenho certeza de onde estiver está muito feliz. E a Nanny (sim, estou agradecendo à minha cachorrinha), por ser a carinhosa e fofa do Universo.

Ao meu namorado, Lukas, um exemplar raro de aquariano que tem coração e que me atura por mais de 5 anos em uma relação de namoro e amizade incrível. Você me incentiva a conquistar cada vez mais. Obrigada por estar sempre do meu lado, inclusive quando eu estou bêbada sendo insuportável (mas isso é muito raro porque eu sou legal sempre). Gostaria de agradecer também aos seus pais, Marília e Sylvio que me ajudaram muito durante a graduação e na sofrência da vida acadêmica.

Ao meu orientador Leandro Lobo, que aturou todas as minhas crises de “nada dá certo”, “não tem material”, “mas você disse o contrário” e “tá tudo ruim”, apesar de provavelmente ele não se lembrar de nenhuma delas. Por animar o laboratório com todas as suas brincadeiras e pelas competições de fotos mais constrangedoras suas que você nem liga e por também ser bastante compreensível e paciente com seus alunos. À Karlinha, melhor coorientadora que tá sempre presente e com sorriso no rosto e sendo fofa (apesar dela afirmar que não é bem assim, mas eu discordo), até quando tem que me ajudar nas burocracias e ajudando sempre que pode. À Renatinha, o grande anjo desse trabalho, e que sem ela boa parte do trabalho não existiria já que ela sempre me ajudou e acompanhou quando precisei. Por todos os esporros que você me dá sobre a minha sinceridade extrema (eu sei que você se diverte muito com elas) e dizer “Então, você não pode falar assim... apesar de ser verdade”. Você merece tudo de bom, inclusive várias cervejas de trigo e um bom fígado para aturar todas elas. À Banca, Lili (que parece saber de tudo), Camilla (metódica que aturou minhas trapalhadas) e Márcio (desculpa pelo problema no seu laboratório) que eu fiz questão de estarem aqui e melhoraram esse trabalho.

À todos os Anaeróbios, que são a segunda grande família que eu tenho (e põe grande nisso) que alegram os meus dias e somam cada vez mais em conhecimento, experiência e parceria. Aos que já foram citados (agradeço novamente), ao Quim (que faz todo laboratório funcionar), Karinne (a Ramona), Scarlatte, Andressa, Giovanna, Mayara, Kelly, Marcela, Felipe e Heidi (tem que citar junto), Juliana, Semiramis e todos os outros (me perdoem não citar todos mas não cabe aqui, não cabe mas vocês todos são

importantes). Obrigada por casa risada e conhecimento que vocês me passaram. Obrigada Glover Box. Volta.

Aos meus queridos amigos não importa de onde vocês são e quanto tempo não nos vemos, vocês estão nessa página e no meu coração. À Marcellinha (a médica que eu consulto sobre qualquer problema aleatório), Luiza (a minha gêmea, que me ajudou muito durante a minha vida), Luisa, Sofia, Arthur (o Rei?), Bibiel, Lara, Bia, Agathinha (A gathinha), Sereno, Thuany, Lucas, Veveca e todos os outros que me divertiram e me apoiaram em todos os momentos. Às meninas da Master's/Perfil que me distraíram e aliviaram a pressão do dia a dia.

Não menos importante, gostaria de agradecer e à Netflix e a cachaça/ vodka que me permitiram me manter viva (até certo ponto) e com a minha sanidade mental durante esses 4 anos, principalmente nas matérias de Imunologia e na escrita do meu TCC

A todo o Instituto de Microbiologia Paulo de Góes. A todos os servidores da UFRJ, em especial o André e a Dilma que salvaram à minha graduação. Espero que vocês sejam respeitados e recebam seus salários dignamente. Á Renata Carvalho do Inmetro que me ajudou com as microscopias e fotos lindas e a Priscila e Joelma da FIOCRUZ a me aturarem fazendo os procedimentos de proteômica.

Às instituições de apoio a pesquisa, CNPq, PIBIC, CAPES e FAPERJ.

**“Tem que ter esperança,  
porque hoje em dia está muito  
difícil viver de realidade.”**

Adrianny Lopes



## RESUMO

ADRIANNY SANTANA LOPES

### CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE *Clostridioides difficile*

Leandro Araújo Lobo:

**Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

Vesículas extracelulares são produtos celulares importantes capazes de transportar uma variedade de moléculas concentradas, sob a proteção de fatores ambientais externos. O patógeno anaeróbico *Clostridioides difficile* é capaz de liberar essas estruturas, porém, até então a presença de toxinas neste componente celular, a liberação dessas vesículas, a descrição de sua população e o tamanho não foram descritas. Além disso, a técnica utilizada não incluía o gradiente de densidade, importante para uma melhor purificação de vesículas. Este estudo é importante para elucidar o mecanismo de liberação de vesículas, bem como um estudo de sua população, que ainda é pouco conhecido em microvesículas, especialmente em organismos que possuem parede celular, como *C. difficile*. O estudo também enriquece o conhecimento da área de ação desta estrutura, que também é capaz de transportar toxinas, e pode ser um fator que auxilia a patogênese bacteriana. No presente estudo, é possível sugerir a liberação de toxinas através de vesículas de *C. difficile*, especialmente a toxina B, que é considerada mais importante na patogênese. Também foi possível obter imagens de vesículas purificadas e identificar vesículas de tamanhos entre 70 e 500 nm, com uma média de cerca de 150 nm. Além disso, as imagens Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia Eletrônica de Transmissão mostraram que a vesícula é liberada pelas bactérias na localização terminal e subterminal, e também ocorre durante região aonde ocorre a bipartição.

**Palavras-chave:** Vesículas Extracelulares; *Clostridioides difficile*.

## ABSTRACT

ADRIANNY SANTANA LOPES

### CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR VESICLES OF *Clostridioides difficile*

Leandro Araújo Lobo:

**Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

Extracellular vesicles are important cellular products capable of carrying many types of concentrated molecules and protected them from environmental factors. The anaerobic pathogen *Clostridioides difficile* is able to release these structures, but until then, the presence of toxins in this cellular component, the shedding of this cell vesicle, description of the population and size. Besides, the technique used did not include the density gradient, important for better vesicle purification. This study is important to elucidate the mechanism of vesicle budding, as well as a study of its population, which is still little known in microvesicles, especially in organisms that have cell wall, such as *C. difficile*. The study also enriches the knowledge of the area of action of this structure, which is capable of carrying toxins as well, and can be a factor that helps bacterial pathogenesis. The present study suggests the release of toxins via vesicles from *C. difficile*, especially B toxin, which is considered to be more important in the pathogenesis. It was also possible to obtain images of purified vesicles and to identify vesicles of sizes between 70 and 500 nm, with an average around 150 nm. In addition, Scanning Electronic Microscopy and Transmission Electronic Microscopy images showed that the vesicle is released by the bacteria in the terminal and subterminal location, and also occurs in the region related to the bipartition site.

**Key-words: Extracellular Vesicles; *Clostridioides difficile*.**

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> – Representação da interação vesícula extracelular com a célula alvo _____	5
<b>Figura 2</b> – Ilustração do modelo da vesícula extracelular proveniente de bactérias _____	7
<b>Figura 3</b> – Esquema de hipóteses da projeção de vesículas em gram positivas _____	9
<b>Figura 4</b> – Esquema de funcionamento das TcdA e TcdB de <i>C. difficile</i> _____	16
<b>Figura 5</b> – Esquema de funcionamento de CDT de <i>C. difficile</i> _____	17
<b>Figura 6</b> – Imagem de MEV da projeção de vesículas em <i>C. difficile</i> _____	32
<b>Figura 7</b> – Imagem de MET das vesículas isoladas das três cepas de <i>C. difficile</i> _____	33
<b>Figura 8</b> – Gráfico de população e proporções das vesículas liberadas de <i>C. difficile</i> _____	33
<b>Figura 9</b> – Imagens de géis de poliacrilamida com proteínas contidas nas frações do gradiente _____	34
<b>Figura 10</b> – Imagem do teste de ELISA para detecção de toxinas A e B de <i>C. difficile</i> _____	35
<b>Figura 11</b> – Imagens referentes ao “Western Blotting” para detecção de toxinas A e B de <i>C. difficile</i> _____	35

## ÍNDICE

I.	Ficha Catalográfica	iii.
II.	Folha de Aprovação	iv.
III.	Agradecimentos	ix.
IV.	Epígrafe	viii.
V.	Resumo	ix.
VI.	Abstract	x.
VII.	Lista de Figuras	xi.
1.	INTRODUÇÃO	
1.1	Vesículas	
1.1.1	Vesículas Extracelulares	1
1.1.2	Vesículas em Procariotos	6
1.2	<i>Clostridioides difficile</i>	
1.2.1	Microbiota Intestinal e Colonização	12
1.2.2	Histórico	13
1.2.3	Fatores de Virulência	14
1.2.4	NAP1/BI/027	18
1.2.5	Manifestações Clínicas	19
1.2.6	Epidemiologia	20
1.2.7	Diagnóstico e Tratamento	22
2.	JUSTIFICATIVA	24
3.	OBJETIVOS	
3.1	Objetivos Gerais	25
3.2	Etapas do Estudo	25

4.	MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1	Cepas Bacterianas	26
4.2	Microscopia Eletrônica de Varredura	26
4.3	Microscopia Eletrônica de Transmissão	27
4.4	Extração de Vesículas Extracelulares	28
4.5	ELISA	28
4.6	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)	29
4.7	“Western Blotting”	29
5.	RESULTADOS	
5.1	Microscopia Eletrônica de Varredura	31
5.2	Microscopia Eletrônica de Transmissão	31
5.3	SDS- PAGE	31
5.4	ELISA	34
5.5	“Western Blotting”	35
6.	DISCUSSÃO	36
7.	CONCLUSÃO	41
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Vesículas

### 1.1.1. Vesículas Extracelulares

As vesículas extracelulares (VEs) são estruturas secretadas por células, normalmente esféricas e contendo em seu espaço interno diversas moléculas. Estas estruturas são delimitadas por membrana, sendo esta capaz de separar o meio interno do externo, o que impede o extravasamento do material, mantendo-o concentrado e protegido de ação de enzimas e condições ambientais (Mulcahy, Pink e Carter, 2014). O conteúdo carregado pode vir tanto no interior da vesícula como também estar ancorado em sua membrana e pode ser formado por proteínas, glicoproteínas, RNA, DNA e lipídeos. Com isso, essa estrutura é capaz de se envolver em transporte e comunicação celular, intervindo em processos fisiológicos, patológicos e regulação da homeostase (Yané-Mó *et al.*, 2015).

As VEs já foram encontradas em todos os três domínios da vida, sendo um processo descrito em arqueas (Rachel *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2015), bactérias gram negativas (Kolodziejek *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2017a), bactérias gram positivas (Rivera *et al.*, 2010; Gurung *et al.*, 2011), fungos (Oliveira *et al.*, 2010; Albuquerque *et al.*, 2009), parasitas (Beauvillain *et al.*, 2009; Campos *et al.*, 2010), animais (Fais, 2013; Wang *et al.*, 2015) e recentemente em plantas (Regente *et al.*, 2009; Rutter e Innes, 2017). O fato de sua produção ter sido relatado em todos os domínios indica que esse é um fenômeno conservado geneticamente (Deatherage e Cookson, 2012). Consequentemente, esses produtos celulares também podem ser encontrados em uma variedade de locais no corpo humano, como na urina, saliva, sangue, fezes, líquido sinovial e amniótico, bile, fluidos cerebrospinal, broncoalveolar, nasal e uterino no leite materno (Yané-Mo *et al.*, 2015). Recentemente, houve um aumento nos estudos de caracterização de vesículas presentes no oceano, inclusive em regiões de baixa temperatura como no mar da Antártica (Frias *et al.*, 2010; Biller *et al.*, 2014). Além disso, esse material já foi encontrado em alimentos e bebidas como uvas e cerveja (Stensballe e Bennike, 2014; Pérez-Bermúdez *et al.*, 2017).

Existem diversos nomes descritos para se referir a essas estruturas como, por exemplo: micropartículas, ectossomas ou nanovesículas. Com isso, houve uma grande confusão no meio científico na denominação desse componente celular, aonde um nome começou a ganhar diversos significados de acordo com a concepção de cada autor. Diante disso, a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV, do inglês “*International Society for Extracellular Vesicles*”) criou uma padronização para resolver essa situação (Gould e Raposo, 2013). O termo Vesículas Extracelulares é responsável por englobar todos os tipos de vesículas. Dentre essas denominações, três definem classificações de vesículas, que se referem a processos diferenciados de formação, sendo eles: Corpos Apoptóticos (CAs), Exossomas e Microvesículas (Cheung *et al.*, 2016).

A formação de CAs, no processo conhecido como apoptose (ou morte celular programada), é caracterizado pela liberação de fragmentos celulares em forma de vesículas heterogêneas de 50 a 5000 nm contendo todo o material celular empacotado (Théry *et al.*, 2001; Mathivanan, Ji e Simpson, 2010). É um fenômeno morfológico que ocorre normalmente como meio de manutenção da homeostase em tecidos (Reed, 2000; Elmore, 2007). Porém, em diversas circunstâncias, o mecanismo de balanço da apoptose pode estar desregulado, levando à destruição celular desnecessária, e com isso esse processo pode estar relacionada à doenças como no caso do Alzheimer, Parkinson, Hudson e Esclerose Lateral Amiotrófica (Elmore, 2007; Favalaro *et al.*, 2012). A apoptose ocorre somente em animais multicelulares, apesar de recentemente estudos debaterem evidências desse processo em seres unicelulares como bactérias (Bayles, 2014), fungos e parasitas (Kaczanowski, Sajid e Reece, 2011) e em plantas (Reape e McCabe, 2010), embora esses processos sejam descritos como “*apoptosis-like death*” (ALD) por esses autores. A diferença entre os processos é que ALD possui menor condensação da cromatina, não possui receptores de morte celular (presentes na membrana celular antes da lise) que indica a fagocitose e outros fatores-chave como, por exemplo, a sinalização por caspases (Leist e Jäättelä, 2001).

A apoptose pode ocorrer por duas vias principais: a interna e a externa. A via interna se inicia na própria célula e ocorre por via mitocondrial como resposta a fatores como hipóxia, dano ao DNA, estresse oxidativo e altas concentrações de cálcio. Esses fatores levam ao aumento da permeabilidade da mitocôndria, formação do apoptossoma e ativação da caspase 9. Já a via externa vai ocorrer pela ativação de um receptor de morte por ligantes de morte como Fas e TNF (do inglês “*Tumor Necrosis Factor*”), que vão

ativar domínios de morte intracelular e formação do DISC (do inglês “*Death-Inducing Signalling Complex*”), ativando a caspase 8. Uma vez ativadas as caspases 8 ou 9, haverá a clivagem de proteínas do citosol e a ativação da caspase 3, chamada de via de ativação que leva a fragmentação e condensação do DNA, degradação do núcleo e das proteínas do citoesqueleto, mudanças conformacionais da célula e formação dos CAs. Essas vesículas consistem em um aglomerado de organelas integras e empacotadas com moléculas do citoplasma, contendo ou não fragmentos nucleares. Essas estruturas serão posteriormente fagocitadas por macrófagos e sua formação é importante já que não há reação de inflamação por falta do extravasamento de material intracelular no meio externo (Leist e Jäättelä, 2001; Elmore, 2007).

Por sua vez, os exossomas são estruturas originadas de Corpos Multivesiculares (CMVs), que envolve um processo de endocitose na membrana plasmática (MP), formando uma vesícula no interior da célula chamado de CMV. Esse corpo maior irá sofrer novas invaginações formando vesículas intraluminares (VILs). O CMV irá se fundir com a MP liberando o conteúdo formado pelas VILs, sendo essas então conhecidas como exossomas (Colombo, Raposo e Théry, 2014; Yanéz-Mo *et al.*, 2015). Essas vesículas apresentam tamanho de 30 a 100 nm e atuam na transferência de RNA, modulação de câncer, processo de secreção e principalmente, em processos do sistema imune (György *et al.*, 2011). Essas estruturas são encontradas em eucariotos, desde células unicelulares, como fungos à células de mamíferos (Lopez-Verrilli e Court, 2013).

Esses produtos celulares costumam ter composição proteica característica, tendo marcadores moleculares bem definidos, como proteínas de fusão, de transporte (anexinas e flotinas respectivamente), proteínas de choque térmico (HSP, do inglês “*heat shock protein*”) grupo de diferenciação (CDs, do inglês “*Cluster of Differentiation*”) e entre outras moléculas como fosfolipases (Quin e Xu, 2014). Um estudo feito com células dendríticas de ratos e humanos analisou o perfil proteico dos exossomas e concluiu que 80% delas era conservadas entre as espécies. Além disso, essas proteínas e alguns outros grupos de proteínas também são encontrados em outros tipos celulares (Théry, Zitvogel e Amigorena, 2002). A produção dessas vesículas pode ser alterada por diversos fatores, como a concentração de cálcio, ionóforos de cálcio, fosfatidilinositol 3-quinase, diferenças de pH e estresse celular. A exposição de células à hipóxia, por exemplo, pode levar a uma produção de exossomas específicos que podem estimular a angiogênese (Baran *et al.*, 2009; Zhang e Grizzle, 2014).



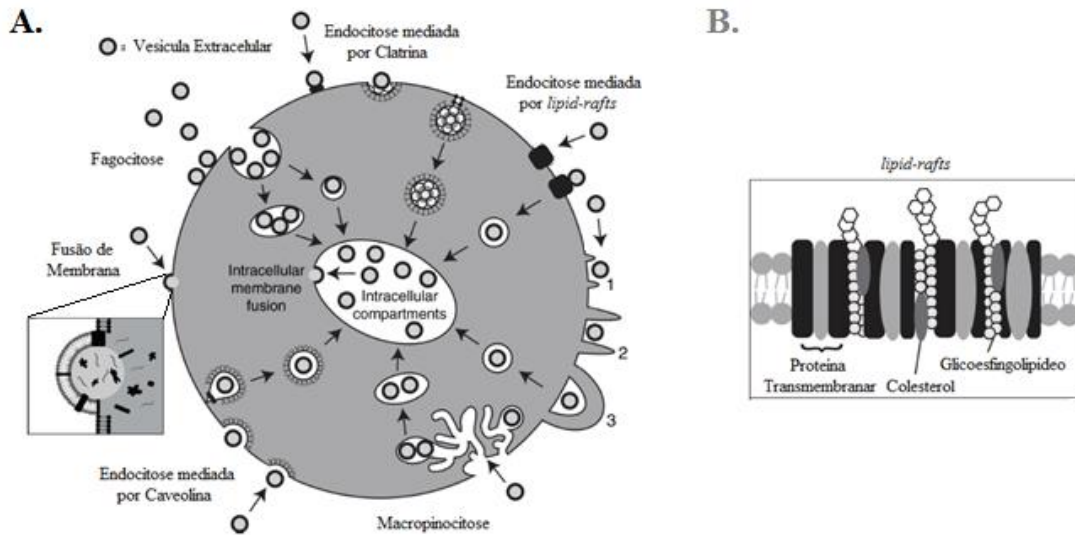
Já as microvesículas são vesículas originadas diretamente da membrana plasmática, tendo tamanhos bastante variados, entre 100 a 1000 nm (Guörgey *et al.*, 2011). Esse processo requer reposição da MP, pois a presença/ausência desse mecanismo pode alterar o tamanho celular. A princípio, uma vez liberadas no meio extracelular, é comum confundir a origem de exossomas e microvesículas. No entanto, é possível identificar a origem de cada estrutura através de características diferenciadas. A microvesícula, por exemplo, apresenta tamanho maior, maior presença de proteínas de membrana e de proteínas internas (Cocucci e Meldolesi, 2015).

Todos três tipos celulares (eucariotos, procariotos e arqueas) são capazes de liberar vesículas originadas de sua MP. A nomenclatura altera de acordo com a célula de origem, sendo em geral chamadas de vesículas de membrana em bactérias, microvesículas em fungos e parasitas e ectossomas em células de mamífero (Deatherage e Cookson, 2012; Yanéz-Mo *et al.*, 2015).

Especula-se que uma vez liberadas no meio, essas vesículas podem interagir com células-alvo através de contato de suas moléculas de superfície, que pode levar a uma informação ou sinalizar uma fusão de membranas (Figura 1.A) (Brown *et al.*, 2015; O'Donoghue e Krachler, 2016). Outra forma de comunicação por vesículas é por internalização seguido de seu processamento endossomal, como por exemplo, através de fagocitose (Pollak *et al.*, 2012), macropinocitose (Weiner *et al.*, 2016), e endocitose mediada moléculas como por clatrina, caveolina e “*lipid rafts*” (Figura 1.B) (Boisvert e Duncan, 2008; Furuta *et al.*, 2009; Mulcahy, Pink e Carter, 2014). No caso dos “*lipid rafts*”, especula-se que a maioria desses processos de endocitose ocorre a em sua presença. Esse domínio é formado por uma estrutura rica em glicoesfingolipídeos, colesterol e receptores proteicos, que altera a fluidez da membrana e medeia tráfico proteico (Mulcahy, Pink e Carter, 2014). Apesar de Sevcsik e colaboradores contestaram recentemente a existência de “*lipid rafts*”, artigos com esse termo continuam sendo publicados (Sevcsik *et al.*, 2015).

Recentemente, Komura e colaboradores conseguiram recriar em laboratório domínios lipídicos formados por gangliosídios fluorescentes (componentes desses “*rafts*”), sendo uma evidência da existência desses domínios lipídicos (Sevcsik *et al.*, 2015; Komura *et al.*, 2016). Essa região membranar é composta de microdomínios com alterações na constituição de fosfolipídeos, rico em receptores proteicos e esfingolipídios

ordenados mais justapostos que o restante da membrana. A presença desses “rafts” permite que esse seja o local de entrada da vesícula, tendo vestígios da presença desses esfingolípídios na composição da membrana da vesícula. Há também indícios que esse componente esteja presente na endocitose mediada tanto por clatrina como por caveolina (Mulcahy, Pink e Carter, 2014).



**Figura 1-** Representação das formas de interação de vesículas extracelulares em célula através de (A): fusão entre membranas, fagocitose, endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por “lipid-rafts”, macropinocitose e endocitose mediada por caveolina. (B) Imagina-se que essa composição favoreça a formação da invaginação e é encontrado em alguns estudos em membranas de vesículas de endocitose (adaptado de Mulcahy, Pink e Carter, 2014).

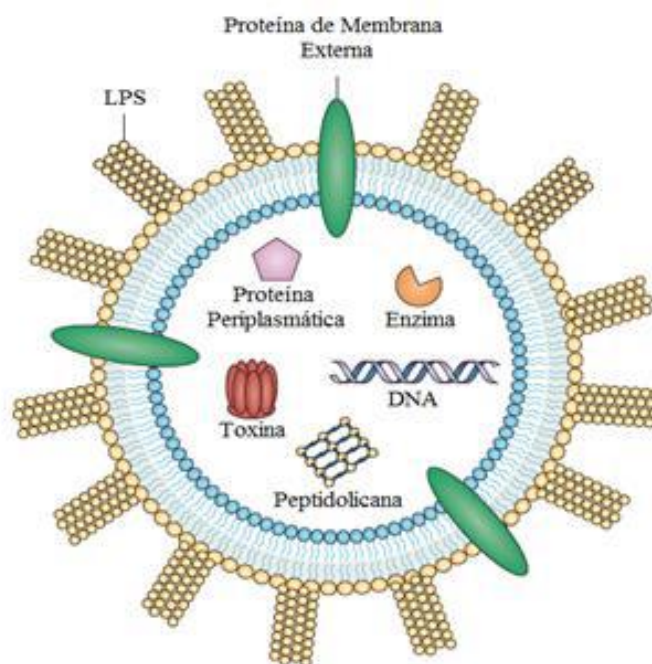
Diversas proteínas de VEs têm sido relacionadas à interação com a membrana alvo. Alguns estudos determinam que haja lise vesicular liberando sinalizadores solúveis que se ligam a receptores da célula alvo e, com isso, funcionam como forma de comunicação celular (Hakulinen *et al.*, 2004; Hawari *et al.*, 2004). Essa transmissão de sinais parece também ocorrer por interação do receptor da célula alvo e receptores extravesiculares (Atay, Gercel-Taylor e Taylor, 2011).

Esses estudos sobre a produção de vesículas são de grande interesse médico uma vez que essas estruturas podem atuar em diversas áreas, como em alvos terapêuticos, na síntese de vacinas. No caso do câncer, VEs podem ser liberadas em grandes quantidades, atuando no controle da proliferação de células cancerígenas, na comunicação com células saudáveis podendo transmitir proteínas oncogênicas e na formação de angiogênese (Wieczorek *et al.*, 2005; Campos *et al.*, 2015). Com isso, podem ser utilizadas como biomarcadores da presença de tumores, auxiliando em diagnósticos precoces. Entretanto,

algumas vezes essas VEs originadas de cânceres podem expor peptídeos para células dendríticas e conseqüentemente, ampliar a resposta imune. Além disso, podem atuar como resposta tumoral de resistência a quimioterápicos (Campos *et al.*, 2015).

### 1.1.2. Vesículas em Bactérias

A primeira visualização de vesículas em bactérias ocorreu acidentalmente através de uma microscopia eletrônica de transmissão (MET) de *Escherichia coli* em 1965 por Bishop enquanto pesquisava o crescimento desse microrganismo em condições de variação de lisina no meio. Desde então, diversos estudos em gram negativas foram desenvolvidos, incluindo o isolamento em diferentes espécies como *Neisseria spp.* (Bishop e Work, 1965; Willians *et al.*, 2014; Zielke *et al.*, 2014), *Yersinia pestis* (Eddy *et al.*, 2014), *Salmonella typhimurium* (Reynolds *et al.*, 2006), *Pseudomonas aeruginosa* (Li, Clarke e Beveridge, 1996), *Helicobacter pylori* (Choi *et al.*, 2017a) entre outras. Acreditava-se que esse fenômeno só era possível em bactérias gram negativas uma vez que essas possuem uma membrana externa (ME) que possibilita sua projeção a partir dessa estrutura. Em contraste, as bactérias gram positivas e micobactérias, que além de não possuírem a ME, têm um envoltório espesso (formado pelo peptidoglicano e ácido lipotécico ou arabinogalactana) que impossibilitaria a passagem de VE formadas na MP para o meio extracelular (Kulp e Kuehn, 2012; Brown *et al.*, 2015). As VEs, encontradas em bactérias gram negativas são similares às descrições de microvesículas (Tiwari *et al.*, 2016) e são chamadas especificamente de vesícula de membrana externa (OMV, do inglês “*outer membrane vesicles*”). Essas OMVs contêm material composto principalmente de moléculas do periplasma e da ME, sendo encontradas ainda moléculas como DNA, lipopolissacarídeos (LPS), proteínas de membrana externa, peptidoglicana, toxinas, proteínas do periplasma e enzimas (Figura 2) (Kulp e Koehn, 2012; Kaparakis-Liaskos e Ferrero, 2015; Yanéz-Mo *et al.*, 2015).



**Figura 2-** Modelo de vesícula de membrana extracelular carreando moléculas comumente encontradas como LPS, proteínas do periplasma, toxinas, peptidoglicana, DNA, enzimas e proteínas de membrana externa (adaptado de Kaparakis-Liaskos e Ferrero, 2015).

O processo de biogênese das OMVs não é totalmente elucidado. Em 1998, Zhou e colaboradores propuseram que a formação das OMVs ocorria durante o “*turnover*” (liberação de fragmentos insolúveis da membrana celular), permitindo o processo de encurvamento membranar (Doyle, Chaloupka e Vinter, 1988; Zhou *et al.*, 1998; Kulkarny e Jagannadham, 2014). O processo de “*turnover*” está relacionado à divisão celular, sendo requerido para formação do septo de divisão (Katsui *et al.*, 1982; Kulp e Koehn, 2012).

Nesse suposto modelo, seria necessário o rompimento da parede celular bacteriana, que somente poderia ocorrer com o “*turnover*” já que durante esse processo não há proteínas ligantes de ME e peptidoglicana. Em seguida, haveria a disjunção da parede celular devido a turgidez ou dilatação na MP por acúmulo de proteínas específicas nessa região, levando a pressão intracelular local, a projeção de membrana e liberação das OMVs. Outro fator poderia ser a presença de moléculas específicas que induzam a formação da curvatura da membrana. Porém, não há nenhum estudo que comprove esse modelo de biogênese (Kulp e Koehn, 2012).

Outras teorias indicam que o estresse funciona como estímulo para liberação de vesículas. Baumgarten em 2012 utilizou fatores como o octanol, o EDTA, o choque

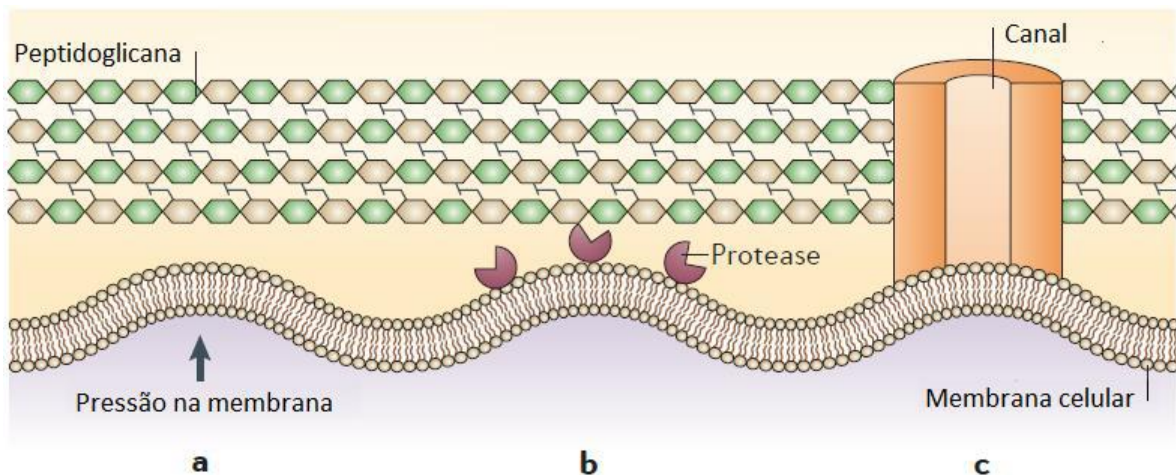
térmico e altas concentrações de NaCl como agentes de estresse celular e verificou uma variação da produção de vesículas com tamanho, quantidade e composição diferenciados para cada situação em *Pseudomonas putida* (Baumgarten *et al.*, 2012; Kulkarni e Jagannadham, 2014). Além disso, há diversas proteínas implicadas na produção de vesículas em bactérias. A proteína PQS (do inglês “*Pseudomonas Quinolone Signal*”) de *Pseudomonas* spp. é relacionada com “*quorum sensing*” e com ao aumento da expressão de fatores de virulência, também atuando no LPS da ME e estimulando a formação de vesículas (Mashburn-Warren *et al.*, 2009).

Em 1990 essa hipótese vinculando liberação de VEs somente em bactérias gram negativas foi alterada a partir do estudo de Dorwards e Garon sobre vesículas em bactérias que no qual descreveu o isolamento dessas estruturas em bactérias gram positivas, tanto em *Bacillus subtilis* quanto em *Bacillus cereus* (Dorwards e Garon, 1990). A partir desse estudo, foram relatadas várias bactérias que possuíam parede celular espessa, capazes de liberar esse componente. Em gram positivas, essas vesículas costumam ser chamadas de vesículas de membrana (VM) (Kim *et al.*, 2015). Apesar de pouco descritas em comparação as gram negativas, sabe-se que há a produção dessas vesículas em *Streptococcus pneumoniae* (Olaya-Abril *et al.*, 2014), *Staphylococcus aureus* (Gurung *et al.*, 2011), *Listeria monocytogenes* (Lee *et al.*, 2013), *Bacillus* spp. (Dorwards e Garon, 1990; Rivera *et al.*, 2011), *Streptomyces coelicolor* (Schrempf *et al.*, 2011) e *Clostridium* spp. (Jiang *et al.*, 2014; Nicholas *et al.*, 2017). Essas vesículas, entretanto, possuem descrição de tamanhos diferenciados, variando entre 40 a 150 nm e entre 100 a 400 nm. Isso sugere que os processos de produção e regulação de vesículas sejam distintos entre espécies (Kim *et al.*, 2015).

A grande questão em torno da sua biogênese, não só em gram positivas como também em fungos e micobactérias, é a explicação de como essas vesículas seriam originadas uma vez que essas células possuem paredes espessas e não tem ME. Existem três hipóteses de modelo de biogênese vesicular. Todos consideram que a sua formação ocorra na membrana plasmática. No primeiro modelo (Figura 3.A), especula-se que a pressão feita na membrana leva a curvatura membranar progressiva, seguida da separação da vesícula da MP, que passaria por poros ou por modificação no espessamento da parede. O segundo modelo (Figura 3.B) leva em consideração que enzimas podem degradar parte do peptidoglicano e permitir assim a passagem da vesícula. Já o terceiro modelo (Figura 3.C) sugere que existam canais que permitem o transporte dessas VEs da membrana até

o meio extracelular. Esses sistemas podem ser únicos ou ocorrer em conjunto (Brown *et al.*, 2015).

Essas hipóteses foram formuladas, em geral, através de estudos em fungos e leveduras. A passagem por poros ou alteração no espessamento da parede foi sugerido em 2008 por Rodrigues e colaboradores. Já foram descritos poros de tamanhos variados em *Saccharomyces cerevisiae* (de 50 a 200 nm) que não só permitem a passagem de VEs como apresentam maior diâmetro em situações de estresse, em torno de 400 nm (Pereira e Geibel, 1999; Rodrigues *et al.*, 2008). A segunda hipótese se origina pela presença de enzimas que atuam na parede como as  $\beta$ -glucosidases e endoquitinases encontradas em *Histoplasma capsulatum* (Albuquerque *et al.*, 2009). Em outra teoria, formulada por Anderson e colaboradores descrevem a formação de vesículas emergindo de canais em *Candida albicans*. Apesar de não haver descrição de canais com tamanho compatível ao de VEs (Anderson, Mihalik e Soll, 1990; Casadevall *et al.*, 2015), especula-se que a vesícula pode sofrer deformações, permitindo sua passagem (Brown *et al.*, 2015).



**Figura 3-** Modelos de passagem de VEs pela parede celular, podendo (a) ocorrer pela turgidez na membrana, sendo facilitada pela formação de poros. Outra hipótese (b) é a utilização de proteases para degradação da peptidoglicana permitindo a passagem de vesículas e por fim, (c) pela utilização de canais de grande porte que permite carrear essas vesículas para o meio extracelular (adaptado de Brown *et al.*, 2015).

Apesar das poucas informações, sabe-se de alguns componentes de bactérias gram positivas relacionados à biogênese vesicular. Em *L. monocytogenes*, foi identificado que o fator de transcrição  $\sigma^B$ , que está relacionado a estresse em condições adversas de pH e salinidade e a invasão celular, também influencia na formação de vesículas. A deleção

desse fator de transcrição  $\sigma^B$  ( $\Delta sigB$ ), causou uma redução de até nove vezes na produção de VEs e que, além disso, apresentaram características disformes da cepa parental (Lee *et al.*, 2013). Outro elemento molecular encontrado que pode estar ligado à liberação de VEs é a enzima Sle1 (N-acetilmuramo-L-alanina amidase) que atua como autolisina. Essa enzima foi encontrada em estudos de proteômica de vesículas de *S. aureus* estando diretamente associada à manipulação da parede celular e a separação entre células (Kajumura *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2015).

Uma vez liberadas no meio, essas vesículas podem carrear diversas moléculas em regiões não colonizadas pela bactéria, podendo interagir com células do hospedeiro ou com organismos de diferentes espécies presentes no meio. Uma vez em contato com a célula-alvo, as VEs podem carrear para essa célula fatores de virulência, realizar o transporte de DNA inter e intra espécies, escapar ou modular a resposta imune, ou entrar pela região luminal e permanecer intacta até a saída pela região basal (Brown *et al.*, 2015; Kaparakis-Liaskos e Ferrero, 2015; Yanéz-Mó *et al.*, 2015). Com isso, podemos dizer que essa estrutura pode atuar em estratégias ofensivas, concentrando e preservando toxinas, competindo com outros microrganismos, secretando fatores de virulência (solúveis ou não), rompendo a arquitetura tecidual e desencadeando a resposta inflamatória. Porém, bactérias podem usá-las como meio de defesa e para interações benéficas, como compartilhar genes de resistência, auxiliar na formação de biofilme, suprimir e evadir o sistema imune, aliviar estresses de membrana e enganar bacteriófagos, sistema complemento e antibióticos (MacDonald e Kuehn, 2012).

Dentre essa dualidade de patogênese e proteção, podemos citar algumas funções importantes para a célula. No quesito ofensivo, já foram encontrados fatores como a toxina termolábil (LT) e fator necrosante citotóxico (CNF) em *E. coli* (Kesty *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2006); antígeno protetor (PA), fator de edema (EF) e fator letal (LF) em VEs de *B. anthracis* (Rivera *et al.*, 2010) e toxina Beta-2 em *C. perfringens* (Jiang *et al.*, 2014). Outro fator bastante proeminente, dessa vez de defesa, é a presença de genes de interesse em vesículas, que podem ser compartilhados (Macdonald e Kuehn, 2012), como genes de perfringolisina O e alfa-toxina em *C. perfringens* (Jiang *et al.*, 2014). Adicionalmente, já foi comprovado o transporte de genes de  $\beta$ -lactamase de *Haemophilus influenzae* para *Streptococcus* do Grupo A, conferindo resistência (Schaar *et al.*, 2013).

Podemos ver essas vesículas com um grande potencial para vacinas. Essa estrutura possui alta captação por fagocitose e suas moléculas de superfície podem ser opsonizadas e reconhecidas pelo sistema imune humoral, além da sua estrutura permitir a inclusão de adjuvantes na sua superfície (Kim *et al.*, 2009). Estudos realizados com *Neisseria meningitidis* do sorogrupo B identificaram nove possíveis regiões reativas em OMVs, sendo sete deles funcionais ao serem testadas (Willians *et al.*, 2014). Esse componente é atualmente utilizado nas vacinas MeNZB e Bexsero® (Novartis) (Dowling *et al.*, 2016). Outros estudos que relacionam o potencial para elaboração de vacinas a partir dessas estruturas já foram publicados, como para *S. pneumoniae*. Nesse estudo, foram encontradas 61 proteínas possivelmente antigênicas na cepa não patogênica e não capsulada BAA-255. Nessa mesma pesquisa, os resultados de testes com camundongos infectados por essa cepa demonstraram uma taxa de sobrevivência de 60% nos camundongos imunizados previamente com essas VEs enquanto no grupo controle essa taxa foi de 10%. Esse material também foi testado contra a cepa patogênica KCCM-41569, que levou a uma taxa de sobrevivência de 40% em camundongos que receberam três aplicações desse antígeno e de 20% para os que receberam duas doses. Esses resultados são positivos quando comparados ao controle, no qual nenhum camundongo controle sobreviveu. Além disso, o teste de citotoxicidade dessas vesículas não demonstrou ter nenhum efeito colateral (Choi *et al.*, 2017b).

Essas vesículas são encontradas em grandes concentrações no meio ambiente, sendo visto uma alta concentração dessa estrutura nos oceanos, processo que nesse ambiente é essencial para evasão de bacteriófagos e comunicação (Van der Pol *et al.*, 2016). Em 2013, Pérez-Cruz descreve um novo processo de formação de vesículas em *Shewanella vesiculosa*, uma espécie de bactéria da Antártica, nomeada de vesícula de membrana interna-externa (OIMV, do inglês “*outer-inner membrane vesicle*”) que consiste em uma vesícula com dupla-bicamada lipídica sendo originada tanto da membrana plasmática como da membrana externa. (Pérez-Cruz *et al.*, 2013).



## 1.2. *Clostridioides difficile*

### 1.2.1. Microbiota Intestinal e Colonização

A microbiota intestinal (MI) é composta por vírus, arqueas, fungos, mas principalmente, por bactérias, tendo essas células um grande potencial de impacto na nossa fisiologia tanto na saúde quanto na doença em seres humanos (Quigley *et al.*, 2013; Shreiner, Kao e Young, 2015). Essa colonização é modulada durante a vida por diversos fatores, variando desde modo de nascimento (cesárea ou parto normal), a dieta na infância (leite materno ou fórmula infantil), a alimentação na vida adulta e até mesmo utilização de antibióticos ou similares. Essa MI é composta de mais de 1000 espécies, porém alguns estudos especulam a presença de até 3500 espécies, sendo os filos Firmicutes e Bacteroidetes os mais prevalentes (Jandhyala *et al.*, 2015; Shreiner, Kao e Young, 2015). Acredita-se que há em torno de 100 trilhões de bactérias metabolicamente ativas no trato gastrointestinal, sendo esta composição de espécies alterada ao longo do tempo, o que confere um ecossistema equilibrado para cada fase da vida, tendo para o recém-nascido baixa diversidade e alta variação (plasticidade) de espécies, e com o passar dos anos, esse fator se reverte tendo baixa variabilidade de espécies e maior diversidade (Candela *et al.*, 2013). A existência da MI contribui para funções metabólicas, proteção contra patógenos, regulação e estimulação do sistema imune, afetando direta ou indiretamente nossa fisiologia, sendo considerado por alguns autores como um “órgão acessório” humano (O’Hara e Shanahan, 2006; Shreiner, Kao e Young, 2015).

Sabe-se que alguns fatores podem alterar a microbiota estável do indivíduo, levando a disbiose. Um fator extremamente ligado a essa alteração é a utilização de antimicrobianos, que podem mudar a MI por longos períodos de tempo. Isso gera perda de diversidade, mudança de capacidade metabólica, redução de resistência contra patógenos invasores, induzindo a possível transferência horizontal de genes de resistência à antimicrobianos e desenvolvimento de organismos patogênicos multirresistentes (Lange *et al.*, 2016). Uma bactéria diretamente associada ao quadro gerado pela disbiose é o patógeno *Clostridioides difficile*, que está associado à infecção a partir do uso de antimicrobianos em geral, que leva a modificação microbiota intestinas e possibilitando a CDI (Rupnik, Wilcox e Gerding, 2009; Secco *et al.*, 2015). Porém, o quadro está mais relacionado a antimicrobianos como clindamicina e cefalosporinas, no qual a espécie

possui resistência intrínseca e a fluoroquinolonas, resistência específica de alguns ribotipo (Ofosu, 2016). Outros fatores podem estar ligados à infecção por *C. difficile* (CDI), como uma maior vulnerabilidade de indivíduos em idade avançada que possuem sistema imune mais debilitado, pacientes em hospitalização prolongada, quimioterapia e modificação da microbiota e a utilização de inibidores de bomba de prótons que aumenta o pH estomacal e facilita a colonização de células vegetativas (Ofosu, 2016).

Esse patógeno é adquirido na forma esporulada, principalmente pela via fecal-oral. Essa forma celular possui alta resistência a fatores ambientais, protegendo a bactéria de fatores como o oxigênio e o pH ácido estomacal. Esse esporo pode ser encontrado no ambiente e em locais com presença de fezes humanas e de animais portadores. A frequência de portadores saudáveis na população adulta é de 3%, essa porcentagem aumenta entre 20-30% para internados e 50% para internados por longos períodos, sendo um dos fatores relacionados ao seu alto índice e devido à utilização de antimicrobianos. Quando chega ao colón, esse esporo pode aderir à barreira epitelial e, após estímulos de ácidos biliares primários, germinar e iniciar assim o quadro fisiopatológico (Goudarzi *et al.*, 2014; Smits *et al.*, 2017). O risco de a contaminação ocorrer existe não apenas enquanto houver o uso do antimicrobiano, mas por até três meses após o seu uso, sendo proeminente no primeiro mês (Ofosu, 2016).

### **1.2.2. Histórico**

Na maior parte do século XX, havia poucas informações sobre essa bactéria e seu potencial patogênico. Em 1893, Finney e colaboradores descreveram pela primeira vez o quadro clínico conhecido como colite pseudomembranosa. Entretanto, seu agente etiológico não era conhecido (Finney 1893 *apud* Pruitt e Lacy, 2012). Paralelamente a isso, em 1935, Hall e O'Toole estudavam a colonização da microbiota intestinal de recém-nascidos e durante a pesquisa, eles isolaram pela primeira vez um microrganismo na época identificado como *Bacillus difcillis*, que foi especulado como agente causador de convulsões em neonatos (Hall e O'Toole, 1935). Em 1973, o quadro de colite pseudomembranosa foi relacionado à utilização de antibióticos, em específico a clindamicina (Tedesco, Barton e Alpers, 1973). Porém, somente em 1978, Bartlett e

colaboradores conseguiram relacionar esse quadro clínico à infecção por *C. difficile* através de estudos com cultura celular e em hamsters (Bartlett *et al.*, 1978).

Essa bactéria foi caracterizada como um bacilo, com alta motilidade, anaeróbio, gram-positivo, formador de esporos subterminais e de gás como sulfeto de hidrogênio. Foi renomeado em 1970 para *Clostridium difficile* (Hall e O'Toole, 1935; Bartlett *et al.*, 1978; Kazanowski *et al.*, 2014; Yutin e Galpering, 2013). Em 2013, Yutin e Galpering propuseram uma mudança de nomenclatura por diferenças taxonômicas, sendo então denominado de *Peptoclostridium difficile* (Yutin e Galpering, 2013). No entanto em 2016, Lawson propôs novas alterações taxonômicas, sendo esse microrganismo atualmente denominado de *Clostridioides difficile* (Lawson *et al.*, 2016).

Desde a sua descoberta até a atualidade, essa bactéria emergiu como patógeno de relevância médica. Entre 1990 e 2007, a taxa de detecção de toxina nas fezes de pacientes hospitalizados com diarreia aumentou em 50 vezes. Esse aumento se deve não apenas à criação de novas metodologias de diagnóstico e sua disseminação em laboratórios, mas também ao crescimento de casos associados a esse patógeno (Brazier, 2008).

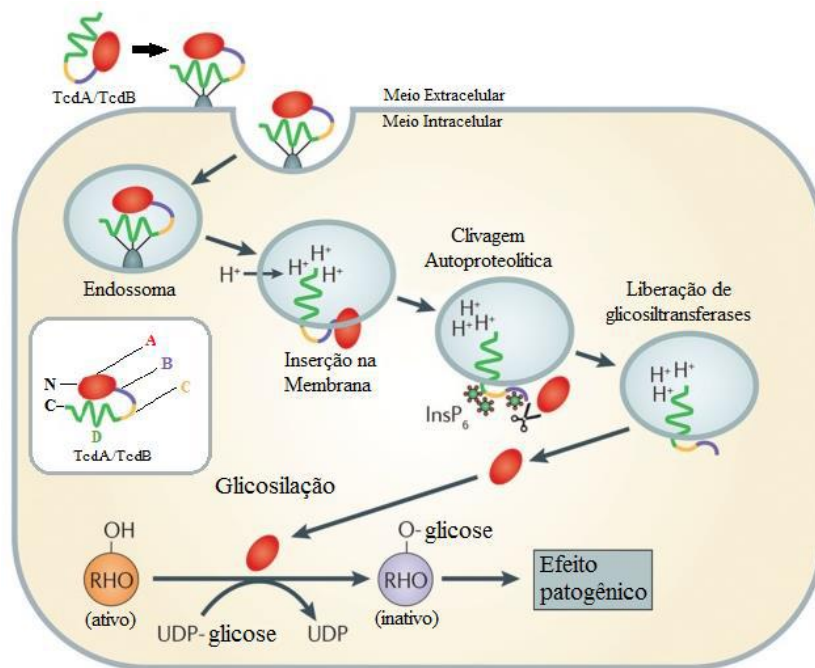
### **1.2.3. Fatores de Virulência**

A produção do endósporo bacteriano é importante para a virulência de *C. difficile*, além de participar da transmissão como visto anteriormente (1.2.1.), também medeia CDI. Uma vez no intestino, esporos podem germinar e manter uma subpopulação de *C. difficile*, permitindo a liberação de baixas quantidades de esporos nas fezes, logo aumentando a taxa de disseminação da doença. Além disso, permite a manutenção e proteção dessa bactéria em ambientes pouco propícios, com alta temperatura, radiação e exposto a álcool e desinfetantes (Awad *et al.*, 2014). A adesão é um fator chave que possibilita a manutenção da CDI e esse quesito está diretamente ligado à presença da camada de superfície (camada S) (Awad *et al.*, 2014). Existem diversas adesinas descritas em *C. difficile* como as proteínas de flagelo FliC e FliD, proteínas de ligação à fibronectina, HSP, Cwp66 (proteína de parede celular) e SplA (proteína de camada S) (Merrigan *et al.*, 2013).

Depois de aderida, há a produção dos fatores mais importantes na patogênese de *C. difficile*: a toxina A (TcdA) e toxina B (TcdB). A TcdA, chamada de enterotoxina é

ligada a permeabilidade intestinal e secreção de fluidos, enquanto a TcdB, a chamada de citotoxina, e ambas culminam na inflamação do cólon (Ofosu, 2016). Elas atuam por mecanismo ABCD (Atividade biológica, “*Binding*” ou ligação, Clivagem e “*Delivery*” ou entrega) (Figura 4). A porção D, contendo o carbono terminal se liga à célula desencadeando a entrada da toxina através do receptor PVRL3, levando a endocitose a qual se especula ocorrer de forma dependente de clatrina e dinamina (Abt, McKenney e Pamer, 2016; Awad *et al.*, 2016). A acidificação do endossoma leva a uma mudança de conformação da toxina, o que causa um deslocamento molecular levando a sua inserção na membrana deste. Uma vez em contato com o citosol, uma molécula do próprio enterócito, inositol-hexafosfórico (InsP<sub>6</sub>) origina uma nova dobra da molécula, onde o domínio C cliva a ligação entre os domínios A e B, liberando a porção ativa da toxina. Em seguida, a porção ativa tanto de TcdA quanto de TcdB inativam uma série de proteínas da família Rho via glicosilação. Isso ocorre pois ambas as toxinas têm atividade de monoglicosiltransferases. O bloqueio às funções de Rho, que atua em diferentes vias celulares importantes, provoca a despolimerização da actina com perda de integridade estrutural, arredondamento celular e desencadeamento da apoptose ou necrose. Juntamente com a morte celular em cadeia (por necrose ou apoptose), há o rompimento de junções celulares, perda da integridade da barreira intestinal, aumento da permeabilidade e perda de líquido que com isso leva a diarreia (Awad *et al.*, 2014; Janoir, 2016). Essas toxinas são produzidas entre final da fase log e na fase estacionária do crescimento bacteriano (Rupnik, Wilcox e Gerding, 2009).

Além disso, essas toxinas e outros componentes bacterianos também induzem a resposta pró-inflamatória e a ativação do inflamossoma por TLR4 e TLR5, com a produção de quimiocinas e citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-18, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e entre outras. Essas citocinas pró-inflamatórias atuam no recrutamento de células do sistema imune inato (neutrófilos e mastócitos), ampliando a resposta inflamatória e causando maior destruição do revestimento celular (Awad *et al.*, 2014; Janoir *et al.*, 2016). Em resposta o sistema imune produz defensina e cathelicidinas, capazes de diminuir o efeito de TcdA e TcdB, reduzindo dano tecidual e inflamação (Solomon, 2013).

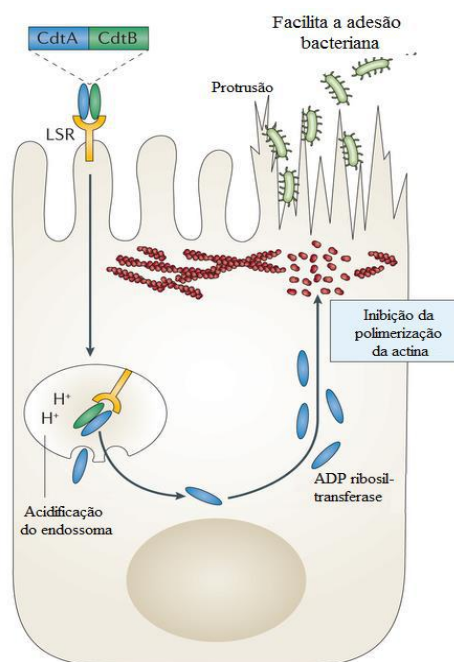


**Figura 4-** Esquema de funcionamento das toxinas TcdA e TcdB atuando na lise de um enterócito. A porção D medeia a entrada pela membrana enquanto a mudança de pH do endossoma estimula modificação da toxina e sua saída para o citosol. InsP<sub>6</sub> estimula porção C a quebrar ligação entre A e B, aonde A vai glicosilar proteínas Rho tornando-as inativas, paralisando vias celulares e levando a morte. Modelo da toxina presente no quadro interno da célula com porção A (vermelha), B (roxa), C (amarela) e D (verde) (adaptado de Awad *et al.*, 2014).

Os genes de produção dessas toxinas se encontram no locus de patogenicidade (PaLoc) contendo os genes *tcdA* e *tcdB* que codificam as toxinas A e B, respectivamente, e os genes *tcdC*, *tcdR* e *tcdE*, sendo *tcdR* de grande importância na regulação (positiva) da produção dessas toxinas, através do fator sigma. Já *tcdC* é um regulador negativo dessa produção (Monot *et al.*, 2015). Cepas não toxigênicas, ao invés de conter o PaLoc, possuem uma sequência não codificante em seu lugar (Rupnik, Wilcox e Gerding, 2009).

Além de TcdA e TcdB, algumas cepas são capazes de produzir uma terceira toxina, sendo essa conhecida como Toxina Binária, ou *C. difficile* transferase (CDT). Essa toxina é similar a toxina Iota de *C. perfringens*, que especula-se ter um mecanismo de patogenicidade similar (Gerding *et al.*, 2014). A CDT possui duas porções, a CdtA e a CdtB. A CdtB é ativada por serino proteases permitindo a ligação desta com receptor celular lipoproteico estimulado por lipólise (LSR), que vai levar a um acúmulo microdomínios de membrana conhecidos como “lipid rafts” na membrana na região de ligação, permitindo sua entrada (Gerding *et al.*, 2014). O endossoma formado com a toxina terá seu pH reduzido permitindo mudanças conformacionais da molécula de CdtB,

ligação com a membrana das vesículas endossomais, formação de poros nessa membrana e saída da porção CdtA para o citosol. Essa sub-unidade tem atividade ADP-ribosiltransferase, que vai ribosilar a actina, principalmente perto da superfície membranar, tornando-a incapaz de se polimerizar. Isso possibilita a formação de protusões na membrana por alongamento de microtúbulos de fibronectina, permitindo uma maior aderência da bactéria. A produção dessa toxina leva a um agravamento da CDI, levando a piores manifestações da doença (Gerding *et al.*, 2014; Abt, McKenney e Pamer, 2016)



**Figura 5** – A toxina CDT, que possui porção CdtA e CdtB, se liga ao receptor de membrana da célula-alvo, a molécula LSR pela porção CdtB e iniciando o processo de endocitose da toxina. Isso formará um endossomo que será acidificado pela fusão de lisossomos. A partir disso, haverá mudança de conformação de CDT, induzindo saída da porção CdtA, que vai ter função ADP-ribosiltransferase, levando a inibição da polimerização da actina na superfície, alongamento de microtúbulos de fibronectina e formação de protusões de membrana facilitando adesão da bactéria (adaptado de Abt, McKenney e Pamer, 2016).

Recentemente, também foi caracterizado um novo possível fator de virulência de *C. difficile*, a produção de vesículas extracelulares. Essas vesículas têm potencial de carrear diversos compostos, desde adesinas à toxinas, incluindo genes de produção de toxina. Porém ainda, não foi identificada a liberação de VEs contendo toxinas nessa espécie assim como não foi realizado um estudo procurando DNA nessas estruturas.

Sabe-se que a liberação de VEs pode permitir o transporte desses materiais a maiores distâncias do local colonizado, inclusive ultrapassando a barreira epitelial, tendo potencial na virulência e na formação e estabilidade de biofilmes bacterianos, tendo importância no transporte de nutrientes e comunicação celular (Kaparakis-Liaskos e Ferrero, 2015; Yanéz-Mo *et al.*, 2015; Nicholas *et al.*, 2017).

#### **1.2.4. NAP/027/BI**

Em 2005 foi descrita pela primeira vez a presença de uma variante hipervirulenta de *C. difficile*. Essa cepa estava relacionada a diversos quadros de epidemias entre os anos de 2000 e 2003, em seis diferentes estados dos Estados Unidos da América (EUA) e em Quebec no Canadá. A epidemia não só estava associada ao aumento de casos, mas também ao grau de agressividade da doença. A nova variante foi denominada como “North America Pulse-field 1” (NAP1), com padrão BI quando exposto ao teste de endonuclease de restrição (REA) por *HindIII* e como pertencente ao ribotipo 027. (Loo *et al.*, 2005; McDonald *et al.*, 2005)

Essa cepa, possui um PaLoc diferenciado, apresentando uma deleção de 18 pares de base (pb) no regulador *tcdC*, formando uma proteína truncada, ou seja, não faz regulação negativa de *TcdR* e com isso perde a capacidade de regular negativamente a produção das toxinas A e B, acarretando no aumento de expressão dessas toxinas. Além disso, essa cepa é produtora da CDT, agravando a patogênese da infecção. Outro fator ligado ao potencial da NAP1 é a resistência adquirida à fluoroquinolonas, antimicrobiano que foi comumente utilizado durante a epidemia descrita. Essa resistência é resultado de mutações no gene *gyrA* e *gyrB* (Oh e Edlund, 2003; Loo *et al.*, 2005; McDonald *et al.*, 2005). Em 2009, um estudo de Murray e colaboradores descreveu que a deleção em *TcdC* não é o único fator que leva a maior produção de TcdA e TcdB, não se sabendo quais outros motivos possam estar relacionados a essa hiperprodução (Murray *et al.*, 2009).

### 1.2.5. Manifestações Clínicas

O indivíduo carreador de *C. difficile* pode ter desde quadros assintomáticos, diarreias de leves a moderadas, até colites pseudomembranosas (PMC) e colite fulminante. A contaminação pode ocorrer na comunidade ou em hospitais, sendo esse último definido pela presença de manifestações 48h após internação ou até 4 semanas depois de receber alta. Já a contaminação na comunidade pode ocorrer a qualquer momento antes de 48h de internação ou depois de 12 semanas após a alta (Wenish *et al.*, 2012; Goudarzi *et al.*, 2014; Boomfield e Riley, 2016).

Os casos de diarreia relacionados a CDI constituem 20 a 30% dos casos relacionados a antibiótico, podendo acontecer duas horas após a sua ingestão ou até dois meses depois. Essa diarreia é caracterizada por liberação fezes não formadas três ou mais vezes num período de dois ou mais dias. Esse sintoma pode vir acompanhado de dor abdominal e cólica (Goudarzi *et al.*, 2014).

A colite sem apresentação de pseudomembrana é a forma mais comum de CDI, e se define pela inflamação do cólon. Pode levar a sintomas como dor abdominal, náusea, anorexia, diarreia aquosa, presença de sangue nas fezes, febre baixa, desidratação e leucocitose. Já a pseudomembrana, quadro característico de *C. difficile*, é caracterizada pela elevada presença de nódulos amarelos ou brancos na mucosa do cólon, formadas por tecido necrótico, neutrófilos, debris, fatores inflamatórios da lâmina própria. A pseudomembrana pode se apresentar de modo confluyente, sendo um indicativo de gravidade da doença. Além dos sintomas da colite simples, essa pode apresentar hipoalbuminemia, aumento de células inflamatórias, proteínas do soro e muco (Goudarzi *et al.*, 2014; Farooq *et al.*, 2015).

Se agravado o quadro, essa PMC pode evoluir para um quadro de colite fulminante. Isso ocorre com 3% dos pacientes que apresentam CDI podendo levar a sepse, perfuração do cólon, megacólon tóxico, falência renal, falência múltipla dos órgãos e morte. A sintomatologia inclui, diarreia hipovolêmica, elevada desidratação, febre alta, dor abdominal difusa, distensão abdominal, acidose láctica severa e alta leucocitose (Goudarzi *et al.*, 2014; Ofosu, 2016). O megacólon tóxico, uma das possíveis complicações trata-se do desenvolvimento das alterações inflamatórias levando a



penetração da camada de *muscularis propria*, danos neurais e alteração de motilidade intestinal levando a dilatação do cólon (Sayedy, Kothari e Richards, 2010).

### **1.2.6. Epidemiologia**

Desde a emergência do ribotipo 027, que surgiu em entre 2000 e 2003 e levou a uma epidemia em países desenvolvidos, houve um aumento nos relatos de isolamento de *C. difficile*, e no seu envolvimento na morbidade e mortalidade. Estima-se que de 4 a 10% dos pacientes internados possuam colonização por cepas toxigênicas e que 14 mil pessoas morram anualmente nos EUA por essa infecção. Esse ribotipo ainda é incidente nos EUA e tem aumentado no Leste Europeu. Já no Oeste Europeu, houve queda no total de pessoas com CDI, assim como do ribotipo 027 (Martin, Monaghan e Wilcox, 2016).

O perfil epidemiológico é bastante diversificado no mundo. De acordo com dados de 2012, os EUA apresentam uma taxa de CDI seis vezes maior que no Reino Unido (UK) (King *et al.*, 2017). Dados entre 1998 e 2009 sinalizam esse aumento da identificação desse quadro no EUA, passando de 25,2 mil casos confirmados da doença para 110,6 mil casos (Burke e Lamont, 2014). Esse aumento está primeiramente relacionado à uma maior conscientização sobre a doença, que leva a suspeita e busca por CDI assim como uma maior gama de métodos de diagnósticos disponíveis (Smits *et al.*, 2017). Outro motivo pode ser a maior identificação de infecções na comunidade por *C. difficile* (CA-CDI). Em um estudo realizado em 15 hospitais em Montreal (Canadá), 27% dos casos foram classificados como infecção na comunidade de um total de 2.297 episódios da doença. Já em 2010 na Carolina do Norte (EUA), em um total de 10.342 casos, 32% deles foram relacionados a CA-CDI (Bloomfield e Riley, 2016). Entretanto, esses dados não devem refletir a realidade uma vez que os dados de pesquisa são em geral obtidos de hospitais. Os dados que se referem a contaminações na comunidade não retratam a realidade de infectados e de pessoas que apresentam sintomas uma vez que é necessário um quadro se grave para o paciente procurar tratamento (Bloomfield e Riley, 2016; Smits *et al.*, 2017).

Na Holanda, essa estimativa sobe para 390 a 730 infecções a cada 100 mil habitantes por ano, sendo uma estatística similar a contaminações por *Camphylobacter* spp. e superior a de *Salmonella* spp. Desses casos, 30% não tiveram relação alguma com antimicrobianos ou internações (Smits *et al.*, 2017). Nesse mesmo país um estudo indicou

que somente 40% das infecções em comunidade são detectadas (Martin, Monaghan e Wilcox, 2016). Outro trabalho relaciona o número casos de CDI de 37.932 pacientes com os gastos num valor estimado em 280 milhões de dólares canadenses (aproximadamente 219 milhões de dólares americanos ou 702 milhões de reais). Desse valor, 90% foi relacionado a gastos hospitalares (incluindo custos médicos, farmacoterapia, e outros custos, como visitantes) e o restante está relacionado a gastos de infectados em comunidade e em internações de longo prazo (incluindo gastos com farmacoterapia, testes clínicos, procedimentos e visita médica) (Levi *et al.*, 2015).

No Reino Unido, houve uma queda de incidência de cepas pertencentes do ribotipo 027. Porém, após 2007 estabeleceram-se varabilidade nos ribotipos apresentados, como o 014 (TdcA<sup>+</sup>/TcdB<sup>+</sup>/CDT<sup>-</sup>) e o 017 (TdcA<sup>-</sup>/TcdB<sup>+</sup>/CDT<sup>-</sup>). Na Europa, o ribotipo 078 (TcdA<sup>+</sup>/TcdB<sup>+</sup>/CDT<sup>+</sup>) tem crescido desde 2005, sendo mais associado a infecções em comunidade, em jovens que não tiveram exposição a antimicrobianos. Há também presença do ribotipo 017, 014 e 001 (TdcA<sup>+</sup>/TcdB<sup>+</sup>/CDT<sup>-</sup>). Já na Austrália, emergiu um ribotipo toxigênico, o 244 (TcdA<sup>+</sup>/TcdB<sup>+</sup>/CDT<sup>+</sup>), similar ao 027, porém este não se estabeleceu no país possivelmente pela diferença de perfil antimicrobiano utilizado. Já na Ásia, os ribotipos mais encontradas são 014, 017 e 019 (TcdA<sup>+</sup>/TcdB<sup>+</sup>/CDT<sup>-</sup>), mas também sendo encontrados os ribotipos 001, 002 (TdcA<sup>+</sup>/TcdB<sup>+</sup>/CDT<sup>-</sup>) e 018 (TdcA<sup>+</sup>/TcdB<sup>+</sup>/CDT<sup>-</sup>), mostrando uma diversidade de ribotipos associados. Isso também pode ser associado à baixa aderência a protocolos de notificação de casos hospitalares (Burke e Lamont, 2014; Martin, Monaghan e Wilcox, 2016).

No Brasil, existem poucos dados do número de infecções. O primeiro em 2009, analisou 21 amostras fecais de pacientes do hospital Evandro Chagas, na FIOCRUZ, as quais 6 delas foram positivo para presença de *C. difficile*, sendo possível isolar a bactéria em 4 deles, 2 pertencentes ao ribotipo 014 e 2 ao ribotipo 106 (TdcA<sup>+</sup>/TcdB<sup>+</sup>/CDT<sup>-</sup>) (Balassiano *et al.*, 2009). Outro estudo de 2011, que ocorreu no Hospital Clementino Braga Filho (HUCFF-UFRJ), detectou 19/70 amostras fecais positivas para CDI, sendo 8 delas isoladas das amostras fecais. Dessas, 4 pertenciam ao ribotipo 133 (TdcA<sup>+</sup>/TcdB<sup>+</sup>/CDT<sup>-</sup>), 2 do ribotipo 233 (TdcA<sup>+</sup>/TcdB<sup>+</sup>/CDT<sup>-</sup>), 1 do ribotipo 020 (TdcA<sup>+</sup>/TcdB<sup>+</sup>/CDT<sup>-</sup>) e 1 do ribotipo 010 (TdcA<sup>-</sup>/TcdB<sup>-</sup>/CDT<sup>-</sup>) (Balassiano *et al.*, 2011). Já em 2014, Secco e colaboradores utilizou 74 amostras fecais também do HUCFF-UFRJ, sendo possível identificar toxinas em 3 amostras. Foi possível isolar 3 *C. difficile* em 3 amostras, sendo elas dos ribotipos 014, 043 (TdcA<sup>+</sup>/TcdB<sup>+</sup>/CDT<sup>-</sup>), 046

(TdcA<sup>+</sup>/TcdB<sup>+</sup>/CDT<sup>-</sup>) (Secco *et al.*, 2014). Por fim 2017 avaliou 48 amostras de pacientes, sendo que 23 positivas para presença de toxinas e em uma delas foi detectada a CDT. Foi possível identificar os ribotipos 014/020 e uma bactéria sem ribotipo definido (Costa *et al.*, 2017).

### **1.2.7. Diagnóstico e Tratamento**

O diagnóstico de *C. difficile* ocorre por base através de contextos clínicos como presença de diarreia ocorrendo próximo a utilização de antimicrobianos. As análises clínicas das fezes não são muito utilizadas rotineiramente, porém servem de suporte ao diagnóstico anterior, conferindo um resultado mais preciso. O teste deve ser escolhido de acordo com os sintomas apresentados, caracterizando uma CDI, sendo normalmente utilizada a busca pela toxina para diagnosticar a doença ou de cultivo para detectar a colonização, como em portadores assintomáticos (Burnham e Carroll, 2013; Secco *et al.*, 2014; Smits *et al.*, 2017).

O teste mais utilizado para detecção de doença é o ensaio imunoenzimático (EIA) para detecção de TcdA e TcdB por anticorpos mono e policlonais, pois apresentam resposta rápida e econômica. Apesar desse teste possuir alta especificidade, ele também possui baixa sensibilidade. O ensaio citotóxico em culturas celulares é considerado o padrão ouro de diagnóstico. No entanto, possui alta variabilidade, tendo sensibilidade de 60 a 90% além de ter resultado demorado (de uma a dois dias) e necessitar de manutenção constante do cultivo de células eucariotas e de experiência técnica para interpretação de resultados. Já o isolamento do microrganismo, o que idealmente todo laboratório deveria fazer, permite realização de ribotipagem, testes toxigênicos e de susceptibilidade a antimicrobianos. Os testes de PCR não são recomendados, pois podem indicar um falso positivo de doença uma vez que há portadores assintomáticos (Burnham e Carroll, 2013; Smits *et al.*, 2017).

O tratamento para CDI é primeiramente interromper o uso do antimicrobiano ministrado e reposição de fluidos e eletrólitos perdidos. A troca da antibioticoterapia deve ser realizada de acordo com o grau da doença. Para baixas e moderada gravidade, é recomendada a administração de metronidazol ou vancomicina, sendo esse último recomendado para pessoas alérgicas ao primeiro fármaco e mulheres grávidas (Ofosu,

2016). No caso de CDI grave ou complexo, é recomendada a mesma dosagem de vancomicina que o anterior ou até dosagens superiores se houver inflamação no íleo, megacólon tóxico ou alta colonização, podendo também ocorrer a administração de metronidazol juntamente à vancomicina. No caso de resposta insatisfatória de vancomicina, é possível a utilização de fidaxomicina, antimicrobiano com taxas similares de sucesso terapêutico (Ofosu, 2016).

Existem outras terapias capazes de auxiliar a recomposição da microbiota, auxiliando a saúde fisiológica. A ingestão de probióticos, por exemplo, que são bactérias ou leveduras em cultura única ou em conjunto podem inibir a aderência de *C. difficile*, modular a resposta imune e estimular produção de IgA antitoxinas. Alguns probióticos usados na indústria são os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* comuns na microbiota intestinal ou a *Saccharomyces boulardii*. A utilização conjunta com prebióticos, que são oligossacarídeos não digeríveis, pode aumentar o efeito do probiótico, que em conjunto são chamados de simbióticos (Jandhyala *et al.*, 2015; Ofosu, 2016). Outro fator de recomposição da microbiota é a utilização de transplante fecal sendo utilizado principalmente em pacientes com reincidência de CDI e falhas terapêuticas na utilização de antimicrobianos. Nesse caso são utilizadas as fezes de um doador saudável, com taxas de efetividade de até 92% (Goudarzi *et al.*, 2014; Smits *et al.*, 2017).

## 2. JUSTIFICATIVA

Vesículas extracelulares são estruturas que fazem parte do mecanismo biológico e são de grande importância para entender os processos e funcionamento celular. Apesar disso, esse tema tem muitas questões não elucidadas. Um exemplo são as vesículas de membrana externa de gram negativos, que apesar de mais descritas na literatura que as provenientes de gram positivas, não possuem processos bem entendidos, como a biogênese, mecanismos genéticos e de sinalização, seleção de moléculas e função. É importante aumentar a base de dados sobre a liberação de vesículas em bactérias, permitindo um melhor entendimento da sua formação e das suas finalidades para a célula que as produzem as que interagem com ela.

Recentemente, a presença dessas vesículas extracelulares foi descrita no patógeno nosocomial *C. difficile* (Nicholas *et al.*, 2017), mas ainda não foi elucidado se essa vesícula tem potencial de carrear suas toxinas e de onde elas se originam. Sendo assim, será realizada a caracterização de cepa hipervirulenta do ribotipo 027 que possui potencial patogênico elevado, para um melhor entendimento da comunicação através dessas vesículas e determinar seu papel biológico na patogênese de *C. difficile*, assim como seu possível papel na resposta imune.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivos gerais**

Identificar a produção de vesículas extracelulares em três cepas de *C. difficile*: a R20291, a NAP-1 e a CTI, a fim de melhor elucidar a produção dessas estruturas em bactérias. Assim como analisar o perfil proteico encontrado na cepa hipervirulenta e sequenciada do estudo (R20291).

#### **3.2. Etapas do estudo**

- Isolar vesículas de membrana das três cepas do estudo através de uma metodologia de ultracentrifugação diferencial em gradiente de densidade.
- Detectar e visualizar as VEs através de Microscopia Eletrônica de Transmissão, assim como medir seu tamanho por DLS (“*Dynamic Light Scattering*”).
- Identificar a liberação de VEs por Microscopia Eletrônica de Varredura e Transmissão em cultura de células.
- Detectar a presença de toxinas A e B de *C. difficile* nessas estruturas por ELISA e “*Western blotting*”.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Cepas Bacterianas

Foram utilizadas três cepas de *C. difficile* pertencentes à coleção de cultura do Laboratório de Biologia de Anaeróbios. A cepa CTI, pertencente ao ribotipo 106, é capaz de produzir as toxinas A e B (Secco *et al.*, 2015). A NAP-1 (ANA#20004016), pertencente ao ribotipo 027 produz as das toxinas A e B e possui da toxina binária (Warny *et al.*, 2005). Por fim, a cepa R20291, também do ribotipo 027, com presença das três toxinas de *C. difficile* (Stabler *et al.*, 2009) (Tabela I).

**Tabela I** – Características das cepas utilizadas no estudo.

Características	CTI	NAP-1	R20291
<b>Ribotipo</b>	106	027	027
<b>Perfil toxigênico</b>	TcdA <sup>+</sup> /TcdB <sup>+</sup> /CDT <sup>-</sup>	TcdA <sup>+</sup> /TcdB <sup>+</sup> /CDT <sup>+</sup>	TcdA <sup>+</sup> /TcdB <sup>+</sup> /CDT <sup>+</sup>

Essas cepas foram cultivadas em meio ágar sangue suplementado e expostas a Câmara de Anaerobiose (80% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>) (Ferreira, Domingues e Uzeda, 2003) por 48h a 37° C e analisadas por MALDI TOF (Bruker) para validação de identidade das espécies. Para o cultivo, uma colônia foi inoculada em 1,5L de meio líquido TPG (5% Triptona, 0,5% Peptona, 0,4% Glicose e 0,1% Tioglicolato de Sódio) (Jiang *et al.*, 2014) também em ambiente anaeróbio por 48h a 37° C. Foi realizada também a mensuração de densidade óptica (600 nm) do cultivo para identificar fase de crescimento bacteriano em TPG, buscando o limiar entre a fase estacionária e a fase de morte com o objetivo de acumular o maior número possível de vesículas no meio TPG. O crescimento foi determinado previamente utilizando a cepa NAP-1 e o meio TPG.

### 4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

O procedimento foi realizado com colaboração da Divisão de Imagem e Metrologia Aplicada à Vida (DIMAT) do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). O volume de 30 µL de crescimento bacteriano em TPG foi depositado

em “*stub*” de ferro polido e fixados por 18h. em vapor de Tetróxido de Ósmio (OsO<sub>4</sub>) 4%. Após secagem completa da gota a 16h e temperatura ambiente, o “*stub*” foi metalizado com ouro em camada de 20nm em “*Sputter Coater*” (Leica SCD 500 Sputtering Super-Cool, USA). A análise dos “*stubs*” contendo as vesículas foi realizada antes e após a metalização com ouro (Silva *et al.*, 2014).

### 4.3. Extração de Vesículas Extracelulares

Após o crescimento bacteriano em TPG, o meio foi centrifugado a 16.000 *xg* por 20 minutos a 4° C para remoção de células. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em *Stericup* com membrana polietersulfônica (PES) de 0,45 µm (Milipore) (Jiang *et a.*, 2014). Esse material foi então concentrado através de ultrafiltração com Amicon Ultra 8200 em membrana de celulose de 100 KDa (Milipore) (Lee *et al.*, 2009). A amostra foi concentrada até um volume próximo a 30 mL. Em seguida, o material foi novamente filtrado a fim de manter sua esterilidade e retirar outros detritos restantes com unidade filtrante operada por seringa com membrana PES de 0,22 µm (Milipore) (Lee *et al.*, 2009). Assim que esterilizada a amostra, ela foi ultracentrifugada a 150.000 *xg* por 3h a 4° C (Sorvall). Posteriormente, esse material foi para a ultracentrifugação em gradiente de densidade por “*botton loading*” na qual os precipitados foram unidos em um único tubo e ressuspensos em 2,2 mL de solução de 50% Optiprep (Sigma-Aldrich) de 50% de HEPES (Sigma-Aldrich) suplementado com 150mM de NaCl pH 7.0 e transferidos para o fundo dos tubos de 5 mL. O volume no tubo foi superposto com duas outras camadas sendo uma de 2,0 mL de 40% Optiprep/ 60% do HEPES suplementado com cloreto de sódio e outra de 0,8 mL de 10% Optiprep/ 90% HEPES (Lee *et al.*, 2009).

Uma vez formada essas camadas, a amostra foi novamente ultracentrifugada, dessa vez a 200.000 *xg* por 2h a 4° C. Houve então a formação do gradiente de concentração, contendo vesículas agrupadas em frações de acordo com sua densidade. Desse gradiente, nove frações de 0,5 mL foram separadas, de cima para baixo, de forma a preservar a separação da amostra (Lee *et al.*, 2009).



#### **4.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão e DLS (“*Dynamic Light Scattering*”)**

Os procedimentos também foram realizados com parceria com DIMAT/INMETRO. Para Microscopia Eletrônica de Transmissão, 8  $\mu\text{L}$  da solução aquosa contendo as vesículas foram depositados em grades de cobre revestidas com Formvar®, contrastadas ou não com uranila (1%), protegidos da luz e em seguida secos por 18h em temperatura ambiente dentro de uma placa de petri. Nesse caso, a uranila atuará como contrastante negativo (não tem afinidade pela amostra, ficando o fundo eletrodense e a amostra eletrolucente) (Peternele *et al.*, 2014).

Além disso, foi utilizado a técnica de DLS (“*Dynamic Light Scattering*”) na qual as amostras foram diluídas na razão 1:10<sup>3</sup> em 1x de PBS (Tampão Fosfato-Salina) para aferir a distribuição de tamanho em um calculador Zeta. A análise foi feita na faixa de 0,1 a 10.000 nm. O equipamento também fornece um índice polidispersivo (PdI), que deve ser baixo (abaixo de 0,2) para um sistema monodisperso (Silva *et al.*, 2014).

#### **4.5. ELISA**

Foi utilizado o Kit comercial adaptado para detecção de toxinas A e B de *C. difficile* em fezes (r-biopharm). As vesículas da cepa NAP-1 foram rompidas com 0,1% Triton por 10 min, criando outro controle negativo além do presente no kit para testar a interferência do Triton, Optiprep e HEPES na detecção de toxinas. As etapas referentes à diluição das fezes foram retiradas. O resultado foi analisado tanto pela visualização da amostra como por um leitor de ELISA a 450 nm (Molecular Device).

A estimativa para controle passou por cálculo do valor de extinção como descrito na metodologia do kit (Ridascreen), no qual o valor do controle negativo deve ser inferior a 0,2 e o do controle positivo maior que 0,8. Ambos os controles são respectivos ao presente no próprio kit. Uma amostra é considerada positiva se o seu valor de extinção for superior a 10% do ponto de corte (valor de extinção do controle negativo +0,15).

#### 4.6. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

As 9 frações resultantes tiveram seu perfil proteico determinado através de uma Eletroforese em Gel de poliacrilamida. As análises foram realizadas segundo Laemmli em 1970 em sistema vertical e descontínuo (Laemmli, 1970). Foi utilizado o gel de empacotamento a 4% e o gel de separação a 12% em tampão Tris-glicina (Tris 0,1 M; glicina 1M e 0,5% de Dodecil Sulfato de Sódio ou SDS). Dez microlitros de cada fração foram misturados com 5 µL de tampão de amostra (Tris-HCl 0,5M pH 6.8, 10% SDS, 10% de glicerol e 0.05% de azul de bromofenol na razão de 1:3), fervida a 100° C por 5 min para desnaturar as proteínas e submetidas a eletroforese a 30mA/70V para o gel de empacotamento e 30mA/100V para o gel de separação. Como controle da eletroforese foi utilizado um padrão de massa molecular de proteínas (Invitrogen).

Uma vez finalizada a eletroforese, o gel foi submetido a três lavagens de 30% de etanol e 2% ácido fosfórico por 30 minutos cada. Depois, o gel foi novamente lavado três vezes, dessa vez em solução de 2% de ácido fosfórico. O gel foi então colocado na última mistura de 2% de ácido fosfórico, 18% de etanol e 15% de sulfato de amônio por 30 minutos e então a adição de 1% do volume de Coomassie Coloidal Azul Brilhante G-250 20g/L (SIGMA). (Lammelli, 1970; Boente *et al.*, 2012). O perfil proteico foi visualizado após 72h. Alguns géis tiveram sua imagem obtida através de contraste de imagem por um capturador de imagem (Biorad).

#### 4.7. “Western Blotting”

Foram realizados novos géis de poliacrilamida como explicado no tópico 4.6 com padrão molecular (Life Technologie). Para controle positivo foi utilizado o controle antitoxina/toxina para *C. difficile* T3000 (Tech lab) diluído de 1 para 10 vezes. O gel de poliacrilamida teve suas proteínas transferidas para uma membrana de nitrocelulose por 1h, a 40 mA/100V a 4° C. Depois, essa membrana foi lavada com água por três vezes e bloqueada com Tampão de Bloqueio ou TBST (150 mM de NaCl, 0,03% de Tween 20) com 5% de leite desnatado em pó por 18h a 4° C. A membrana foi então novamente lavada, dessa vez com TBST por três vezes. Em seguida, os anticorpos primários foram diluídos em razão de 1:1.000 em TBST com 5% de leite desnatado. Foram utilizados anticorpos monoclonais de rato específicos para TcdA (ABCam) e TcdB (ABCam) e cada membrana foi exposta a um desses anticorpos em incubação por 1h em temperatura ambiente. Depois, as membranas passaram por nova lavagem com TBST por três vezes e então incubado com os anticorpos secundários de IgG anti-

mouse conjugados com fosfatase alcalina (Sigma) diluídos na razão de 1:3000 em solução de 5% de leite desnatado por 1h em temperatura ambiente. Após incubação, a membrana foi lavada em TBST por três vezes e revelada utilizando Novex Substrato Cromogênico BCIP/ NBT (Invitrogen) (Ferreira *et al.*, 2013; Trindade *et al.*, 2016) para detectar presença das toxinas A e B de *C. difficile*.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Microscopia Eletrônica de Varredura**

Foi possível observar a presença de vesículas sendo projetadas através da superfície celular, sendo liberadas por todo o entorno da célula (Figura 6.A), mas principalmente pela porção terminal e subterminal da cepa R20291 de *C. difficile* (Figura 6.B e 6.C). Em algumas imagens essas estruturas parecem estar relacionadas à divisão celular, sendo possível localizá-las sendo projetadas a partir da região da bipartição (Figura 6.D e 6.E).

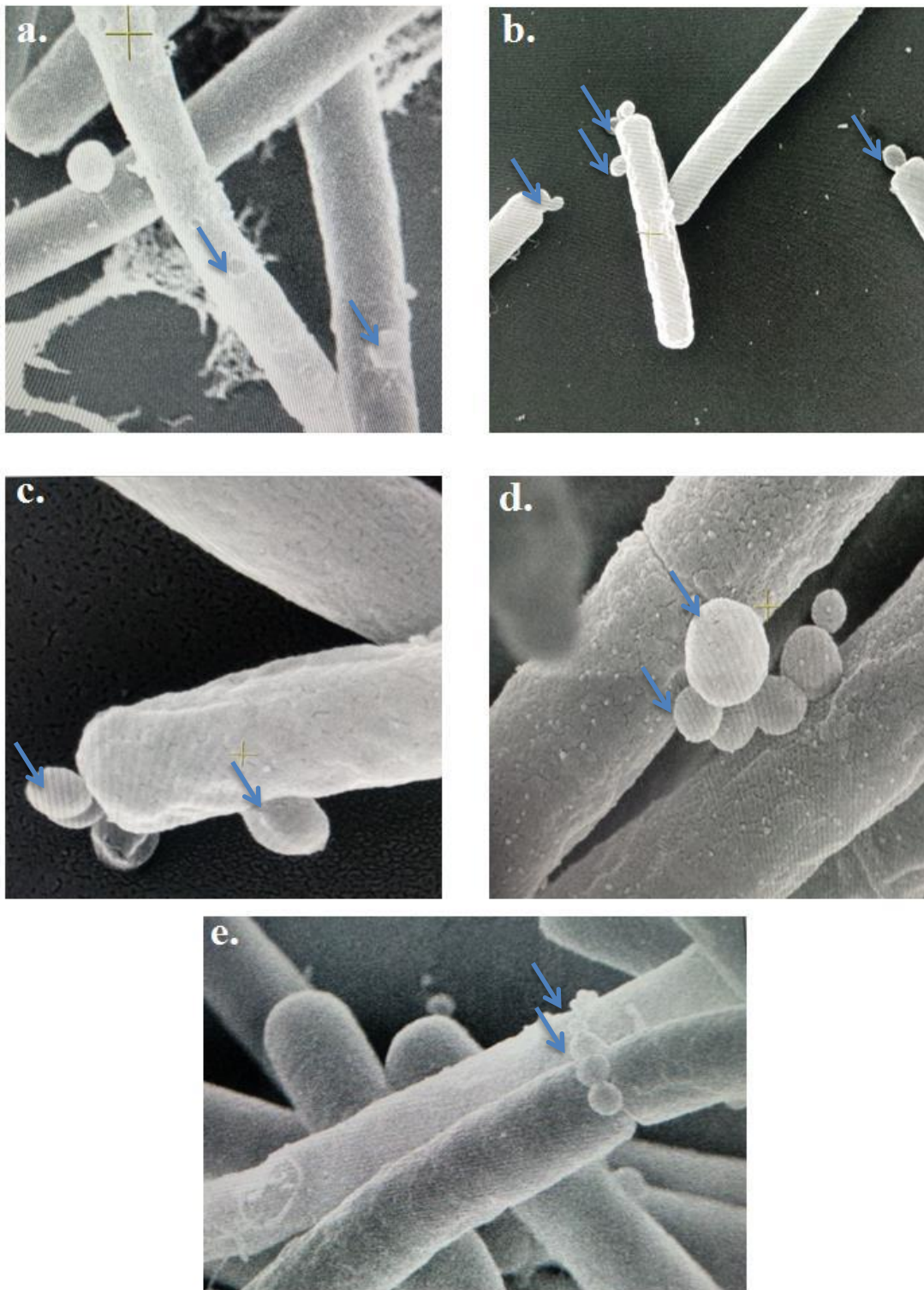
### **5.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão e DLS**

Observamos a presença de vesículas em todas as cepas testadas, R20291 (Figura 7.A), NAP-1 (Figura 7.B) e CTI (Figura 7.C). A análise da cepa CTI foi feita sem a utilização do gradiente de densidade, sendo possível notar artefatos no fundo da imagem referente aos detritos não separados pelas frações. De acordo com a microscopia eletrônica de transmissão, a população de vesículas está concentrada entre as frações 1 a 5.

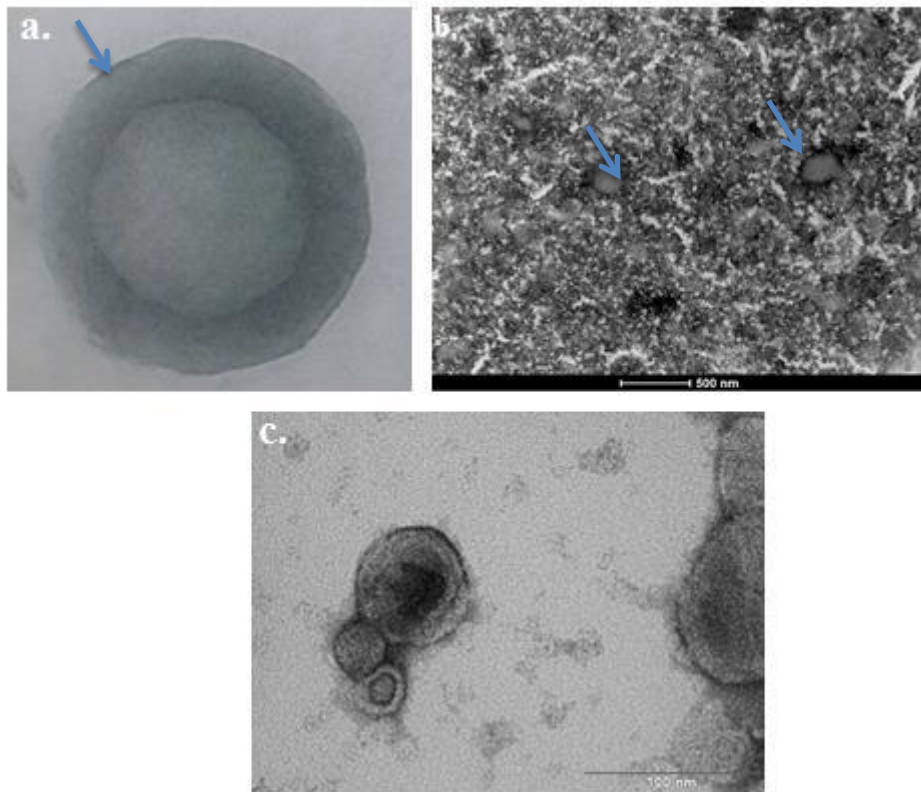
Já no DLS, realizado de cultura proveniente da cepa R20291 é possível encontrar vesículas extracelulares de tamanhos variados (Figura 8). As vesículas têm tamanho entre 70 a 500 nm de acordo com o gráfico, tendo a maior parte por volta de 150 nm. As vesículas detectadas por DLS se concentram nas frações 1 a 5 do gradiente de densidade.

### **5.3. SDS-PAGE**

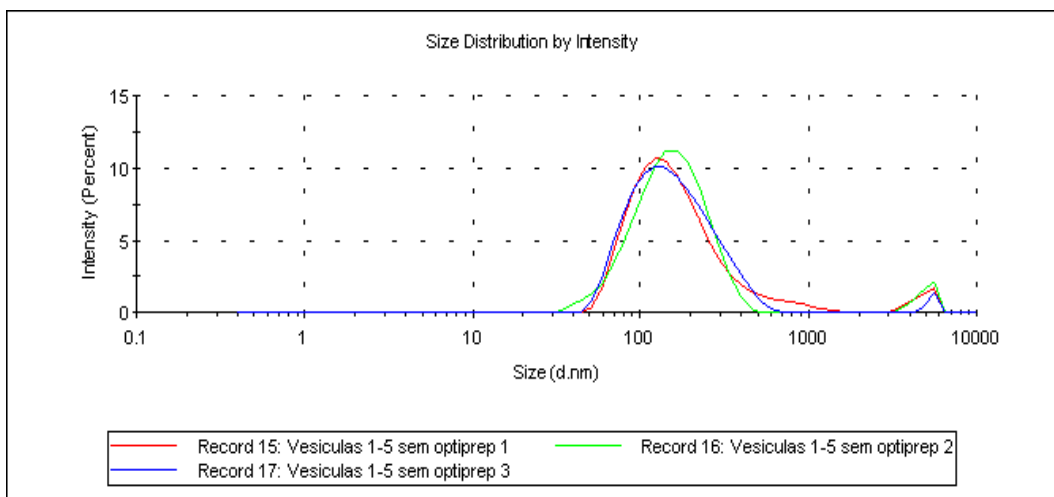
O padrão do gel mostra uma diferença de perfil proteico na fração 2. Já entre as frações 5 e 9 há uma grande similaridade entre o perfil proteico referente a cada coluna. As amostras da fração 2 têm peso molecular entre 60 e 25 KDa, assim como as de 5 a 9 tem perfil proteico com tamanhos e bandas variadas (Figura 9A., 9B. e 9C.). O padrão de peso molecular referente ao segundo gel (Figura 9.B) não apresentou presença de bandas definidas.



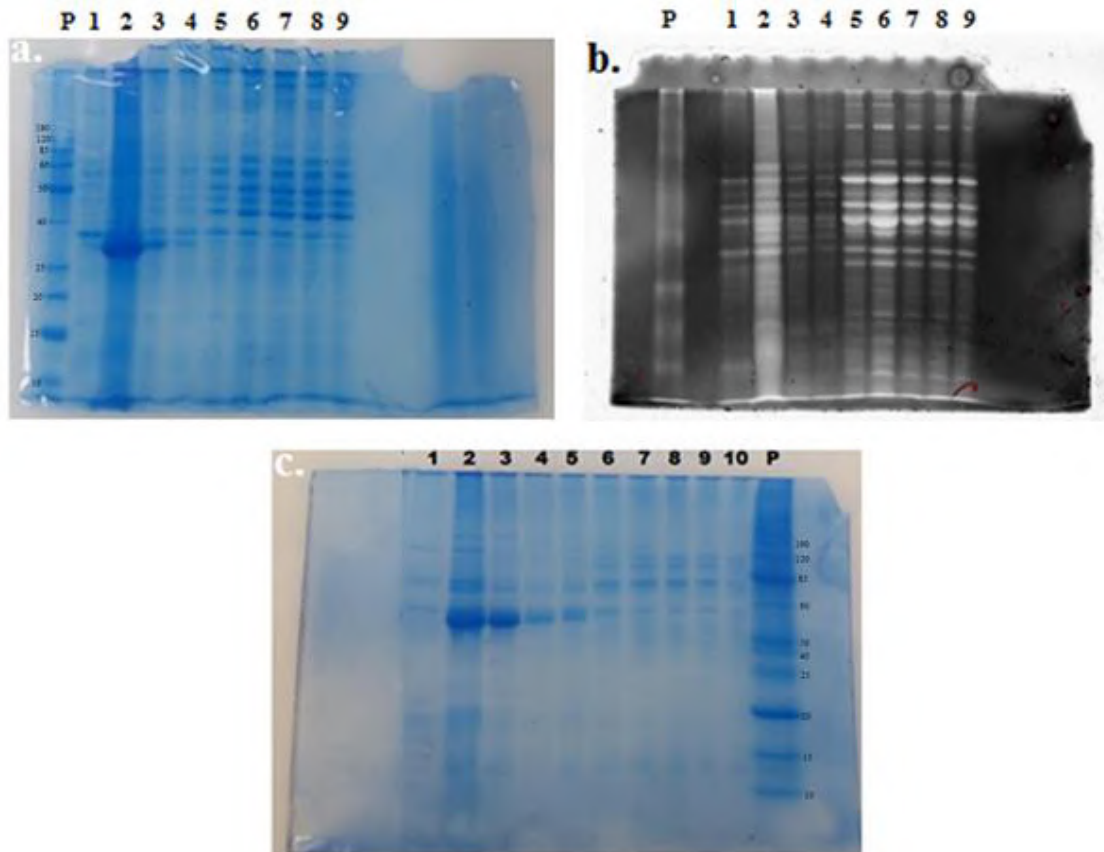
**Figura 6** – Microscopia Eletrônica de Varredura de Cultura de *C. difficile* de R20291 em meio TPG e crescimento em 48h a 37° C. A vesículas já liberadas no meio com *C. difficile* (a), o momento da projeção das VEs da bactéria pela porção terminal e subterminal (b) e (c) e a liberação de vesículas durante o *turnover*, ou seja, durante a divisão da célula (d) e (e).



**Figura 7** – Microscopia Eletrônica de Transmissão mostrando vesículas extracelulares liberadas por diferentes cepas, demonstrando que todas as cepas analisadas são capazes de liberá-las. (a) Vesícula da R20291. Já (b) mostra vesícula liberada pela cepa CTI. Por fim, (c) mostra a vesícula da NAP-1.



**Figura 8** – Gráfico de DLS mostrando a população de vesículas em proporção e tamanhos referentes à mistura das frações de 1 a 5 da cepa R20291.

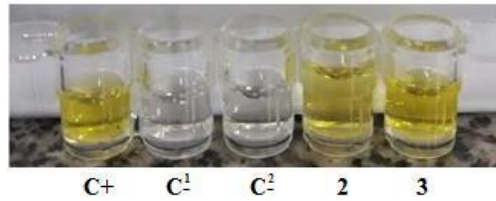


**Figura 9** – Géis de poliacrilamida corados com Coomassie Coloidal mostrando o perfil proteico proveniente de cada fração obtida durante a extração. Os três géis apresentam concentrações de vesículas na porção 2 e 3. O gel (a) e (b) são referentes a cepa R20291 enquanto o gel (c) é referente a Nap-1.

#### 5.4. ELISA

O teste de ELISA foi realizado com a cepa NAP-1, utilizando as frações de maior concentração de vesículas de acordo com os resultados da MET e do SDS-PAGE, sendo então selecionadas as frações 2 e 3 do gel (Figura 9.C). O resultado foi positivo para a presença de toxinas (Figura 10), embora o resultado não diferencie se foi encontrada somente uma toxina ou se foram ambas.

A análise pelo leitor de ELISA também mostrou resultado positivo, de acordo com as instruções presentes no kit, que usa o cálculo para identificar o valor das amostras em relação ao controle. O resultado do controle positivo foi 0.7944, do valor dos controles negativos 0,044 (referente ao controle do kit ou C<sup>-1</sup>) e 0,0571 (referente ao controle Optiprep, HEPES e Triton ou C<sup>-2</sup>). Os valores das amostras 2 e 3 foram 0.8105 e 1.177, sendo superior a 10% do valor de extinção do controle negativo, como indicado no teste.



**Figura 10** – Imagem do teste de ELISA para detecção de toxinas A e B na cepa NAP-1. Controle positivo (C+), controle negativo referente ao kit (C<sup>-1</sup>), controle negativo das amostras de Optiprep, HEPES e Triton (C<sup>-2</sup>) e teste das frações 2 (2) e 3 (3) do gel da Figura 9.C.

### 5.5. “Western Blotting”

O “Western Blotting” foi realizado para a detecção das duas toxinas de *C. difficile*. O resultado da toxina A foi indeterminado (Figura 11B.), com ausência do controle positivo (Figura 11A.), indicando algum problema durante a transferência ou exposição aos anticorpos. Já na toxina B foi possível visualizar bandas reveladas (Figura 11.C). Entretanto, há uma grande região corada com mais de uma banda referente à toxina, sendo possivelmente resultado de uma separação da proteína ou um problema durante o bloqueio. Não houve marcação de nenhum dos padrões de peso molecular utilizados.



**Figura 11** – Imagens referentes ao “Western Blotting” de frações da extração de vesículas advindas da cepa R20291, sendo (a) o gel de espelho utilizado na comparação, contendo controle positivo (C+) e as 9 frações, (b) membrana de nitrocelulose referente ao teste para toxina A e (c) membrana de nitrocelulose referente ao teste para toxina B.



## 6. DISCUSSÃO

O *C. difficile* é um patógeno que faz parte de um grupo de bactérias classificado leigamente como “superbactéria”. Essas bactérias possuem multirresistência a diversos antimicrobianos, e tem se tornado um grande problema para a saúde pública de todo o mundo (Brazier, 2008). Um melhor entendimento das suas formas de resistência, intercomunicação celular, transferência gênica, formas de lesão ao organismo e de ativação do sistema imune é muito importante para desenvolver estratégias de combater a sua infecção, o aumento de custos hospitalares e principalmente, danos aos pacientes. Nesse contexto, o estudo de vesículas extracelulares trazem novas descobertas em todos os quesitos citados (Yáñez-Mo *et al.*, 2015). Além disso, o aumento de dados sobre vesículas secretadas por gram positivas, que até então era escasso, é importante para melhor entendimento não só no processo de biogênese nesse grupo, mas também em qualquer microrganismo que possua parede celular espessa, como fungos e micobactérias (Brown *et al.*, 2015). No contexto geral de formação de vesículas, o estudo acrescenta novos dados sobre esse tópico, possibilitando desenvolvimento de estudos sobre VEs serem produtos conservados geneticamente, o que leva à sua projeção, em que ocasiões são liberadas e a forma de seleção das suas moléculas. Um trabalho publicado em Março de 2017 descreveu pela primeira vez a liberação de vesículas extracelulares de *Clostridioides difficile* (Nicholas *et al.* 2017). A descoberta de novas bactérias produtoras dessas estruturas e suas características é importante para o melhor entendimento sobre essa estrutura, suas funções e o que elas carregam.

Analisando os resultados de imagem referentes à MET de CTI, que não passou pelo processo do gradiente por Optiprep, diferentemente das cepas NAP-1 e de R20291, é possível notar a presença de moléculas interferentes na imagem, tornando-a mais borrada e com presença de artefatos. Isso evidencia a diferença entre uma extração contendo gradiente de densidade com uma resultante de centrifugação isolada.

Os valores encontrados no DLS proveniente das frações contendo essas vesículas indicam tamanhos entre 70 e 500nm. Como dito anteriormente, há algumas diferenças nas vesículas de espécies de gram positivas, podendo ter tamanhos entre 40 a 150 nm ou de 100 a 400 nm (Kim *et al.*, 2015). Isso pode ser proveniente de contaminação externa de exossomas, que podem estar contidos em algum material utilizado na extração como, por exemplo, já descrito por Shelke e colaboradores em 2014 da presença de VEs encontradas em soro fetal

bovino (Shelke *et al.*, 2014). A utilização de microscopias eletrônicas em cultura de células é importante para enfatizar a origem daquela vesícula e evidenciar que há vesículas sendo liberadas pela espécie estudada. A descrição de microvesículas em bactérias gram positivas tem sido em torno de 100 a 300 nm (Brown *et al.* 2015). Nossos resultados contém números que extrapolam os tamanhos citados, indicando uma agregação de vesículas, sendo um processo comum após exposição a ultracentrifugações (Linhares *et al.*, 2015). Outra suposição seria que a síntese e regulação de VEs ocorram diferentemente em cada organismo (Brown *et al.* 2015).

Outro tema referente às imagens de MET foi à presença de uma camada ao redor da vesícula liberada por R20291 (Figura 7.A). A princípio, foi pressuposto que essa camada fosse resultado da presença da camada S de *C. difficile*, porém sua estrutura aparenta ser diferente da apresentada em imagens referentes a estudos de *Sulfolobus solfataricus*, que libera vesículas com esse componente (Ellen *et al.*, 2008). Especula-se que essa camada pode estar relacionada ao procedimento de remoção do Optiprep, levando ao acúmulo desse açúcar na membrana da vesícula.

Já nas imagens referentes à MEV, foi possível identificar que a liberação de vesículas está mais ligada à região terminal e subterminal da bactéria, assim como durante o procedimento de divisão celular, um processo reconhecido de liberação de VEs em gram negativas (Kulp e Koehn, 2012). Há vesículas encontradas no meio perto da célula bacteriana, porém nenhuma imagem mostra a projeção dessa vesícula na região medial, podendo essas VEs serem produtos unicamente da porção terminal, subterminal ou durante a divisão celular. No artigo publicado por Brown e colaboradores em 2014, é possível verificar a presença da projeção de vesículas de *B. subtilis* em uma região subterminal da bactéria, porém os autores não puderam afirmar que seja uma característica da espécie (Brown *et al.*, 2014). Já em relação à divisão celular, é possível que seja um indício de que esse processo também favoreça a liberação de vesículas em gram positivas.

O gel de poliacrilamida apresenta diferença entre o perfil proteico das frações, obtidas após purificações das vesículas, demonstrando a eficiência de separação. De acordo com o resultado do DLS, há uma maior concentração de vesículas entre as frações 1 a 5, o que é compatível com o resultado do SDS-PAGE, que apresenta um perfil de proteínas concentradas entre 1 a 3, com tamanhos variados de proteínas entre 25 e 60 kDa dependendo do gel correspondente. As bandas entre as frações 5 e 9 são semelhantes, indicando a similaridade

entre essas frações. A quantidade de bandas parece ser relativa à metodologia utilizada na extração, possivelmente resultado da eficiência de concentração da primeira centrifugação.

O estudo identificou a presença de toxinas de *C. difficile* nas VEs por “*Western Blotting*” e ELISA. A presença das toxinas em vesículas de *C. difficile* ainda não havia sido descrita, podendo ser proveniente da utilização de cepas hiperprodutoras de toxinas como a R20291 e a NAP-1, do ribotipo 027. Isso pode levar a uma maior concentração dessas agressinas no interior da VE, sendo mais fácil localiza-las (Murray *et al.*, 2009). A liberação de toxinas em vesículas de gram positivas já foi um fato descrito anteriormente, como por exemplo, em *C. perfringens* que é capaz de liberar a toxina Beta-2 (Jiang *et al.*, 2014) e em *B. anthracis*, que é capaz de liberar as PA, EF e LF, como citado anteriormente (Rivera *et al.*, 2011).

O resultado do teste de ELISA confirmou a identificação das toxinas nas vesículas extracelulares de *C. difficile*. A presença dos cálculos confirma a confiabilidade do teste, sendo o controle positivo com um valor aproximado a 0,8 e os controles negativos abaixo de 0,2. As duas amostras testadas tiveram resultado superior ao ponto de corte determinado pelo fabricante. A utilização de metodologia para ruptura da vesícula antes do teste é fundamental para que as proteínas possam ser expostas aos anticorpos do teste (Nameta *et al.*, 2017). Não foi possível identificar se somente uma toxina ou se ambas estavam presentes no “*pool*” de vesículas. No experimento realizado por Trindade e colaboradores sobre liberação de proteínas secretadas por *C. difficile* não foi possível identificar a presença da toxina A no meio (Trindade *et al.*, 2017). Essa toxina era anteriormente identificada como fundamental na patogênese de *C. difficile*, tendo a toxina B com papel secundário na infecção (Lyverly *et al.*, 1985). Porém, anos depois foi possível identificar cepas capazes de levar a CDI com presença de sintomas e que possuíam toxinas B, mas não a toxina A, como as cepas do ribotipo 017 (Drudy, Fanning e Kyne, 2007). Outros estudos comparativos foram realizados, aonde se conclui que a toxina B é essencial para infecção e alta taxa de mortalidade das cepas (Awad *et al.*, 2014). Os resultados referentes ao “*Western Blotting*” foram positivos para TcdB, mas não para TcdA. As toxinas A e B possuem tamanhos de 308 KDa e 270 KDa respectivamente (Drudy, Fanning e Kane, 2007). Comparando a membrana ao gel espelho, foi possível notar que houve reconhecimento de proteínas na parte superior do gel. Comparando o gel espelho com a (Figura 9.A) foi possível identificar que as proteínas reconhecidas apresentam tamanho molecular superior a 190 KDa, em torno de 250 KDa, semelhante ao peso molecular de TcdB, sendo mais uma indicação da presença de toxina B. Apesar disso, houve um reconhecimento exacerbado de bandas nessa

região, sendo um indicativo de ligações inespecíficas de anticorpos, levando a ligações inespecíficas de anticorpos. Já o “*Western Blotting*” da membrana referente a toxina A, não foi possível a visualização de bandas. Além disso, a ausência dos padrões de peso molecular torna o resultado dúbio, sendo necessária a repetição do teste.

No estudo anterior, referente ao isolamento de VEs em *C. difficile* (Nicholas *et al.*, 2017), no entanto, existem questões de metodologia que podem levar a distorções em alguns resultados desse trabalho, principalmente devido à presença de proteínas proveniente de outros compartimentos celulares. Apesar de o autor afirmar que as imagens provenientes da MET são claras, sem presença de nenhum contaminante como flagelos, fímbrias e agregados proteicos, há evidências de que a falta de uma metodologia de separação de vesículas, pode levar a identificação de diversas proteínas proveniente do meio extracelular ou de lisados bacterianos (Corso *et al.*, 2017). Essa separação pode ser feita ou por gradiente de densidade, precipitação ou por cromatografia de exclusão por tamanho (Van Deun *et al.*, 2014; Corso *et al.*, 2017). Esse problema não está somente presente na obtenção de imagens, mas também durante outras etapas do estudo, como perfil encontrado no SDS-PAGE e no processo de espectrometria, sendo visto no estudo de exossomas que em comparação ao material com separação via centrifugação, o isolamento proveniente do gradiente de densidade é muito mais rico em vesículas e puro, enquanto metodologias que não utilizam esse expediente podem levar a concentração de outras moléculas como proteínas citoplasmáticas, proteínas associadas a ácidos nucleicos, DNA e RNA (Dan Veun *et al.*, 2014).

Em relação à espectrometria de massas para identificação das proteínas contidas nas vesículas extracelulares será utilizada a técnica de digestão “*in solution*”, sem separação prévia em gel de poliacrilamida. A identificação das proteínas presentes nas frações ricas em VEs será feita em parceria com o Laboratório de Toxinologia do Pavilhão Osório de Almeida (FIOCRUZ). A purificação das vesículas através do gradiente de densidade pode indicar mais especificidade de proteínas provenientes dessa estrutura comparado ao trabalho de Nicholas e colaboradores (2017). Além disso, o trabalho anterior foi realizado a partir de amostras proteicas cortadas “*in gel*”, enquanto o presente estudo utiliza a técnica “*in solution*”, que é uma técnica reconhecidamente mais sensível à detecção de proteínas, inclusive as hidrofóbicas. No estudo realizado por Lee e colaboradores em 2009, foram analisadas amostras de vesículas de *S.aureus* tanto “*in gel*” como “*in solution*”. De um total de 90 proteínas de vesículas, 84 foram localizadas na solução em digestão contra 41 identificadas provenientes do corte do gel, sendo 35 proteínas encontradas comumente em ambos os métodos (Lee *et al.*, 2009).

Para confirmar a presença de toxinas nas frações enriquecidas em vesículas, seria necessária a realização de um ensaio de citotoxicidade com as células Vero e HT29, para detecção de TcdA e TcdB respectivamente, e utilizando VEs provenientes de uma cepa não toxigênica como a HU29 como controle negativo (Balassiano *et al.*, 2009). O trabalho de Nicholas e colaboradores não detecta a presença de toxinas nas VEs de *C. difficile* (Nicholas *et al.*, 2017). No entanto, é possível detectar morte celular apesar disso, possivelmente causada por outras proteínas encontradas na vesícula, podendo indicar que existam outras moléculas com potencial de lesão celular em menor escala.

Uma repetição do “*Western blotting*” para ambas as toxinas também seria desejável, com padrão molecular para melhores resultados e confirmação da presença da toxina A. A utilização de um anticorpo antitoxina CDT também seria desejável para melhor entendimento do potencial patogênico dessas VEs de *C. difficile*. Apesar disso, é possível identificar essa proteína no resultado da espectrometria de massas, conferindo um novo material de discussão para o trabalho e enriquecimento da discussão.

## 7. CONCLUSÃO

- Foi possível identificar a liberação de vesículas pelas três cepas estudadas, CTI, NAP-1 e R20291. E através do padrão de migração de proteínas em SDS-PAGE e por MET foi possível identificar que o gradiente de densidade concentra as vesículas de *C. difficile* entre as frações 1 a 5.
- De acordo com o DLS, as vesículas foram caracterizadas com tamanho médio de 70 a 500 nm, com maior parte dessas em torno de 150 nm.
- Imagens de MEV possibilitaram a visualização da liberação das VEs por *C. difficile*.
- Por meio do ELISA houve a detecção de toxinas de *C. difficile*, e utilizando o “*Western Blotting*” foi sugerida a presença em especial da toxina B, fundamental para patogênese dessa bactéria.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abt, M. C., McKenney, P. T., & Pamer, E. G. (2016). *Clostridium difficile* colitis: pathogenesis and host defence. *Nature Reviews. Microbiology*, 14(10), 609–620.
- Albuquerque, P. C., Nakayasu, E. S., Rodrigues, M. L., Frases, S., Casadevall, A., Zancope-Oliveira, R. M., Almeida I.C., Nosanchuk, J. D. (2009). Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cellular Microbiology*, 10(8), 1695–1710.
- Anderson, J., Mihalik, R., & Soll, D. R. (1990). Ultrastructure and antigenicity of the unique cell wall pimple of the *Candida opaque* phenotype. *Journal of Bacteriology*, 172(1), 224–235.
- Armengaud J. (2013) Microbiology and proteomics, getting the best of both worlds! *Environmental Microbiology* 15(1), 12–23.
- Atay, S., Gercel-Taylor, C. and Taylor, D. D. (2011), Human Trophoblast-Derived Exosomal Fibronectin Induces Pro-Inflammatory IL-1 $\beta$  Production by Macrophages. *American Journal of Reproductive Immunology*, 66: 259–269.
- Awad, M. M., Johanesen, P. A., Carter, G. P., Rose, E., & Lyras, D. (2014). *Clostridium difficile* virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. *Gut Microbes*, 5(5), 579–593.
- Balassiano I.T, Miranda K.R., Boente R.F., Pauer H., Oliveira I.C.M., Santos-Filho J., Amorim E.L.T., Canine G.A., Souza C.F., Gomes M.Z.R., Ferreira E.O., Brazier J.S., Domingues R.M.C.P. (2009) Characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from immunosuppressed inpatients in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Anaerobe* Volume 15, Issue 3, Pages 61-64.
- Balassiano, I.T., Santos-Filho, J., Vital-Brazil, J.M. Noue'r S.A., Souza C.R.C., Brazier J.S., Ferreira E.O. e Domingues R.M.C.P. (2011) Detection of cross-infection associated to a Brazilian PCR-ribotype of *Clostridium difficile* in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek* 99: 249
- Baran J., Baj-Kryworzeka M. Weglarczyk K., Szatanek R., Zembala M., Barbasz J., Czupryna A., Szczepanik A., Zembala M. (2009) Circulating tumor-derived microvesicle in plasma of gastric cancer patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 59(6):841-50
- Bartlett J.G., Chang T.W., Gurwith M., Gorbach S.L., Onderdonk A.B. (1978) Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *New England Journal of Medicine* ;298(10): 531-4.
- Bauer M.P., Notermans D.W., van Benthem B.H., Brazier J.S., Wilcox M.H., Rupnik M., Monnet D.L., van Dissel J.T., Kuijper E.J. (2011) *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *The Lancet* volume 77, No 9759, p63-73.
- Baumgarten, T., Sperling, S., Seifert, J., von Bergen, M., Steiniger, F., Wick, L. Y., & Heipieper, H. J. (2012). Membrane Vesicle Formation as a Multiple-Stress Response Mechanism Enhances *Pseudomonas putida* DOT-T1E Cell Surface Hydrophobicity and Biofilm Formation. *Applied and Environmental. Microbiology*, 78(17), 6217–6224.
- Bayles, K. W. (2014). Bacterial Programmed Cell Death: Making Sense of a Paradox. *Nature Reviews. Microbiology*, 12(1), 63–69.
- Beauvillain C., Juste M.O., Dion S., Pierre J., Dimier-Poisson I. (2009) Exosomes are an effective vaccine against congenital toxoplasmosis in mice. *Vaccine* 27(11):1750-7.
- Bille S.J., Schubotz F., Roggensack S.E., Thompson A. W., Summons R.E., Chisholm S.E.(2014) Bacterial Vesicles in Marine Ecosystems. *Science* Vol. 343, Issue 6167, pp. 183-186
- Bishop, D. G., & Work, E. (1965). An extracellular glycolipid produced by *Escherichia coli* grown under lysine-limiting conditions. *Biochemical Journal* 96(2), 567–576.

- Bloomfield, L. E., & Riley, T. V. (2016). Epidemiology and Risk Factors for Community-Associated *Clostridium difficile* Infection: A Narrative Review. *Infectious Diseases and Therapy*, 5(3), 231–251.
- Boente R.F. (2012) Interferência de Sais Biliares na Expressão de Proteínas de *Bacteroides fragilis*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Instituto Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Boisvert, H., e Duncan, M. J. (2008). Clathrin-dependent entry of a gingipain adhesin peptide and *Porphyromonas gingivalis* into host cells. *Cellular Microbiology*, 10(12), 2538–2552.
- Brazier J.S (2008) *Clostridium difficile*: from obscurity to superbug. *British Journal of Biomedical Science*, 65:1, 39-44.
- Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R., e Casadevall, A. (2015). Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(10), 620–630.
- Burke, K. E., e Lamont, J. T. (2014). *Clostridium difficile* infection: a worldwide disease. *Gut and liver*, 8(1), 1.
- Burnham C.A. D. e Carroll K. C. (2013). Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection: an Ongoing Conundrum for Clinicians and for Clinical Laboratories. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(3), 604–630.
- Campos F.M.F., Franklin B.S., Teixeira-Carvalho A., Filho A.L.S., de Paula S.C.O., Fontes C.J., Brito C.F. e Carvalho L.H. (2010) Augmented plasma microparticles during acute *Plasmodium vivax* Infection *Malaria Journal* 9:327
- Campos J.H., Soares R.P., Ribeiro K., Andrade A.C., Batista W.L. e Torrecilhas A.C. (2015) Extracellular Vesicles: Role in Inflammatory Responses and Potential Uses in Vaccination in Cancer and Infectious Diseases, *Journal of Immunology Research*, vol. 2015, article ID 832057, 14 pages.
- Candela M, Biagi E, Turroni S, Maccaferri S, Figini P, e Brigidi P (2013) Dynamic efficiency of the human intestinal microbiota. *Critical Reviews in Microbiology*, Early Online: 1–7.
- Cantú M.D., Carrilho E. (2008) Sequenciamento de Peptídeos usando Espectrometria de Massas: um Guia Prático. *Química Nova* volume 31 nº 3.
- Casadevall A., Nosanchuk J. D., Williamson P. e Rodrigues M. L. (2009). Vesicular transport across the fungal cell wall. *Trends in Microbiology*, 17(4), 158–162.
- Cheung, K.-H., Keerthikumar, S., Roncaglia, P., Subramanian, S. L., Roth, M. E., Samuel, M. Sushma A., Lahiru G. Stephen G., Roger A., David G., Mark B. G., Andrew F.H., Robert R. K., Jan L., Tushar P., Dena C. P., Peter Q., Joel R., Robert L. R., Aleksandra S., Andrew I. S., Clotilde T., Kasey V., Marca H. M.W., Suresh M., Aleksandar M. e Laurent, L. C. (2016). Extending gene ontology in the context of extracellular RNA and vesicle communication. *Journal of Biomedical Semantics*, 7, 19
- Choi, D. H., Kwon, Y. M., Chiura, H. X., Yang, E. C., Bae, S. S., Kang, S. G., Lee J.H. Yoon H.S. e Kim, S.-J. (2015). Extracellular Vesicles of the Hyperthermophilic Archaeon “*Thermococcus onnurineus*” NA1<sup>T</sup>. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(14), 4591–4599.
- Choi, H.-I., Choi, J.-P., Seo, J., Kim, B. J., Rho, M., Han, J. K., e Kim, J. G. (2017). *Helicobacter pylori*-derived extracellular vesicles increased in the gastric juices of gastric adenocarcinoma patients and induced inflammation mainly via specific targeting of gastric epithelial cells. *Experimental & Molecular Medicine*, 49(5), e330–.
- Choi, C.W., Park, E. C., Yun, S. H., Lee, S.Y., Kim, S. I., Kim, G.H. (2017). Potential Usefulness of *Streptococcus pneumoniae* Extracellular Membrane Vesicles as Antibacterial Vaccines. *Journal of Immunology Research*, 7931982.
- Cocucci E., Meldolesi J. (2015) Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in Cell Biology* volume 25 , issue 6 , pages 364 – 372.



- Colombo M., Raposo G., Théry C. (2014) Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30:255-89
- Costa, C. L., de Carvalho, C. B. M., González, R. H., Gifoni, M. A. C., de Albuquerque Ribeiro, R., Quesada-Gómez, C., e de Castro Brito, G. A. (2017). Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* infection in a Brazilian cancer hospital. *Anaerobe*, 48, 232-236.
- Davis, J. M., Carvalho, H. M., Rasmussen, S. B., e O'Brien, A. D. (2006). Cytotoxic Necrotizing Factor Type 1 Delivered by Outer Membrane Vesicles of Uropathogenic *Escherichia coli* Attenuates Polymorphonuclear Leukocyte Antimicrobial Activity and Chemotaxis. *Infection and Immunity*, 74(8), 4401-4408.
- Deatherage, B. L., e Cookson, B. T. (2012). Membrane Vesicle Release in Bacteria, Eukaryotes, and Archaea: a Conserved yet Underappreciated Aspect of Microbial Life. *Infection and Immunity*, 80(6), 1948-1957.
- Dorward D. W., Garon, C. F. (1990). DNA Is Packaged within Membrane-Derived Vesicles of Gram-Negative but Not Gram-Positive Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1960-1962.
- Dowling, D. J., Sanders, H., Cheng, W. K., Joshi, S., Brightman, S., Bergelson, Pietrasanta C., van Harwn S.D., van Amsterdam S., Fernandez J., van den Dobbelsteen G.P.J.M. e Levy, O. (2016). A Meningococcal Outer Membrane Vesicle Vaccine Incorporating Genetically Attenuated Endotoxin Dissociates Inflammation from Immunogenicity. *Frontiers in Immunology*, 7, 562.
- Doyle, R. J., Chaloupka, J., e Vinter, V. (1988). Turnover of cell walls in microorganisms. *Microbiological Reviews*, 52(4), 554-567.
- Dridi, L., Tankovic, J., Burghoffer, B., Barbut, F. e Petit, J.-C. (2002). *gyrA* and *gyrB* Mutations Are Implicated in Cross-Resistance to Ciprofloxacin and Moxifloxacin in *Clostridium difficile*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(11), 3418-3421.
- Drudy, D., Fanning, S., e Kyne, L. (2007). Toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. *International Journal of Infectious Diseases*, 11(1), 5-10.
- Eddy J.L., Giolda L.M., Caulfield A.J., Rangel S.M., Latham W.W. (2014) Production of Outer Membrane Vesicles by the Plague Pathogen *Yersinia pestis*. *PLoS ONE* 9(9): e107002
- Ellen, A. F., Albers, S. V., Huibers, W., Pitcher, A., Hobel, C. F., Schwarz, H., Folea M., Schouten S., Boekema E.J., Poolman b. E Driessen, A. J. (2009). Proteomic analysis of secreted membrane vesicles of archaeal *Sulfolobus* species reveals the presence of endosome sorting complex components. *Extremophiles*, 13(1), 67.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516.
- Fais, S. (2013). NK cell-released exosomes: Natural nanobullets against tumors. *Oncoimmunology*, 2(1), e22337.
- Faroq, P. D., Urrunaga, N. H., Tang, D. M., e von Rosenvinge, E. C. (2015) Pseudomembranous Colitis. *Disease-a-Month* : DM, 61(5), 181-206.
- Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., e De Laurenzi, V. (2012). Role of Apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)*, 4(5), 330-349.
- Feist, P., e Hummon, A. B. (2015). Proteomic Challenges: Sample Preparation Techniques for Microgram-Quantity Protein Analysis from Biological Samples. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(2), 3537-3563.
- Ferreira M.C.S., Domingues R.M.C.P., e Uzeda M. (2003) *Manual de Bacteriologia de Anaeróbios*, Rio de Janeiro.
- Ferreira T.G., Barbosa T.F., Teixeira F.L., Ferreira E.O., Duarte R.S., Domingues R.M.C.P. e de Paula G.R. (2013). Effect of hospital disinfectants on spores of clinical Brazilian *Clostridium difficile* strains. *Anaerobe* 22, 121-122.

- Frias A., Manresa A., de Oliveira E., López-Iglesias C., Mercade E. (2010) Membrane Vesicles: A Common Feature in the Extracellular Matter of Cold-Adapted Antarctic Bacteria. *Microbial Ecology*, Vol. 59, No. 3 pp. 476-486
- Furuta, N., Tsuda, K., Omori, H., Yoshimori, T., Yoshimura, F., & Amano, A. (2009). *Porphyromonas gingivalis* Outer Membrane Vesicles Enter Human Epithelial Cells via an Endocytic Pathway and Are Sorted to Lysosomal Compartments. *Infection and Immunity*, 77(10), 4187–4196.
- Gerding, D. N., Johnson, S., Rupnik, M., e Aktories, K. (2014). binary toxin CDT: Mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut Microbes*, 5(1), 15–27.
- Goudarzi M., Seyedjavadi S.S., Goudarzi H., Aghdam E.M., Nazeri S. (2014) *Clostridium difficile* Infection: Epidemiology, Pathogenesis, Risk Factors, and Therapeutic Options. *Scientifica*, vol. 2014, Article ID 916826, 9 pages
- Gould, S. J., e Raposo, G. (2013). As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2, 10.
- Gurung M., Moon D.C., Choi C.W., Lee J.H., Bae Y.C., Kim J., Lee Y.L., Seol S.YA., Cho D.T., Kim S.I., Lee J.L. (2011) *Staphylococcus aureus* Produces Membrane-Derived Vesicles That Induce Host Cell Death. *PLoS ONE* 6(11): e27958.
- György, B., Szabó, T. G., Pásztói, M., Pál, Z., Misják, P., Aradi, B., László V., Pállinger É., Pap E., Kittel Á., Nagy G., Falus A. e Buzás, E. I. (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(16), 2667–2688.
- Hakulinen J., Junnikkala S., Sorsa T. e Meri S. (2004) Complement inhibitor membrane cofactor protein (MCP; CD46) is constitutively shed from cancer cell membranes in vesicles and converted by a metalloproteinase to a functionally active soluble. *European Journal of Immunology*. Volume 34, Issue 9 Pages 2620–2629
- Hall I.C., O'Toole E. (1935) Intestinal Flora in New-born Infants. *American Journal of Disease of Children* 49(2):390-402.
- Hawari F. I., Rouhani, F. N., Cui, X., Yu, Z.-X., Buckley, C., Kaler, M., e Levine, S. J. (2004). Release of full-length 55-kDa TNF receptor 1 in exosome-like vesicles: A mechanism for generation of soluble cytokine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(5), 1297–1302.
- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., e Reddy, D. N. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology* : WJG, 21(29), 8787–8803.
- Janoir C. (2016) Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. *Anaerobe*, volume 37, Págs 13-24.
- Jiang, Y., Kong, Q., Roland, K. L., e Curtiss, R. (2014). Membrane vesicles of *Clostridium perfringens* Type A strains induce innate and adaptive immunity. *International Journal of Medical Microbiology* : IJMM, 304(0), 431–443.
- Kaczanowski S., Sajid M. e Reece, S. E. (2011). Evolution of apoptosis-like programmed cell death in unicellular protozoan parasites. *Parasites & Vectors*, 4, 44.
- Kazanowski, M., Smolarek, S., Kinnarney, F., e Grzebieniak, Z. (2014). *Clostridium difficile*: epidemiology, diagnostic and therapeutic possibilities - a systematic review. *Techniques in Coloproctology*, 18(3), 223–232.
- Kajimura, J., Fujiwara, T., Yamada, S., Suzawa, Y., Nishida, T., Oyamada, Y., Hayashi I., Yamagishi J., Komatsuzawa H. e Sugai, M. (2005). Identification and molecular characterization of an N-acetylmuramyl-l-alanine amidase Sle1 involved in cell separation of *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology*, 58(4), 1087-1101.
- Kaparakis-Liaskos M., Ferrero L.R. (2015) Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nature Reviews Immunology* 15,375–387

- Katsui, N., Tsuchido, T., Hiramatsu, R., Fujikawa, S., Takano, M., e Shibasaki, I. (1982). Heat-induced blebbing and vesiculation of the outer membrane of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 151(3), 1523–1531.
- Kesty, N. C., Mason, K. M., Reedy, M., Miller, S. E., e Kuehn, M. J. (2004). Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells. *The EMBO Journal*, 23(23), 4538–4549
- Kim J.H., Lee J., Park J. e Gho Y.S. (2015) Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles. *Seminars in Cell & Developmental Biology* Volume 40, Pages 97-104.
- King A., Mullish B.H., Williams H.R.T. e Aylin P. (2017) Comparative epidemiology of *Clostridium difficile* infection: England and the USA, *International Journal for Quality in Health Care*, Volume 29, Issue , Pages 785–791.
- Kolodziejek A. M., Caplan A. B., Bohach G. A., Paszczynski A. J., Minnich S. A. e Hovde C. J. (2013). Physiological Levels of Glucose Induce Membrane Vesicle Secretion and Affect the Lipid and Protein Composition of *Yersinia pestis* Cell Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(14), 4509–4514.
- Kulkarni H.M. e Jagannadham M.V. (2014) Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria, *Microbiology Papers in Press* 160: 2109-2121
- Kulp, A., e Kuehn, M. J. (2010). Biological Functions and Biogenesis of Secreted Bacterial Outer Membrane Vesicles. *Annual Review of Microbiology*, 64, 163–184.
- Komura N., Suzuki K.G.N., Ando H., Konishi M., Koikeda M., Imamura A., Chadda R., Fujiwara T.K., Tsuboi H., Sheng R., Cho R., Furukawa K., Furukawa K., Yamauchi Y., Ishida H., Kusumi A. e Kiso M. (2016) Raft-based interactions of gangliosides with a GPI-anchored receptor. *Nature Chemical Biology* 12,402–410.
- Laemmli U.K.(1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259):680-5.
- Lange K., Buerger M., Stallmach A. e Bruns T. (2016) Effects of Antibiotics on Gut Microbiota. *Digestive Disease* 34(3):260-8.
- Lawson P.A., Citron D.M., Tyrrell K.L., Finegold S.M. (2016) Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prevot 1938. *Anaerobe* volume 40, pages 95-99.
- Lee E.Y., Choi D.Y., Kim D.K., Kim J.W., Park J.O., Kim S., Kim S.H., Desiderio D.M., Kim Y.K., Kim K.P., Gho Y.S. (2009) Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. *Proteomics* volume 9, issue 24 pages 5425–5436.
- Lee, J. H., Choi, C.-W., Lee, T., Kim, S. I., Lee, J.-C., e Shin, J.-H. (2013). Transcription Factor  $\sigma^B$  Plays an Important Role in the Production of Extracellular Membrane-Derived Vesicles in *Listeria monocytogenes*. *PLoS ONE*, 8(8), e73196.
- Leist M. e Jäättelä M. *Nature Review Molecule Cell Biology*. 2001 Aug;2(8):589-98.
- Lemee, L., Dhalluin, A., Testelin, S., Mattrat, M.-A., Maillard, K., Lemeland, J.-F. e Pons, J.-L. (2004). Multiplex PCR Targeting *tpi* (Triose Phosphate Isomerase), *tcdA* (Toxin A), and *tcdB* (Toxin B) Genes for Toxigenic Culture of *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), 5710–5714.
- Levy, A. R., Szabo, S. M., Lozano-Ortega, G., Lloyd-Smith, E., Leung, V., Lawrence, R., e Romney, M. G. (2015). Incidence and Costs of *Clostridium difficile* Infections in Canada. *Open Forum Infectious Diseases*, 2(3), ofv076.
- Li Z., Clarke A. J. e Beveridge T. J. (1996). A major autolysin of *Pseudomonas aeruginosa*: subcellular distribution, potential role in cell growth and division and secretion in surface membrane vesicles. *Journal of Bacteriology*, 178(9), 2479–2488.
- Linares, R., Tan, S., Gounou, C., Arraud, N., & Brisson, A. R. (2015). High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, 10.

- Loo V.G., Poirier L., Miller M.A., Oughton M., Libman M.D., Michaud S., Bourgault A.M., Nguyen T., Frenette C., Kelly M., Vibien A., Brassard P., Fenn S., Dewar K., Hudson T.J., Horn R., René P., Monczak Y. e Dascal A. (2006) A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *New England Journal of Medicine* 353:2442-9.
- Lopez-Verrilli M.A. e Court F.A. (2013) Exosomes: mediators of communication in eukaryotes. *Biological Research*, 46: 5-11.
- Lyras, D., O'Connor, J. R., Howarth, P. M., Sambol, S. P., Carter, G. P., Phumoonna, Phumoonna T., Poon R., Adams V., Vedantam G., Johnson S, Gerding D.N. e Rood, J. I. (2009). Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. *Nature*, 458(7242), 1176–1179.
- Lyerly, D. M., Saum, K. E., MacDonald, D. K. e Wilkins, T. D. (1985). Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. *Infection and Immunity*, 47(2), 349–352.
- MacDonald, I. A., e Kuehn, M. J. (2012). Offense and defense: microbial membrane vesicles play both ways. *Research in Microbiology*, 163(9-10), 607–618.
- Martin J.S., Monaghan T.M. e Wilcox M.H. (2016) *Clostridium difficile* infection: epidemiology, diagnosis and understanding transmission. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 13, 206–216.
- Mashburn-Warren, L., Howe, J., Brandenburg, K. e Whiteley, M. (2009). Structural Requirements of the *Pseudomonas* Quinolone Signal for Membrane Vesicle Stimulation. *Journal of Bacteriology*, 191(10), 3411–3414.
- Mathivanan S., Ji H., Simpson R.J. (2009) Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics* volume 73, issue 1, pages 1907-1920.
- McDonald L.C., Killgore G.E., Thompson A., Owens R.C. Jr, Kazakova S.V., Sambol S.P., Johnson S., Gerding DN. (2005) An Epidemic, Toxin Gene-Variant Strain of *Clostridium difficile*. *New England Journal of Medicine* 353(23):2433-41.
- Merrigan M.M., Venugopal A., Roxas J.L., Anwar F., Mallozzi M.J., Roxas B.A.P., Gerding D.N., Viswanathan V.K., Vedantam G. (2013) Surface-Layer Protein A (SlpA) Is a Major Contributor to Host-Cell Adherence of *Clostridium difficile*. *PLoS ONE* 8(11): e78404.
- Monot M., Eckert C., Lemire A., Hamiot A., Dubois T., Tessier C., Dumoulaud B., Hamel B., Petit A., Lalande V., Ma L., Bouchier C., Barbut F., Dupuy, B. (2015). *Clostridium difficile*: New Insights into the Evolution of the Pathogenicity Locus. *Scientific Reports*, 5, 15023.
- Mulcahy, L. A., Pink, R. C., e Carter, D. R. F. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3, 10.
- Murray R., Boyd D., Levett P. N., Mulvey M. R. e Alfa M. J. (2009). Truncation in the *tcdC* region of the *Clostridium difficile* PathLoc of clinical isolates does not predict increased biological activity of Toxin B or Toxin A. *BMC Infectious Diseases*, 9, 103.
- Nameta, M., Saijo, Y., Ohmoto, Y., Katsuragi, K., Yamamoto, K., Yamamoto, T., Ishibashi K. e Sasaki, S. (2016). Disruption of membranes of extracellular vesicles is necessary for ELISA determination of urine AQP2: proof of disruption and epitopes of AQP2 antibodies. *International journal of molecular sciences*, 17(10), 1634.
- Nicholas A., Jeon H., Selasi G.N., Na S.H., Kwon H.I., Kim Y.J., Choi C.W., Kim S.I. e Lee J.C. (2017) *Clostridium difficile*-derived membrane vesicles induce the expression of pro-inflammatory cytokine genes and cytotoxicity in colonic epithelial. *Microbial Pathogenesis* volume 107, pages 6–11.
- O'Donoghue, E. J. e Krachler, A. M. (2016). Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells. *Cellular Microbiology*, 18(11), 1508–1517.

- Oforu, A. (2016). *Clostridium difficile* infection: a review of current and emerging therapies. *Annals of Gastroenterology : Quarterly Publication of the Hellenic Society of Gastroenterology*, 29(2), 147–154.
- Oh H. e Edlund C. (2003) Mechanism of quinolone resistance in anaerobic bacteria. *European Society of Clinical Microbiology and Infection Disease* 9:512-517.
- O'Hara A. M., Shanahan F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*, 7(7), 688–693.
- Olaya-Abril A., Prados-Rosales R., McConnell M.J., Martín-Peña R., González-Reyes J.A., Jiménez-Munguía I., Gómez-Gascón L., Fernández J., Luque-García J.L., García-Lidón C., Estévez H., Pachón J., Obando I., Casadevall A., Pirofski L. e Rodríguez-Ortega M.J.(2014) Characterization of protective extracellular membrane-derived vesicles produced by *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Proteomics* Volume 106 Pages 46-60.
- Oliveira D. L., Freire-de-Lima C. G., Nosanchuk J. D., Casadevall A., Rodrigues M. L., e Nimrichter L. (2010). Extracellular Vesicles from *Cryptococcus neoformans* Modulate Macrophage Functions. *Infection and Immunity*, 78(4), 1601–1609.
- Pereira RS. e Geibel J. (1999) Direct observation of oxidative stress on the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* strains with atomic force microscopy. *Molecular and Cellular Biochemistry*, volume 201, issue 1, pages 17–24.
- Pérez-Bermúdez P., Blesa J., Soriano J.M. e Marcilla A.(2017) Extracellular vesicles in food: Experimental evidence of their secretion in grape fruits. *European Journal of Pharmaceutical Science*. 15;98:40-50.
- Pérez-Cruz C., Carrión O., Delgado L., Martínez G., López-Iglesias C. e Mercade E. (2013). New Type of Outer Membrane Vesicle Produced by the Gram-Negative Bacterium *Shewanella vesiculosa* M7<sup>T</sup>: Implications for DNA Content. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(6), 1874–1881.
- Peternele, W. S., Fuentes, V. M., Fascineli, M. L., Silva, J. R. D., Silva, R. C., Lucci, C. M. e Azevedo, R. B. D. (2014). Experimental investigation of the coprecipitation method: an approach to obtain magnetite and maghemite nanoparticles with improved properties. *Journal of Nanomaterials*, 2014, 94.
- Pollak C. N., Delpino M. V., Fossati C. A. e Baldi P. C. (2012). Outer Membrane Vesicles from *Brucella abortus* Promote Bacterial Internalization by Human Monocytes and Modulate Their Innate Immune Response. *PLoS ONE*, 7(11), e50214.
- Prados-Rosales R., Brown, L., Casadevall, A., Montalvo-Quirós, S. e Luque-Garcia, J. L. (2014). Isolation and identification of membrane vesicle-associated proteins in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *MethodsX*, 1, 124–129.
- Pruitt R. N. e Lacy D. B. (2012). Toward a structural understanding of *Clostridium difficile* toxins A and B. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 28.
- Quigley E. M. M. (2013). Gut Bacteria in Health and Disease. *Gastroenterology & Hepatology*, 9(9), 560–569.
- Quin J. e Xu Q. (2014) Functions and Applications of Exosomes. *Acta Poloniae Pharmaceutica ñ Drug Research*, Vol. 71 No. 4 pp. 537ñ543, 2014
- Rachel R., Wyschkony I., Riehl S. e Huber H. (2002). The ultrastructure of *Ignicoccus*: Evidence for a novel outer membrane and for intracellular vesicle budding in an archaeon. *Archaea*, 1(1), 9–18.
- Reape T.J., McCabe P.F. (2010) Apoptotic-like regulation of programmed cell death in plants. *Apoptosis* volume 15, issue 3, pages 249–256.
- Reed J.C. (2000) Warner-Lambert/Parke-Davis Award Lecture. *American Journal of Pathology*, Vol. 157, No. 5, 1415-1430.
- Regente, M., Corti-Monzón, G., Maldonado, A. M., Pinedo, M., Jorrín, J. e de la Canal, L. (2009). Vesicular fractions of sunflower apoplast fluids are associated with potential exosome marker proteins. *FEBS letters*, 583(20), 3363-3366.

- Reynolds C. M., Ribeiro A. A., McGrath S. C., Cotter R. J., Raetz C. R. H., e Trent M. S. (2006). An Outer Membrane Enzyme Encoded by *Salmonella typhimurium* lpxR That Removes the 3'-Acylxyacyl Moiety of Lipid A. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(31), 21974–21987.
- Rivera J., Cordero R. J. B., Nakouzi A. S., Frases S., Nicola A., Casadevall A. (2010). *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(44), 19002–19007.
- Rodrigues M. L., Nakayasu E. S., Oliveira D. L., Nimrichter L., Nosanchuk J. D., Almeida I. C., Casadevall A. (2008). Extracellular Vesicles Produced by *Cryptococcus neoformans* Contain Protein Components Associated with Virulence. *Eukaryotic Cell*, 7(1), 58–67.
- Rupnik M., Wilcox M.H., Gerding D.N. (2009) *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology* volume 7 pags 526-536.
- Rutter B. D., e Innes R. W. (2017). Extracellular Vesicles Isolated from the Leaf Apoplast Carry Stress-Response Proteins. *Plant Physiology*, 173(1), 728–741.
- Sayed, L., Kothari, D., e Richards, R. J. (2010). Toxic megacolon associated *Clostridium difficile* colitis. *World Journal of Gastrointestinal Endoscopy*, 2(8), 293–297.
- Schaar V., Uddbäck I., Nordström T., e Riesbeck K. (2014) Group A streptococci are protected from amoxicillin-mediated killing by vesicles containing  $\beta$ -lactamase derived from *Haemophilus influenzae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69 (1): 117-120.
- Schrempf H., Koebsch I., Walter S., Engelhardt H., e Meschke H. (2011) Extracellular *Streptomyces* vesicles: amphorae for survival and defence *Microbial Biotechnology* 4(2), 286–299.
- Secco D.A., Balassiano I.T., Boente R.F., Miranda K.R., Brazier J., Hall V., dos Santos-Filho J., Lobo L.A., Nouér S.A., Domingues R.M. (2014) *Clostridium difficile* infection among immunocompromised patients in Rio de Janeiro, Brazil and detection of moxifloxacin resistance in a ribotype 014 strain. *Anaerobe* volume 28, pages 85-89.
- Secco S.A.(2014) Isolamento e Caracterização de Cepas de *Clostridium difficile* e Impacto de Drogas na Microbiota Intestinal. Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Sevcsik, E., Brameshuber, M., Fölser, M., Weghuber, J., Honigmann, A., e Schütz, G. J. (2015). GPI-anchored proteins do not reside in ordered domains in the live cell plasma membrane. *Nature Communications*, 6, 6969.
- Shelke, G. V., Lässer, C., Ghossein, Y. S., e Lötvall, J. (2014). Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3.
- Shreiner A. B., Kao J. Y., e Young V. B. (2015). The gut microbiome in health and in disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, 31(1), 69–75.
- Silva, R.C., Muehlmann, L.A., Da Silva, J.R., Azevedo, R.B., e Lucci, C.M. (2014). Influence of nanostructure composition on its morphometric characterization by different techniques. *Microscopy research and technique*, 77(9), 691-696.
- Smits W. K., Lyras D., Lacy D. B., Wilcox M. H., Kuijper E. J. (2016). *Clostridium difficile* infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 16020.
- Solomon, K. (2013). The host immune response to *Clostridium difficile* infection. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 1(1), 19–35.
- Stabler R. A., He M., Dawson L., Martin M., Valiente E., Corton C., Lawley T.D., Sebahia M., Quail M.A., Rose G., Gerding D.N., Gilbert M., Popoff M.R., Parkhill J., Dougan G., Wren B. W. (2009). Comparative genome and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* 027 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium. *Genome Biology*, 10(9), R102.

Stensballe A. e Bennike T. (2014) Unfiltered beer: a rich source of yeast extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, Volume 3, 27, No. OP2-121.

Stubbs S., Rupnik M., Gibert M., Brazier J., Duerden B., Popoff M. (2000) Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiology Letters* 186 307-312.

Tedesco F.J., Barton R.W., Alpers D.H. (1974) Clindamycin-Associated Colitis. *Annals of Internal of Medicine*. (4):429-33.

Théry C., Boussac M., Véron P., Ricciardi-Castagnoli P., Raposo G., Garin J. e Amigorena S. (2001) Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles. *The Journal of Immunology* 166:7309-7318.

Théry C., Zitvogel L. e Amigorena S. (2002) Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature Reviews Immunology* 2, 569-579

Tiwari V., Solanki V., Roy R., Biswas D., Tiwari M. (2017) Significances of OMV and Extracellular Vesicle Proteomics. *Journal Data Mining in Genomics e Proteomics* 8:208.

Torres J., Camorlinga-Ponce M., Muñoz O. (1995) Sensitivity in culture of epithelial cells from rhesus monkey kidney and human colon carcinoma to toxins A and B from *Clostridium difficile*. *Toxicon*. (4):419-26.

Trindade C.N.R. (2017) Identificação e caracterização das proteínas secretadas por ribotipos de *Clostridioides difficile* reconhecidas por soro de pacientes diagnosticados com CDI. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Van Deun, J., Mestdagh, P., Sormunen, R., Cocquyt, V., Vermaelen, K., Vandesompele, J., Bracke M., De Wever O. e Hendrix, A. (2014). The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3.

Van der Pol E., Böing A.N., Gool E.L., e Nieuwland R. (2016) Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. *Journal of Thrombosis & Haemostasis* 14: 48–56.

Wang J., Silva M., Haas L., Morsci N., Nguyen K. C. Q., Hall D. H., Barr, M. M. (2014). *C. elegans* ciliated sensory neurons release extracellular vesicles that function in animal communication. *Current Biology* 24(5), 519–525.

Warny, M., Pepin, J., Fang, A., Killgore, G., Thompson, A., Brazier, J., Frost E. e McDonald, L. C. (2005). Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *The Lancet*, 366(9491), 1079-1084.

Weiner A., Mellouk N., Lopez-Montero N., Chang Y.-Y., Souque C., Schmitt C., Enninga J. (2016). Macropinosomes are Key Players in Early *Shigella* Invasion and Vacuolar Escape in Epithelial Cells. *PLoS Pathogens*, 12(5), e1005602.

Wenisch J.M., Schmid D., Kuo H.W., Simons E., Allerberger F., Michl V., Tesik P., Tucek G., Wenisch C. (2012) Hospital-acquired *Clostridium difficile* infection: determinants for severe disease. *European Journal of Clinical Microbiology Infection and Disease* 31: 1923.

Wieczorek J.A., Wysoczynski, M., Kijowski, J., Marquez-Curtis, L., Machalinski, B., Ratajczak, J. and Ratajczak, M. Z. (2005), Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *International Journal of Cancer*, 113: 752–760.

Wilkins M.R., Pasquali C., Appel R.D., Ou K., Golaz O., Sanchez J.C., Yan J.X., Gooley A.A., Hughes G., Humphery-Smith I., Williams K.L., Hochstrasser D.F. (1995) From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)*.(1):61-5.

Wilkins M.R., Sanchez J.C., Gooley A.A., Appel R.D., Humphery-Smith I., Hochstrasser D.F., Williams K.L. (1995) Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and Genetic Engineering Review* 13:19-50.

Williams J.N., Weynants V., Poolman J.T., Heckels J.E., Christodoulides M. (2014) Immuno-proteomic analysis of human immune responses to experimental *Neisseria meningitidis* outer membrane vesicle vaccines identifies potential cross-reactive antigens. *Vaccine*, volume 32, issue 11, pages 1280-1286.

Yáñez-Mó M., Siljander P. R.-M., Andreu Z., Zavec A. B., Borràs F. E., Buzas, Casal E., Cappello F., Carvalho J., Colás E., Silva A.C., Fais S., Falcon-Peres J., Ghobrial I.M., Giebel B., Gimona M., Graner M., Kokubun I., Kosanovic M., Kralj-Iglic V., Kramer-Albers E., Laitinen S., Lasser C., Lener T., Ligeti E., Liné A., Lipps G., Llorente A., Lotvall J., Mancek-Keber.M., Marcilla A., Mittelbrunn ., Nazarenko I., Hoen E.N.MN, Nyan T.A., O'Driscoll L., Olivian M. Oleira C., Pálligner., Portillo H.A, Reventós J., Ringau M., Rohde E., Sammar M., Sánchez-Madrid F., Santarém J., Schallmoser K., Ostenfeld M.S., Stoovogel W., Stukelj N, Grein S.G.V. Vasconcelos M.H., Wauben M.H.M., Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, 10.3402.

Yutin N., e Galperin M. Y. (2013). A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore-formers and other misplaced clostridia. *Environmental Microbiology*, 15(10), 2631–2641.

Zhang Z., Wu S., Stenoien D.L., Paša-Tolić L. (2014) High-throughput proteomics. *Annual Review of Analytical Chemistry*, volume 7, pages 427-454.

Zhang, H.-G., e Grizzle, W. E. (2014). Exosomes: A Novel Pathway of Local and Distant Intercellular Communication that Facilitates the Growth and Metastasis of Neoplastic Lesions. *The American Journal of Pathology*, 184(1), 28–41.

Zhou L., Srisatjaluk R., Justus D.E., eDoyle R.J. (1998) On the origin of membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 163 223-228.

Zielke R.A., Ryszard I.H., Weber J.V., Gafken P.R., Sikora A.E. (2014) Quantitative Proteomics of the *Neisseria Gonorrhoeae* Cell Envelope and Membrane Vesicles for the Discovery of Potential Therapeutic Targets. *Molecular e Cellular Proteomics* 13.5: 1299–1317.