

Luiza de Souza Barbosa

Investigação de vesículas extracelulares de *Corynebacterium diphtheriae* e sua atividade biológica em diferentes células



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 e Imunologia Paulo de Góes
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Rio de Janeiro
2024

Trabalho realizado no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, da Faculdade de Farmácia, UFRJ, sob orientação da Professora Lilian de Oliveira Moreira e coorientação da Professora Priscilla Christina Olsen.

FICHA CATALOGRÁFICA**CIP - Catalogação na Publicação**

B238i Barbosa, Luiza de Souza
 Investigação de vesículas extracelulares de
Corynebacterium diphtheriae e sua atividade
biológica em diferentes células / Luiza de Souza
Barbosa. -- Rio de Janeiro, 2024.
 66 f.

 Orientadora: Lilian de Oliveira Moreira.
 Coorientadora: Priscilla Christina Olsen.
 Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2024.

 1. Vesículas extracelulares. 2. Difteria. 3.
Toxina diftérica. 4. Imunomodulação. I. Moreira,
Lilian de Oliveira, orient. II. Olsen, Priscilla
Christina, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE
 TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS
 BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

ALUNO(A): LUIZA DE SOUZA BARBOSA

DRE: 121087319

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Kátia Regina Netto dos Santos (Presidente)

Prof. Leticia de A. M. Carneiro

Prof. Renato Sampaio Carvalho

Prof. Leonardo Nimrichter (Suplente)

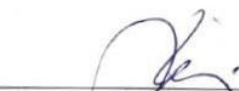
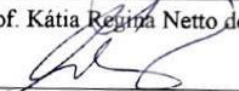
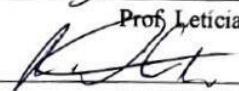
Título da Monografia: "Investigação de vesículas extracelulares de *Corynebacterium diphtheriae* e sua atividade biológica em diferentes células"

Local: Sala I-03, no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da UFRJ.

Data e hora de início: 03 de fevereiro de 2024 às 14:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10 (dez) neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 03 de dezembro de 2024.

NOTA:	Banca Examinadora:
<u>10</u>	 _____ Prof. Kátia Regina Netto dos Santos (Presidente)
<u>10</u>	 _____ Prof. Leticia de A. M. Carneiro
<u>10</u>	 _____ Prof. Renato Sampaio Carvalho
	_____ Prof. Leonardo Nimrichter (Suplente)
Aluno(a):	<u>Luiza de Souza Barbosa</u> _____ Luiza de Souza Barbosa
Orientador(a) (e coorientador):	<u>Lilian</u> <u>Priscilla</u> _____ Lilian de Oliveira Moreira e Priscilla Christina Olsen
Coordenadora de TCC:	<u>Marinella Silva Laport</u> _____ Prof. Marinella Silva Laport

Dedico este trabalho à pequena Luiza e sua curiosidade pelo mundo ao seu redor. Que sua sede de conhecimento e seu desejo de explorar nunca se esgotem.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha família por me apoiar durante este percurso, principalmente aos meus pais, que nunca, nem por um segundo, duvidaram de que eu chegaria a qualquer lugar que desejasse. Obrigada, mãe e pai, que debaixo de muito sol, permitiram que eu caminhasse até aqui na sombra.

Também gostaria de agradecer a todos os meus amigos de graduação que estiveram ao meu lado e tornaram essa caminhada leve e divertida. Em especial ao meu amigo Vitor Chuva, que me acompanha desde que estávamos aprendendo a escrever e me apresentou ao mundo da microbiologia e imunologia. Também gostaria de agradecer à minha amiga Maria Clara que nunca esconde o orgulho que sente por mim.

Agradeço também ao meu companheiro de vida, Rodrigo, que segurou minhas mãos em cada momento assustador e esteve presente celebrando cada uma de minhas conquistas.

Agradeço às minhas orientadoras, Lilian e Priscilla, que tornaram este trabalho possível. Obrigada por acreditarem em mim.

A todos os nossos queridos professores colaboradores, obrigada por cada segundo de orientação que foi dedicado à minha formação.

Às minhas amigas de laboratório, obrigada por cada gota de café, cada risada, conselho, desabafo e discussão. Em especial, agradeço à Amanda, que nunca soltou minha mão no mundo das vesículas extracelulares.

Por fim, agradeço às agências de fomento, CNPq e FAPERJ, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Luiza de Souza Barbosa

Investigação de vesículas extracelulares de *Corynebacterium diphtheriae* e sua atividade biológica em diferentes células

Orientadora: Lilian de Oliveira Moreira

Coorientadora: Priscilla Christina Olsen

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.

Corynebacterium diphtheriae (Cdi) é o agente etiológico da difteria, uma doença respiratória. O principal fator de virulência de Cdi é a toxina diftérica (DT), que é utilizada na formulação da vacina DTP após modificações estruturais. Apesar do sucesso da vacina, um aumento no número de casos da doença tem sido relatado. É importante destacar que a vacinação contra a DT pode proteger contra cepas toxigênicas, mas pouco se sabe sobre seu efeito em cepas não toxigênicas, o que estimula o estudo de outros fatores de virulência bacteriana além da DT. O Cdi possui outros fatores de virulência, como adesinas, neuraminidases e sideróforos. No entanto, pouco se sabe sobre a interação dessas moléculas com o hospedeiro. É sabido que as bactérias podem liberar vesículas extracelulares (VEs) contendo diferentes moléculas, como fatores de virulência, com um papel na fisiologia bacteriana, patogênese e modulação imunológica. Nosso trabalho teve como objetivo isolar VEs de Cdi e avaliar seu conteúdo e capacidade de modular diferentes células. Para isso, as CdiVEs foram concentradas a partir do sobrenadante bacteriano das amostras de Cdi ATCC 27010, não produtora de DT, e ATCC 27012, produtora de DT, usando um sistema VivaFlow e ultracentrifugação. O tamanho e a forma das CdiVEs da cepa atoxinogênica foram analisadas por *Particle Metrix* e microscopia eletrônica de transmissão (TEM). O conteúdo proteico da cepa atoxinogênica foi avaliado por SDS-PAGE e através de uma análise de proteômica. A pesquisa da presença da DT nas CdiVEs da cepa toxinogênica foi realizada por Western blotting (WB) usando anticorpo monoclonal anti-toxina diftérica. O efeito das CdiVEs das cepas toxinogênica e atoxinogênica na atividade metabólica celular foi testada em macrófagos RAW ATCC 264.7 e AMJ2C11 ATCC CRL-2456, epitélio renal VERO ATCC CRL1586 e pneumócitos ATCC A549 CCL-185. Para a avaliação da ativação e modulação de macrófagos, as células RAW ATCC 264.7 e AMJ2C11 ATCC CRL-2456 foram estimuladas com CdiVEs e o óxido nítrico (NO), TNF- α , IL-12 e IL-10 foram dosados. As CdiVEs foram isoladas com sucesso pela primeira vez e, as análises estruturais por TEM e *Particle Metrix* mostram VEs com tamanhos que variam de 15 a 315 nm e tamanho médio de 92.8 nm. Surpreendentemente, a análise por WB revelou a presença de DT nas CdiVEs. A análise preliminar de proteômica mostrou em torno de 123 proteínas, incluindo fatores de virulência. As CdiVEs reduziram a atividade metabólica das células RAW após 24h do estímulo, mas não reduziram a atividade metabólica após 72h. As CdiVEs não diminuíram a viabilidade das células A549 e AMJ após 24h do estímulo. A atividade metabólica das células VERO foi reduzida somente em 96h., independentemente da presença de DT nas CdiVEs. O estímulo dos macrófagos RAW264.7 com CdiVEs por 24h levou à produção de NO e TNF- α ,

mas não de IL-12 e IL-10. Nossos achados mostram que o Cdi é capaz de produzir VEs que carregam diferentes moléculas, incluindo a DT, com potencial modulatório em células do hospedeiro, oferecendo novas perspectivas sobre a patogênese da difteria e possíveis alvos terapêuticos.

Palavras-chave: Vesículas extracelulares; Toxina diftérica; Modulação imunológica.

ABSTRACT**Luiza de Souza Barbosa****Investigação de vesículas extracelulares de *Corynebacterium diphtheriae* e sua atividade biológica em diferentes células****Orientadora: Lilian de Oliveira Moreira****Coorientadora: Priscilla Christina Olsen**

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.

Corynebacterium diphtheriae (Cdi) is the etiological agent of diphtheria, a respiratory disease. The main virulence factor of Cdi is diphtheria toxin (DT), which is used in the formulation of the DTP vaccine after structural modifications. Despite the success of the vaccine, an increase in the number of cases of the disease has been reported. It is important to highlight that vaccination against DT can protect against toxigenic strains, but little is known about its effect on non-toxigenic strains, which stimulates the study of other bacterial virulence factors beyond DT. Cdi has other virulence factors, such as adhesins, neuraminidases, and siderophores. However, little is known about the interaction of these molecules with the host. It is known that bacteria can release extracellular vesicles (EVs) containing various molecules, such as virulence factors, playing a role in bacterial physiology, pathogenesis, and immune modulation. Our work aimed to isolate EVs from Cdi and evaluate their content and ability to modulate different cells. In order to do this, EVs were concentrated from the bacterial supernatant of Cdi samples ATCC 27010 (non-toxigenic Cdi) and ATCC 27012 (toxigenic Cdi) using a VivaFlow system and ultracentrifugation. The size and structure of the CdiEVs were analyzed by Particle Metrix and transmission electron microscopy (TEM). The protein content was assessed by SDS-PAGE and proteomic analysis. The presence of DT within CdiEVs was detected by Western blotting (WB) using a monoclonal anti-diphtheria toxin antibody. The effect of CdiEVs on cell's metabolic activity was tested in RAW macrophages (ATCC 264.7), AMJ2C11 (ATCC CRL-2456), VERO renal epithelial cells (ATCC CRL1586), and A549 pneumocytes (ATCC A549 CCL-185). To evaluate macrophage activation and modulation, RAW (ATCC 264.7) and AMJ2C11 (ATCC CRL-2456) cells were stimulated with CdiEVs, and nitric oxide (NO), TNF- α , IL-12, and IL-10 were measured. CdiEVs were successfully isolated for the first time, and structural analysis by TEM and Particle Metrix showed EVs with sizes ranging from 15 to 315 nm, with a mean size of 92.8 nm. Surprisingly, WB analysis revealed the presence of DT within CdiEVs. Preliminary proteomic analysis identified approximately 123 proteins, including virulence factors. CdiEVs reduced the metabolic activity of RAW cells after 24 hours of stimulation, but did not reduce metabolic activity after 72 hours of incubation. CdiEVs did not reduce the viability of A549 and AMJ cells after 24 hours of stimulus. The metabolic activity of VERO cells was reduced only after 96 hours of incubation, regardless of the presence of DT within the CdiEVs. Stimulus of RAW264.7 macrophages with CdiEVs for 24 hours led to the production of NO and TNF- α , but not IL-12 or IL-10. Our findings show that Cdi can produce EVs that carry different molecules, including DT, with potential modulatory effects on host cells, offering new insights into the pathogenesis of diphtheria and possible therapeutic targets.

Key words: Extracellular vesicles; Diphtheria toxin; Immune modulation.

RESUMO PARA LEIGOS

Luiza de Souza Barbosa

Investigação de vesículas extracelulares de *Corynebacterium diphtheriae* e sua atividade biológica em diferentes células

Orientadora: Lilian de Oliveira Moreira

Coorientadora: Priscilla Christina Olsen

Resumo para leigos 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.

Corynebacterium diphtheriae é uma bactéria que causa difteria, uma doença respiratória grave. Esta bactéria produz uma toxina, chamada toxina diftérica, que é capaz de matar nossas células e nos levar à morte. Atualmente, já existe uma vacina contra difteria que é feita modificando a toxina diftérica para que não nos cause danos. Embora a vacina tenha sido muito eficaz, alguns casos de difteria ainda estão surgindo. A vacina protege contra as bactérias que produzem a toxina, mas não contra bactérias parecidas que não produzem essa toxina. Por isso, é importante estudar outros fatores que tornam essa bactéria perigosa. Sabemos que essa bactéria tem outras formas de atacar o corpo, como substâncias que ajudam a bactéria a se prender às células e outras que enfraquecem o sistema imunológico, que precisam ser mais estudadas. Além disso, a bactéria pode soltar pequenas "bolsas" chamadas de vesículas extracelulares que podem levar substâncias nocivas das bactérias até diferentes áreas do corpo. O objetivo do nosso trabalho era investigar se *Corynebacterium diphtheriae* produz vesículas e estudar o que existe dentro delas e como elas afetam as células de defesa do nosso corpo. Para isso, usamos técnicas para separar essas vesículas e ver seu tamanho e formato. Descobrimos que elas têm cerca de 100 nanômetros e que parecem carregar a toxina diftérica. Testamos essas vesículas em várias células e vimos que elas não parecem danificar as células. No entanto, elas ativaram os macrófagos que são células de defesa importantes. Pela primeira vez, mostramos que a *Corynebacterium diphtheriae* produz vesículas que carregam moléculas importantes que podem afetar as células de defesa. Estamos analisando mais a fundo o que essas vesículas carregam e como elas interagem com as células humanas, o que pode ajudar a encontrar novas formas de tratar a difteria no futuro.

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1 - Coloração de Gram de <i>Corynebacterium</i> em amostra de trato respiratório.....	2
Figura 2 - Apresentações clínicas da difteria.....	3
Figura 3 - Estrutura proteica da toxina diftérica.....	5
Figura 4 - Mecanismo de ação da toxina diftérica.....	5
Figura 5 - Situação epidemiológica da difteria no mundo.....	9
Figura 6 - Situação epidemiológica da difteria nas diferentes regiões do mundo.....	10
Figura 7 - Casos de difteria no Brasil entre 2000 e 2023.....	11
Figura 8 - Potencial de aplicabilidade das vesículas extracelulares.....	15
Figura 9 - Sistema VivaFlow.....	17
Figura 10 - Esquema do protocolo adaptado para isolamento e purificação de Vesículas Extracelulares	18
Figura 11 - Análise estrutural de VEs de <i>C. diphtheriae</i>	25
Figura 12 - Análise de VEs purificadas de <i>C. diphtheriae</i> ATCC 27010 por SDS-PAGE.....	25
Figura 13 - Detecção da toxina diftérica (DT) nas VEs isoladas de <i>C. diphtheriae</i> produtor ou não de toxina	26
Figura 14 - Distribuição das 123 proteínas detectadas nas VEs de <i>C. diphtheriae</i>	30
Figura 15 Efeito das VEs de <i>C. diphtheriae</i> na atividade metabólica de macrófagos murinos (RAW ATCC 264.7) detectada através do ensaio MTT.....	31
Figura 16 - Efeito das VEs de <i>C. diphtheriae</i> na atividade metabólica de macrófagos alveolares ATCC AMJ2C11 CRL-2456 e pneumócitos ATCC A549 CCL-185 detectada através do ensaio MTT.....	32
Figura 17 - Efeito das VEs de <i>C. diphtheriae</i> na atividade metabólica de células de epitélio pulmonar VERO ATCC CRL1586 detectada através do ensaio MTT.....	33
Figura 18 - Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos murinos estimulados com diferentes concentrações de VEs de <i>C. diphtheriae</i>	34
Figura 19 - Detecção da produção de citocinas por macrófagos RAW ATCC 264.7 estimulados com VEs purificadas.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise proteômica de VEs de <i>C. diphtheriae</i> ATCC 27010 mostra um perfil de 123 proteínas totais detectadas.....	27
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACDVs:** Do inglês, Artificial Cell-Derived Vesicles, significa Vesículas derivadas de células artificiais;
- ADP:** Do inglês, Adenosine Diphosphate, significa Adenosina difosfato;
- APCs:** Do inglês, Antigen-Presenting Cells, significa Células apresentadoras de antígenos;
- ATCC:** Do inglês, American Type Culture Collection.
- Cdi:** *Corynebacterium diphtheriae*;
- CdiLAM:** Do inglês, *Corynebacterium diphtheriae* Lipoarabinomannan, significa Lipoarabinomannana de *Corynebacterium diphtheriae*;
- CdiVEs:** Vesículas extracelulares derivadas de *Corynebacterium diphtheriae*;
- CMNR:** Grupo de bactérias composto por *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*;
- dT:** Vacina combinada de toxóide tetânico e toxóide diftérico;
- DIP0733, DIP1281, DIP1621, DIP2093:** Genes ou proteínas associados ao *Corynebacterium diphtheriae*;
- DLS:** Do inglês, Dynamic light scattering, significa Espalhamento Dinâmico de Luz;
- DMEM:** Do inglês, Dulbecco's Modified Eagle Medium, significa Meio Dulbecco modificado por Eagle;
- DMSO:** Dimetilsulfóxido;
- DNA:** Do inglês, Deoxyribonucleic Acid, significa Ácido desoxirribonucleico;
- DOC:** Do inglês, Sodium deoxycholate, significa Desoxicolato de sódio.
- DTP:** Do inglês, Diphtheria, Tetanus, Pertussis and significa vacina combinada contra difteria, tétano e coqueluche;
- DTPa:** Do inglês, Diphtheria, Tetanus and acellular Pertussis, significa vacina combinada contra difteria, tétano e coqueluche acelular;
- DTPw:** Do inglês, Diphtheria, Tetanus and Pertussis whole-cell, significa vacina combinada contra difteria, tétano e coqueluche celular;
- DTT:** Do inglês, Dithiothreitol, significa Ditiotreitól;
- DtxR:** Do inglês, Diphtheria toxin repressor, significa Repressor da toxina diftérica;
- EF-2:** Do inglês, elongation Factor 2, significa Fator de alongamento 2;
- ELISA:** Do inglês, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, significa Ensaio de Imunoabsorção Enzimática;
- FPS:** Do inglês, Frames per second, significa Quadros por segundo;
- GC:** Do inglês, Guanine-Cytosine, significa Guanina-citosina;
- HB-EGF:** Do inglês, Heparin-binding EGF-like growth factor, significa Fator de Crescimento Tipo EGF Ligado à Heparina;
- IAA:** Do inglês, Indole-3-acetic acid, significa Ácido Indolacético;
- IL:** Do inglês, Interleukin, significa Interleucina;
- IMPG:** Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da UFRJ;
- Lpr:** Do inglês, Lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*, significa Lipoproteínas associadas ao *Mycobacterium tuberculosis*;
- LPS:** Lipopolissacarídeo;
- LPSN:** Do inglês, List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature, significa Código Internacional de Nomenclatura de Procariotos;
- MAMPs:** Do inglês, Microbial-Associated Molecular Patterns, significa Padrão Molecular Associado a Microrganismos;
- MEC:** Matriz extracelular;
- MenB:** Meningococo do grupo B;

Meso-DAP: ácido meso-diaminopimélico;
MET: Microscopia eletrônica de transmissão;
µg: Micrograma;
MISEV: do inglês, Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles, significa Informações mínimas para o estudo de Vesículas extracelulares;
MHC: Do inglês, Major Histocompatibility Complex, significa Complexo Principal de Histocompatibilidade;
min: minuto;
mL: Mililitro;
µL: Microlitro;
µm: Micrômetro;
mM: Milimolar;
Mn: Manganês;
MTT: Do inglês 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), significa Tetrázólio de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrázólio;
MSCRAMMs: Do inglês, Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules, significa Componentes Superficiais Microbianos Reconhecendo Moléculas Matriciais Adesivas;
NAD: Nicotinamida adenina dinucleotídeo;
Neu5Ac: Ácido N-acetilneuramínico;
nm: Nanômetro;
NO: Do inglês Nitric Oxide, significa Nitric Oxide;
NTCD: Do inglês, Non-Toxigenic Corynebacterium diphtheriae, significa *Corynebacterium diphtheriae* não toxigeno;
OMS: Organização Mundial da Saúde;
OxyR: Proteína reguladora envolvida na resposta ao estresse oxidativo;
PAI: Programa Ampliado de Imunização;
PBS: Do inglês, Phosphate Buffered Saline, significa Tampão fosfato-salino;
PBPs: Do inglês, Penicillin binding proteins, significa Proteínas de ligação à penicilina;
PM: Peso molecular;
PspA: Do inglês, PspA shockprotein, significa proteína de fase de choque;
IM30: Do inglês, Inner Membrane 30 kDa, significa proteína de membrana interna 30kDa;
ROS: Do inglês, Reactive Oxygen Species, significa Espécies reativas de oxigênio;
RPM: Rotações por minuto;
SDS-PAGE - Do inglês, Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, significa Eletroforese em Gel de Acrilamida Dodecil Sulfato de Sódio
Spa: Do inglês, Surface proteins, significa proteínas de superfície;
TEM: Do inglês, Transmission Electron Microscopy, significa Microscopia eletrônica de transmissão;
TFF: Do inglês, Tangential Flow Filtration, significa Filtração por fluxo tangencial;
TLR: Do inglês, Toll-Like Receptor, significa Receptor do tipo Toll;
TMB: Tetrametilbenzidina;
TNF: Do inglês, Tumor Necrosis Factor, significa Fator de Necrose Tumoral;
TSA: Do inglês, Tryptic Soy Agar, significa Agar Triptona de Soja;
TSB: Do inglês, Tryptic Soy Broth, significa Caldo Triptona de Soja;
UERJ: Universidade do Estado do Rio de Janeiro;
UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro;
VEs: Vesículas extracelulares;
WHO: Do inglês, World Health Organization, significa Organização Mundial de Saúde;
 °C – Grau Celsius;

Zn: Zinco;

ÍNDICE

1. Introdução	1
1.1 <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1
1.2 Difteria	2
1.3 Toxina diftérica	3
1.4 Outros fatores de virulência.....	6
1.5 A vacina DTP.....	7
1.6 Epidemiologia	8
1.7 Vesículas extracelulares.....	12
2. Objetivos	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. Metodologia	17
3.1 Isolamento de vesículas extracelulares.....	17
3.1.1 Condições de cultivo.....	17
3.1.2 Isolamento das VEs.....	17
3.2 Análise estrutural de vesículas extracelulares	19
3.2.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	19
3.2.2 Análise de rastreamento de nanopartículas por Zetaview.....	19
3.3 Análise de conteúdo proteico de vesículas extracelulares.....	20
3.3.1 SDS-PAGE.....	20
3.3.2 Detecção da toxina diftérica por <i>Western blotting</i> (WB).....	20
3.3.3 Proteômica.....	21
3.4 Ensaio de atividade biológica.....	22
3.4.1 Ensaio de citotoxicidade.....	22
3.4.2 Ensaio de dosagem de óxido nítrico.....	23
3.4.4 Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	23
4. Resultados	24
4.1 Análise estrutural de VEs de <i>C. diphtheriae</i>	24
4.2 Análise de conteúdo proteico das VEs.....	25
4.2.1 SDS-PAGE.....	25
4.2.2 Detecção da toxina diftérica por <i>Western blotting</i>	25
4.2.3 Proteômica das VEs de <i>C. diphtheriae</i>	26
4.3 Ensaio de atividade biológica.....	30
4.3.1 Efeito das VEs purificadas na atividade metabólica de diferentes células.....	30
4.3.2 Indução da produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos murinos estimulados com VEs.....	32
4.3.3 Detecção da produção de citocinas em macrófagos estimulados com VEs purificadas.....	34
5. Discussão	34
6. Conclusões	40
7. Referências bibliográficas	42

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Corynebacterium diphtheriae*

O gênero *Corynebacterium* pertence à família Corynebacteriaceae e ao filo Actinobacteria, que também inclui os gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*, conhecidos coletivamente como CMNR (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*) devido à presença de ácidos micólicos em suas complexas estruturas de parede celular. Este filo é caracterizado por bactérias Gram-positivas com alto conteúdo de GC (guanina e citosina) no DNA e frequentemente exibem formas ramificadas, contribuindo para sua diversidade morfológica (Burkovski, 2023).

Atualmente, *Corynebacterium* inclui 165 espécies descritas no Código Internacional de Nomenclatura de Procariotos (LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, 2024). O gênero é composto por bacilos Gram-positivos de morfologia irregular (claviforme) com largura de 0,3 a 0,8 μm e comprimento de 1,0 a 8,0 μm . (**Figura 1**), aeróbios ou anaeróbios facultativos, imóveis e catalase-positivos (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2017).

O peptidoglicano de sua parede celular é composto de ácido meso-diaminopimélico (meso-DAP) e os principais polímeros de parede celular contém os açúcares: arabinose e galactose (também conhecidos como arabinogalactano), podendo também apresentar polímeros contendo manose e arabinose (chamados de lipoarabinomananas, CdiLAM) (Moreira, Mattos-guaraldi e Andrade, 2008). São encontrados também ácidos micólicos de cadeia curta, entretanto, diferente de outros gêneros taxonomicamente correlatos, não são bactérias álcool-ácido resistentes (Bernard e Funke, 2015). Muitas espécies produzem ácido a partir de glicose e alguns outros açúcares em meio com peptona. Outras alcalinizam citrato como única fonte de carbono, mas a maioria das espécies não (Bernard e Funke, 2015).

As corinebactérias são ubíquas em plantas e animais, e normalmente colonizam a pele, os tratos respiratório superior, gastrointestinal e geniturinário de humanos. A espécie mais conhecida e estudada do gênero é *Corynebacterium diphtheriae*, o principal agente etiológico da difteria. *C. diphtheriae* possui 4 biótipos (*belfanti*, *gravis*, *intermedius* e *mitis*) de acordo com sua morfologia de colônias e propriedades bioquímicas (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2017).

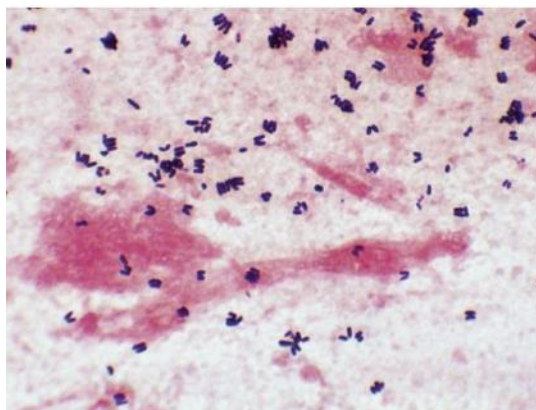


Figura 1 - Coloração de Gram de *Corynebacterium* de uma amostra do trato respiratório de paciente com difteria (Fonte: Murray, Rosenthal e Pfaller, 2017).

1.2 Difteria

A difteria pode ser classificada em respiratória (atingindo a cavidade nasal, faringe, laringe e tonsilas), cutânea (incluindo as áreas genitais) ou ocular, entretanto, mais comumente, infectam as vias respiratórias (Murphy, 1996). A apresentação clínica da difteria respiratória se caracteriza principalmente pela formação de uma pseudomembrana branco-acinzentada densa que ocorre tipicamente nas tonsilas (**Figura 2b**), disseminando-se para as estruturas posteriores da boca e para a faringe proximal. A pseudomembrana resulta do crescimento bacteriano no local, onde ocorre a conversão do fibrinogênio em fibrina, com presença de necrose tecidual através da ação da toxina diftérica (DT) (Hadfield *et al.*, 2000). O envolvimento dos gânglios linfáticos cervicais pode ocorrer (**Figura 2a**) e levar ao inchaço do pescoço do paciente, aspecto clínico conhecido popularmente como “pescoço de touro” (Murphy, 1996).

A difteria cutânea se caracteriza principalmente pela ocorrência de lesões ulcerativas na pele, múltiplas ou não, em geral cobertas por uma pseudomembrana marrom-acinzentada (**Figura 2c**) que ocorre principalmente nos membros inferiores (Hadfield *et al.*, 2000). As úlceras diftéricas possuem como principal característica sua cronicidade pois, em geral, perduram por muitas semanas mesmo após tratamento com antimicrobianos (Livingood, Perry e Forrester, 1946). Em raros casos, *C. diphtheriae* pode estar associado a infecções no ouvido, nos olhos ou na área genital feminina (Zakikhany e Efstratiou, 2012).

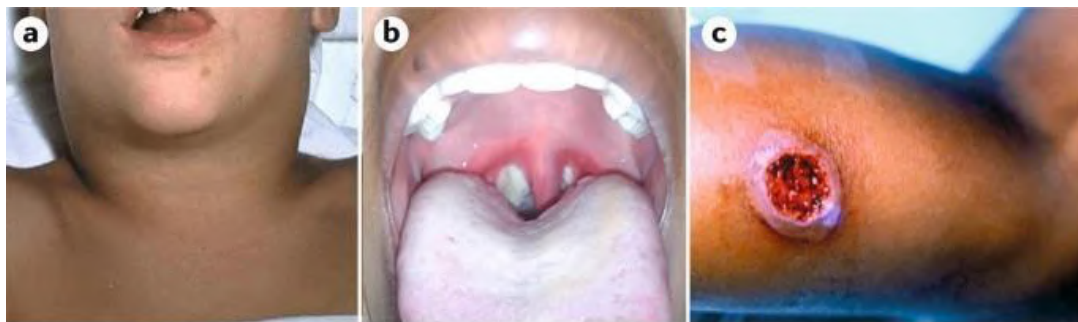


Figura 2 - Apresentações clínicas da difteria. (A) Gânglios linfáticos aumentados; (B) Pseudomembrana espessa na faringe posterior. A pseudomembrana é uma camada de bactériase detritos da necrose dos tecidos circundantes devido à toxina diftérica; (C) Lesão cutânea causada por *Corynebacterium diphtheriae* (Fonte: Sharma *et al.*, 2019).

O crescimento bacteriano ocorre no local da infecção, entretanto, a DT produzida pelo microrganismo se distribui através do sangue e provoca patologia sistêmica grave, com complicações neurológicas e cardíacas (Hadfield *et al.*, 2000). Evidências de miocardite leve (50-75%) ou grave (10-15%) são encontradas em pacientes em estado grave, em geral, entre 1-2 semanas após o início dos sintomas. A toxicidade neurológica ocorre em até 75% dos pacientes com doença grave, manifestando-se como neuropatia, que pode variar de fraqueza leve à paralisia total (Hadfield *et al.*, 2000). Embora o microrganismo seja mais comumente associado a infecções não invasivas, casos de seu isolamento em infecções invasivas já foram documentados. Nos últimos 20 anos, tem-se observado um aumento significativo nas associações entre infecções invasivas (como bacteremia, endocardite e septicemia) e isolados não toxigênicos (Bläckberg *et al.*, 2021).

1.3 Toxina diftérica

Três espécies, *C. diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*, são conhecidas por produzir a DT (Will *et al.*, 2021). A DT é codificada por um gene presente em um bacteriófago, cuja aquisição do gene *tox* pela bactéria ocorre através da integração lisogênica do genoma do β -profago em seu cromossomo, tornando-a assim toxigênica. O profago que codifica a DT se integra em

locais específicos do cromossomo da bactéria por recombinação específica (Freeman, 1951). As cepas mais virulentas de *C. diphtheriae* podem possuir duas ou até três cópias do genoma do β -profago inseridos em seu cromossomo (Laird e Groman, 1976).

A DT é uma exotoxina sintetizada e liberada no meio extracelular pela bactéria como uma única cadeia polipeptídica de cerca de (62-63 kDa) contendo duas pontes dissulfeto (Pappenheimer, 1977).

A DT é reconhecida e endocitada nas células do hospedeiro através da ligação de seu fragmento B ao fator de crescimento tipo EGF ligante de heparina (HB-EGF). O HB-EGF está presente em diversas células do hospedeiro (epiteliais, endoteliais, musculares lisas, macrófagos, etc.) e regula alguns processos biológicos, como o crescimento celular, diferenciação celular e reparo tecidual. No contexto do mecanismo de ação da toxina diftérica, o HB-EGF atua como um receptor da DT (Murphy, 2011). Uma vez que domínio R, presente no fragmento B, reconhece o receptor HB-EGF, a DT é internalizada por endocitose mediada por clatrina. As proteases associadas ao endossomo clivam parcialmente a ligação entre as subunidades da DT, e após esta ação proteolítica, a proteína se separa em dois fragmentos, A (24 kDa) e B (38-39 kDa) (**Figura 3**), e a exposição às condições ácidas desencadeia uma mudança conformacional que permite que o domínio T, presente no fragmento B, se insira na membrana do endossomo e ocorra a subsequente translocação da subunidade A através da membrana endossomal para o citosol. No citosol, o fragmento A possui a capacidade de catalisar a ADP-ribosilação dependente de NAD^+ do fator de alongamento 2 (EF-2), ou seja, promove a transferência da porção ADP-ribose do dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NAD) para o EF-2 do hospedeiro. A ADP-ribosilação impede a atividade de translocação de EF-2, resultando na inibição da síntese proteica e, conseqüentemente, na morte da célula hospedeira (**Figura 4**) (Murphy, 2011; Sharma *et al.*, 2019).

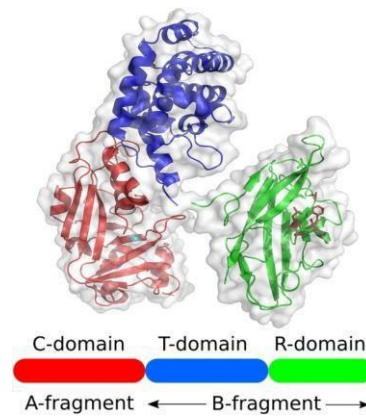


Figura 3 - Estrutura proteica da toxina diftérica. Fragmento A, composto pelo domínio C (vermelho) e fragmento B, composto pelo domínio T (azul) e domínio R (verde) (Fonte: Wenzel *et al.*, 2020).

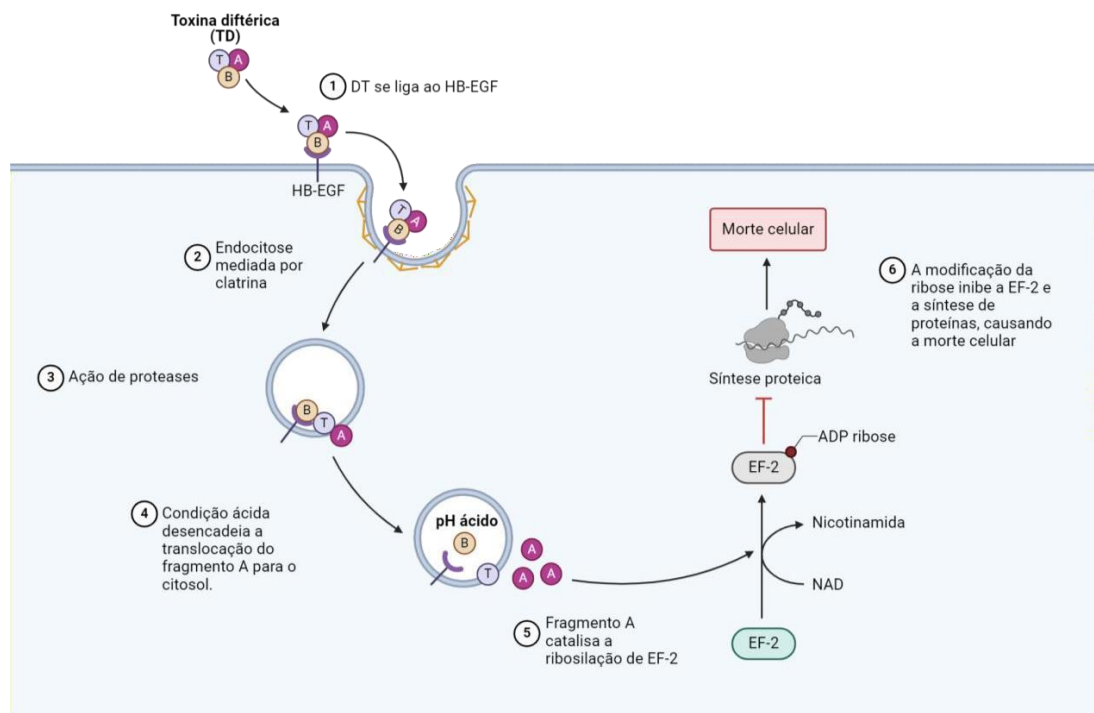


Figura 4 - Mecanismo de ação da toxina diftérica. A DT é endocitada após se ligar ao HB-EGF e a ação de proteases e condições ácidas levam a translocação do fragmento A para o citosol. O fragmento A catalisa a transferência da porção ADP-ribose do dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NAD) para o fator de alongação 2 (EF-2) do hospedeiro resultando na inibição da síntese proteica e morte celular (Fonte: Imagem criada com BioRender).

1.4 Outros fatores de virulência do *C. diphtheriae*

Além da toxina (DT), acredita-se que outros fatores de virulência também sejam de extrema relevância para a patogenicidade do bacilo diftérico, uma vez que cepas não produtoras de toxina são capazes de causar a difteria respiratória, cutânea e vêm sendo associada às infecções invasivas (Mattos-guaraldi *et al.*, 2003; Lovelock *et al.*, 2024).

Dentre esses fatores, destacam-se as moléculas de adesão fimbriais, ligadas covalentemente à parede celular bacteriana sendo essenciais para a colonização da bactéria no hospedeiro. O *C. diphtheriae* possui três agrupamentos de genes que codificam nove proteínas de pili, SpaA–SpaI (Kang *et al.*, 2014).

Além das fímbrias, MSCRAMMs (*do inglês, Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*), encontradas em diversas bactérias Gram-positivas, também são encontradas em *C. diphtheriae* (Ott, Möller e Burkovski, 2022). Entre estas moléculas, a adesina proteica DIP0733, capaz de interagir com colágeno, fibrinogênio, eritrócitos e células epiteliais, parece ter papel relevante para a colonização bacteriana. Além de seu papel na adesão e invasividade, a DIP0733 foi associada à citotoxicidade e apoptose de células epiteliais (Sabbadini *et al.*, 2012). Já a proteína DIP2093, está envolvida na ligação ao colágeno tipo I e na adesão às células epiteliais (Peixoto *et al.*, 2017). As CdiLAMs de *C. diphtheriae* também atuam como adesinas que se ligam às células epiteliais respiratórias humanas, contribuindo para a patogênese da doença (Moreira, Mattos-guaraldi e Andrade, 2008). Outras proteínas de superfície celular, como DIP1281 e DIP1621 também foram identificadas como fatores de adesão em *C. diphtheriae* (Ott *et al.*, 2010).

C. diphtheriae produz, ainda, diversas enzimas que estão envolvidas em seu processo de patogênese. Microrganismos aeróbios possuem a capacidade de manter seus níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ROS) baixas através de mecanismos de defesa que envolvem a expressão de enzimas desintoxicantes, que convertem ROS em produtos inofensivos e, conseqüentemente, protegem o microrganismo de danos oxidativos ao DNA, proteínas e lipídios (Storz *et al.*, 1990). Análises moleculares apontam a presença do gene *OxyR* em cepas de *C. diphtheriae*, que atua como um regulador da expressão da enzima catalase, produzida pelo bacilo, e é considerado um dos principais coordenadores bacterianos da resposta antioxidante

(Cappelli *et al.*, 2022).

De forma interessante, *C. diphtheriae* apresenta ácido siálico em sua superfície celular, mas nenhum gene relacionado à síntese de ácido siálico foi encontrado anteriormente em seu genoma (Kim *et al.*, 2010). Entretanto, o bacilo diftérico expressa uma sialidase (nanH) que pertence a uma classe de glicosil hidrolases que catalisam remoção de resíduos de ácido siálico terminal (ácido N-acetilneuramínico, Neu5Ac) de uma variedade de glicoconjugados das células do hospedeiro (Kim *et al.*, 2010). As sialidasas são consideradas importantes fatores de virulência, que podem levar a uma série de efeitos que favorecem a colonização, invasão e evasão do sistema imunológico pelo microrganismo (Vimr, 1994).

Além da produção de catalase e sialidase, *C. diphtheriae* também é uma bactéria produtora de hemeoxigenase, que catalisa a conversão dependente de oxigênio da heme em biliverdina, monóxido de carbono e ferro livre. O ferro é essencial para a sobrevivência da bactéria e um dos mecanismos para contornar as baixas concentrações de ferro livre extracelular é através de enzimas de degradação de heme, como as hemeoxigenases (Chu *et al.*, 1999). Além disso, o ferro desempenha papel crucial para *C. diphtheriae*, pois sua baixa concentração desencadeia a transcrição da DT, regulada pela proteína repressora *DtxR* dependente das concentrações de ferro intracelular (Schmitt e Holmes, 1991).

1.5 A vacina DTP

A vacina contra a difteria foi desenvolvida na década de 1920 utilizando a toxina diftérica modificada por tratamento com formaldeído para a imunização, sendo chamada de toxóide (Rappuoli e Malito, 2014). O uso do toxóide para imunização ativa, começou na década de 1930 nos Estados Unidos e posteriormente na Europa e levou à redução significativa no número de casos de difteria dos países industrializados (Rappuoli e Malito, 2014). A partir da década de 1980, quando foi amplamente administrada por todo o mundo, a difteria foi considerada o único exemplo de doença bacteriana quase eliminada como resultado direto da imunização ativa (Pappenheimer, 1977).

O protocolo original utilizado para a produção do toxóide pela primeira vez ainda é utilizado, com apenas pequenos novos refinamentos (Clarke *et al.*, 2019). A descoberta do toxóide tetânico fez com que houvesse uma investigação sobre a

possibilidade de uma vacinação simultânea contra difteria e tétano usando as respectivas anatoxinas (Chippaux, 2024). Desde a década de 1940, as crianças de países industrializados são imunizadas com uma vacina combinada contra difteria, tétano e coqueluche (DTP), que se tornou uma das vacinas mais utilizadas e faz parte do Programa Ampliado de Imunização (PAI) da OMS desde 1974 (OMS, 2018). A vacina com toxóide difterico também está disponível em combinação apenas com o toxóide tetânico (dT) em duas formulações, com maior quantidade do toxóide ou menor para imunização de adultos e crianças ou adolescentes, respectivamente. A partir da década de 1990, a vacina combinada DTPw (difteria, tétano e coqueluche de células inteiras) passou a ser substituída pela DTPa (difteria, tétano e coqueluche acelular) para imunização infantil em grande parte do mundo (OMS, 2018).

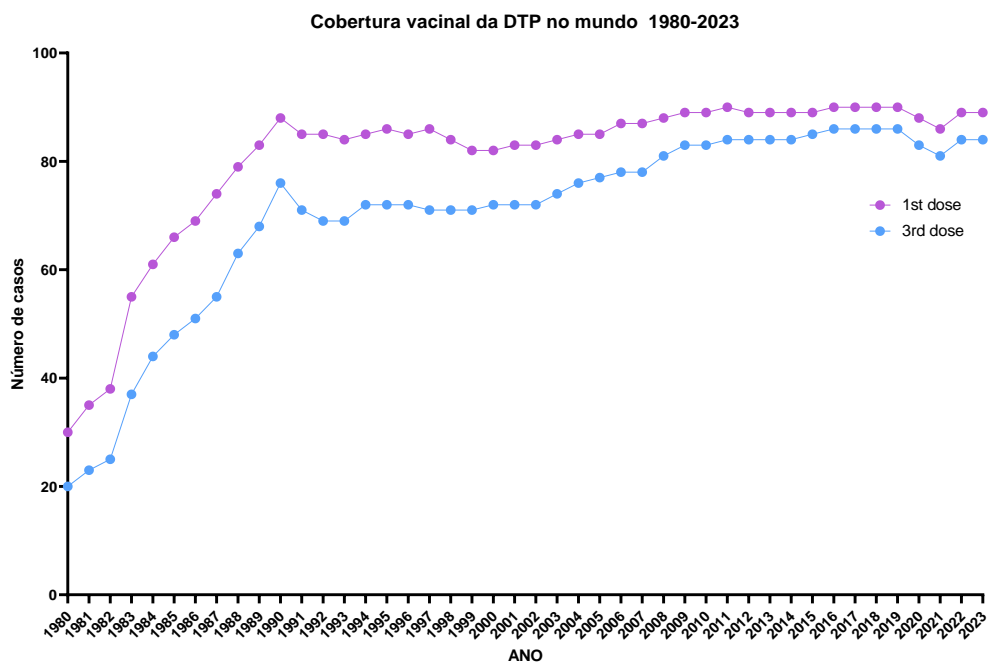
A duração média da proteção conferida pela vacina DTP é de cerca de 10 anos, e a imunidade protetora pode ser reforçada pela administração de doses de reforço após este período (OMS, 2018). A recomendação da OMS para a imunização contra a difteria é a aplicação eficaz na infância e manutenção da imunidade durante todo o período de vida (OMS, 2018).

Apesar de a imunização com toxóide ter sido muito bem-sucedida, diminuindo significativamente o número de casos após sua implementação (Clarke *et al.*, 2019) a difteria continua sendo uma ameaça em diversos lugares do mundo (Mattos-guaraldi *et al.*, 2003; Medugu *et al.*, 2023).

1.6 Epidemiologia

A difteria foi uma das principais causas de morte na infância na era pré-vacinação. A vacinação em larga escala contra a doença foi implementada em toda a Europa Ocidental, Rússia e América do Norte entre 1920 e 1950 (Zakikhany e Efstratiou, 2012). No Brasil, a vacinação contra difteria começou a ser administrada em larga escala a partir de 1977 (**Figura 5a**), quando o país a definiu como vacina obrigatória para menores de 1 ano de idade, conforme estabelecido pela Portaria Ministerial nº 452, de 6 de dezembro (Ministério da Saúde, 1998). Como consequência desses programas de vacinação, a incidência global de difteria caiu em aproximadamente 70% entre 1970 e 1980 e continuou a diminuir significativamente (**Figura 5b**) (Galazka, Robertson e Oblapenko, 1995).

A



B

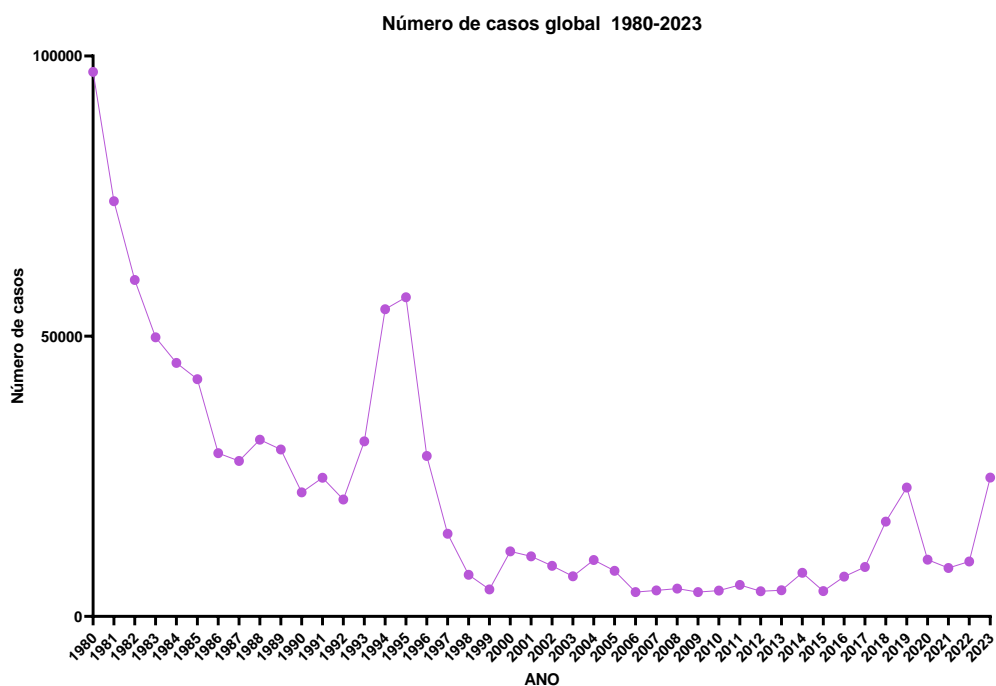


Figura 5 - Situação epidemiológica da difteria no mundo. (A) Cobertura vacinal da primeira e terceira dose da vacina DTP no mundo entre os anos de 1980 até 2022; (B) Número de casos reportados e incidência de difteria no mundo entre os anos de 1980 até 2022 (Fonte: WHO Immunization Data portal, 2024).

Apesar da diminuição significativa de casos após a implementação da vacinação, cepas toxinogênicas de *Corynebacterium* ainda são relatadas globalmente e a doença continua endêmica em alguns países (Clarke *et al.*, 2019). Além disso, grandes epidemias de difteria ocorreram em diversas regiões do mundo, como na Rússia durante a década de 1990. A propagação da doença para países vizinhos, como Finlândia, Suécia e Noruega (Skogen *et al.*, 2000), resultou em um número alarmante de casos, atribuído principalmente à ausência de programas de imunização, consequência da desintegração da antiga União Soviética (Skogen *et al.*, 2000). Contudo, o número de casos elevados e alta mortalidade persistiu durante 2001 e 2002, incluindo pacientes totalmente vacinados (Sharma *et al.*, 2019).

Entre 2011 e 2015, a Índia teve o maior número de casos notificados por ano, seguido pela Indonésia e Madagáscar e entre 2016 e 2019, surtos de difteria foram notificados em diversos países, como Bangladesh, Iémen, Haiti e Venezuela e muitos envolvem populações vulneráveis ou áreas em que estão ocorrendo conflitos sociais e políticos (**Figura 6**) (Dandinarsaiah *et al.*, 2013).

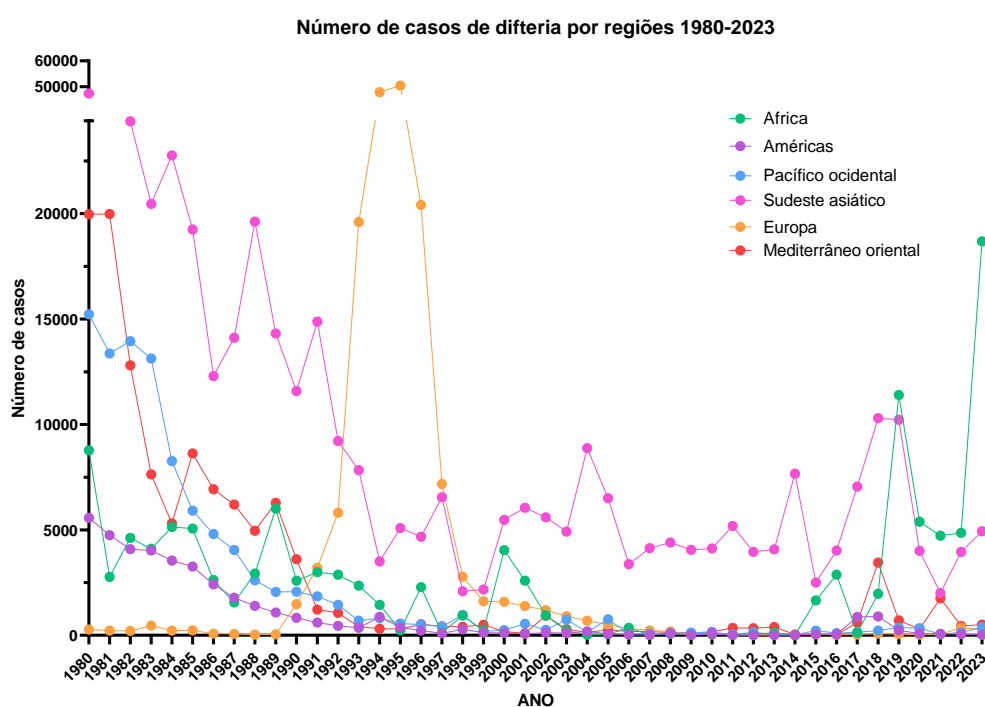


Figura 6 - Situação epidemiológica da difteria nas diferentes regiões do mundo. Evolução do número de casos de difteria reportados nas regiões da África, Américas, Pacífico Ocidental, Sudeste Asiático, Europa e Mediterrâneo Oriental no período de 1980 a 2023. (Fonte: WHO Immunization Data portal, 2024).

Há ainda uma subnotificação significativa de casos à OMS o que ressalta que o verdadeiro número de casos da doença é provavelmente subnotificado (OMS, 2018). Esse aumento de casos demonstra potencial para surtos graves de difteria em comunidades que têm uma grande população de adultos não imunizados e uma fraca cobertura vacinal para crianças (Clarke *et al.*, 2019).

No Brasil, ainda ocorrem casos de difteria em algumas regiões (**Figura 7**), como entre 2008 e 2009, quando foram confirmados 89 casos da doença no Brasil (Dias *et al.*, 2011). Em 2010, em três municípios do estado do Maranhão, onde a cobertura vacinal era de 56%, foram confirmados 27 casos de difteria, resultando em duas mortes (Dias *et al.*, 2011). Além disso, a difteria de natureza zoonótica causada por *Corynebacterium ulcerans* tem se tornado mais prevalente em diferentes países, incluindo o Brasil (Dias *et al.*, 2011).

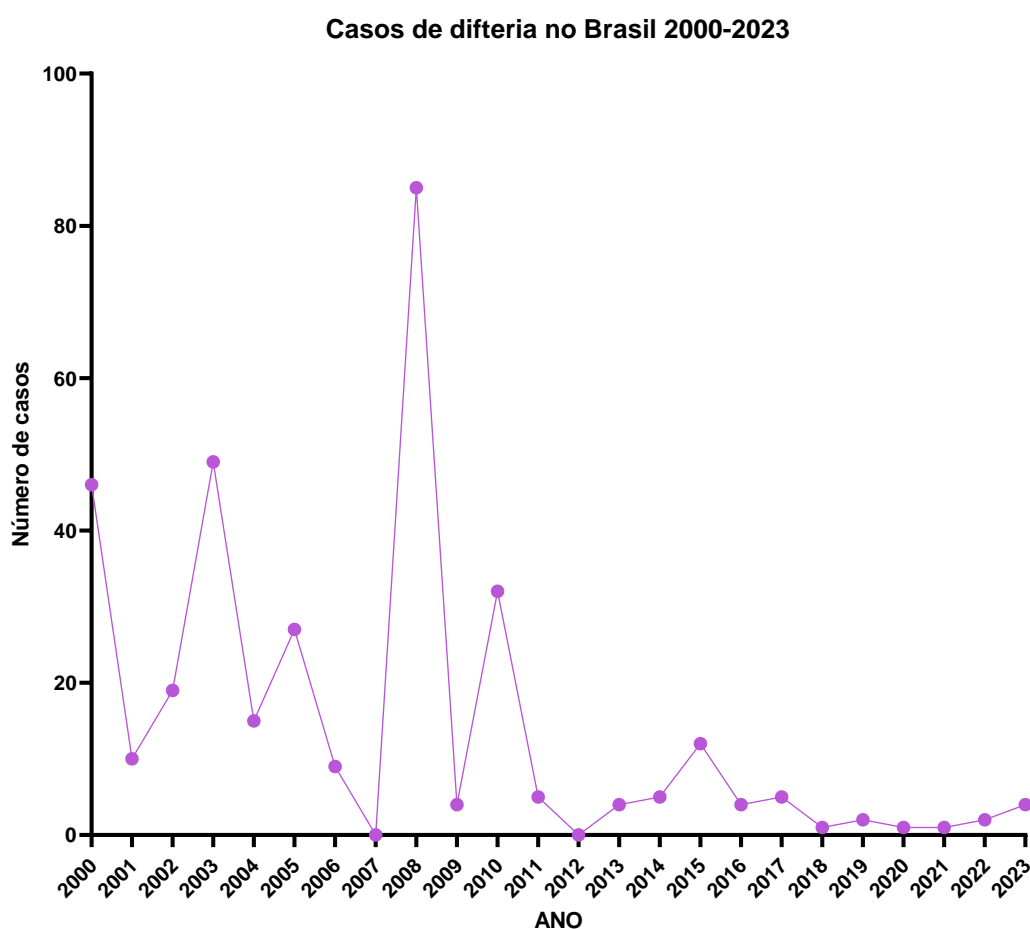


Figura 7 – Casos de difteria no Brasil entre 2000 e 2023. (Fonte: WHO Immunization Data portal, 2024).

Estudos recentes revelam uma impressionante diversidade de cepas de *C. diphtheriae*, e um aumento alarmante na resistência antimicrobiana do microrganismo, com um número substancialmente maior de genes de resistência a antibióticos na última década (Will *et al.*, 2021). Mutações no gene da toxina também foram demonstrados, com 18 variantes identificadas, algumas com impacto estrutural de moderado a alto, o que poderia implicar significativamente na eficácia da vacina atual contra difteria (Will *et al.*, 2021).

Nos últimos 20 anos, cepas de *Corynebacterium* não produtoras de DT (NTCD) também têm sido relatadas como agentes causadores de doenças invasivas, como endocardite, pneumonia, osteomielite e infecções relacionadas a cateteres, principalmente em pacientes adultos, com vários casos resultando em óbito (Tiley *et al.*, 1993; Gomes *et al.*, 2009; Peixoto *et al.*, 2016). Esses relatos sugerem que cepas não produtoras de DT são capazes de causar doenças por meio de outros mecanismos de virulência (Batista aráujo *et al.*, 2021).

1.7 Vesículas extracelulares

Vesículas extracelulares (VEs) são partículas de tamanho variando de nano a micro escala, delimitadas por bicamada proteolipídica que não possuem um núcleo funcional, ou seja, não podem se replicar por si mesmas sendo liberadas por diferentes tipos de células procarióticas e eucarióticas (Welsh *et al.*, 2024). Estas nanopartículas são capazes de empacotar diferentes moléculas provenientes da célula parental, como ácidos nucleicos, proteínas, lipídios, vírus, enzimas e toxinas e podem possuir diâmetro entre 20-400 nm (Kim *et al.*, 2015). Em bactérias, desempenham diferentes papéis, como na comunicação intercelular, envolvimento em processos fisiológicos, interações com o sistema imunitário, regulação do microambiente e na patogênese de doenças (Buzas, 2023).

As VEs podem ser classificadas de acordo com sua biogênese, como os ectossomos (partículas provenientes de compartimentos internos da célula) e os exossomos (partículas provenientes da superfície celular) (Welsh *et al.*, 2024), entretanto, o uso de termos baseados na biogênese das VEs vêm sendo desencorajado pela dificuldade de caracterização definitiva desses subtipos sem que haja marcadores moleculares universais para cada um deles. As VEs também podem ser classificadas

de acordo com o tamanho de cada partícula, VEs menores que 200 nm são chamadas de pequenas VEs (do inglês *small EVs*), enquanto as maiores são chamadas de grandes VEs (do inglês *large EVs*) (Welsh *et al.*, 2024).

Em bactérias Gram-negativas, as VEs são originadas da membrana externa e carregam componentes tanto periplasmáticos quanto citoplasmáticos. Embora a produção de VEs por bactérias Gram-positivas fosse considerada improvável devido à estrutura de sua parede celular, sua existência foi demonstrada em diversos estudos (Lee *et al.*, 2009; Rivera *et al.*, 2010; Prados-rosales *et al.*, 2014a; Briaud e Carroll, 2020). Estudos recentes indicam que a liberação de VEs por bactérias Gram-positivas começa com o brotamento da membrana citoplasmática, promovida por domínios enriquecidos em lipídios específicos (Briaud e Carroll, 2020). Investigações lipodômicas revelaram que a membrana citoplasmática e as VEs são compostas por lipídios semelhantes (Briaud e Carroll, 2020). No entanto, diferenças na predominância dos tipos de lipídios das VEs e da membrana citoplasmática foram observadas (Briaud e Carroll, 2020). Por exemplo, as VEs de *S. pyogenes* apresentam enriquecimento em fosfatidilglicerol e cardiolipina depletada quando comparadas com a membrana citoplasmática da bactéria (Resch *et al.*, 2016). Estas variações na composição entre as membranas celulares e as VEs sugerem que a formação das vesículas pode ocorrer em regiões específicas da membrana citoplasmática, enriquecidas com determinados tipos de lipídios. Esta hipótese é respaldada por pesquisas em bactérias Gram-negativas, que demonstraram que uma distribuição assimétrica de fosfolipídios na membrana externa é a principal força que desencadeou a vesiculação (Roier *et al.*, 2016).

O mecanismo pelo qual as VEs atravessam a parede celular ainda não é completamente compreendido. No entanto, análises proteômicas por espectrometria de massa revelam a presença de proteínas ligantes à penicilina (PBPs) e autolisinas em VEs, sugerindo que a modificação da parede celular desempenha um papel fundamental na liberação dessas vesículas (Wang *et al.*, 2018). Estudos com cepas mutantes deficientes na produção de autolisinas e PBPs demonstram uma redução no tamanho e na liberação de VEs, reforçando a importância dessas proteínas nesse processo (Wang *et al.*, 2018).

As VEs desempenham um papel essencial em diversos mecanismos da fisiologia bacteriana. Estão envolvidas em processos como a transferência de DNA cromossômico bacteriano, revelada em *Ruminococcus spp* (Klieve *et al.*, 2005) e,

também, na transferência de genes mediando a infecção por bacteriófagos, como observado em *Bacillus subtilis* (Tzipilevich, Habusha e Ben-yehuda, 2017).

As VEs também podem contribuir para a sobrevivência e competição microbiana, como demonstrado em VEs derivadas de *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptomyces coelicolor* e *Staphylococcus aureus* capazes de carrear fatores de ligação ao ferro que contribuem para a sobrevivência bacteriana sob condições limitadas de ferro (Lee *et al.*, 2009; Schrempp *et al.*, 2011; Jeon *et al.*, 2016).

Foi demonstrada também a presença de outros fatores de virulência nas VEs, como a colagenase, que rompe a matriz extracelular (MEC) e de serina proteases, que auxiliam na ruptura de barreiras físicas (Surve *et al.*, 2016), presença de toxinas (Rivera *et al.*, 2010; Thay, Wai e Oscarsson, 2013), reforçando o papel destas estruturas na fisiopatologia de diferentes microrganismos (Liu *et al.*, 2018).

Além de atuarem na fisiologia bacteriana, são capazes de interagir com células do hospedeiro. Evidências demonstram que podem ser internalizadas por células eucarióticas por meio de endocitose (Kim *et al.*, 2012) ou se fundir diretamente com a membrana eucariótica (Thay, Wai e Oscarsson, 2013). Além da internalização, podem interagir com receptores do hospedeiro, como as VEs de *Mycobacterium*, que possuem as proteínas LprG e LprA capazes de se interagir diretamente com o receptor Toll-like 2 (TLR-2), influenciando na apresentação de antígenos pelo complexo principal de histocompatibilidade do tipo II (MHC-II) (Prados-rosales *et al.*, 2014c).

O potencial das VEs atribuível à sua capacidade de modular células hospedeiras juntamente com a possibilidade de modificar sua superfície por bioengenharia as torna fortes candidatas na aplicação de terapias (**Figura 8**) (Micoli e Maclennan, 2020). Estudos recentes apontam as VEs como potenciais agentes vacinais contra patógenos bacterianos, já que herdam padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs) de suas bactérias parentais e, conseqüentemente, podem induzir uma resposta imunitária contra patógenos (Micoli e Maclennan, 2020). Além de seus MAMPs, permitem interações com células apresentadoras de antígenos (APCs) e podem ser fagocitadas pelas APCs (Micoli e Maclennan, 2020).

Vacinas baseadas em VEs foram licenciadas pela primeira vez para uso em Cuba contra o sorogrupo B de *Neisseria meningitidis* (MenB) em 1987 (Sierra *et al.*, 1991) e, posteriormente foram empregadas com sucesso como vacinas para prevenir surtos de meningococo do grupo B, na Noruega (Rosenqvist *et al.*, 1995) e na Nova Zelândia (MenZB) (Wedegge *et al.*, 2007). Desde então, vacinas candidatas baseadas

em VEs estão em desenvolvimento em nível pré-clínico contra diferentes patógenos tais como *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *Salmonella Typhimurium* e *Mycobacterium tuberculosis*, e têm provado elicitar respostas imunes humorais e celulares (Micoli e Maclennan, 2020).

Além de potenciais agentes vacinais, as VEs também vêm sendo estudadas como estratégia para o tratamento do câncer (Starnes, 1992; Nagakubo, Nomura e Toyofuku, 2019; Li *et al.*, 2020; Xie *et al.*, 2022), como sistemas de entrega de drogas (Witwer e Wolfram, 2021), agentes antibacterianos (Schulz *et al.*, 2018) e como biomarcadores para diagnosticar e monitorar diferentes doenças (Han *et al.*, 2021), mostrando o grande potencial e aplicabilidade destas estruturas como nanopartículas.

Ainda não se sabe se *C. diphtheriae* é capaz de produzir VEs e o papel dessas estruturas na patogênese da doença.

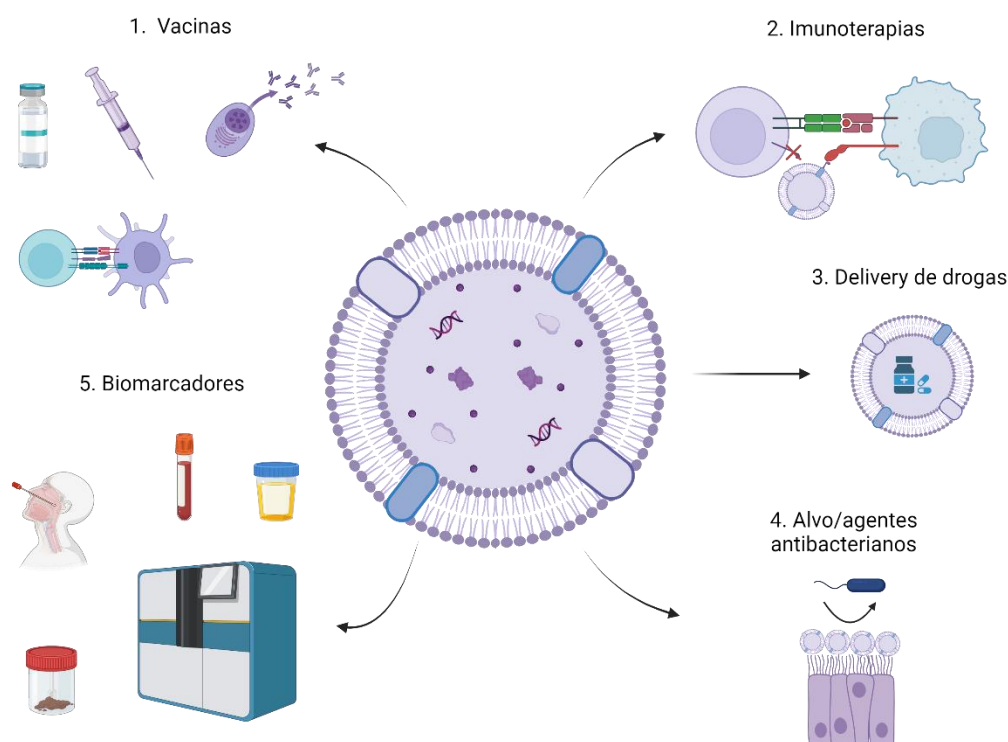


Figura 8 – Potencial de aplicabilidade das vesículas extracelulares. As VEs são fortes candidatas como (1) potenciais agentes vacinais, (2) estratégia para o tratamento do câncer, (3) sistemas de entrega de drogas, (4) agentes antibacterianos e (5) biomarcadores; (Fonte: Xie *et al.*, 2022).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a produção de VEs de *C. diphtheriae*, focando em sua composição proteica e seu efeito em diferentes tipos celulares.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar o método de isolamento das VEs de *C. diphtheriae*;
- Avaliar os aspectos estruturais das VEs isoladas;
- Investigar a presença de DT nas VEs através de SDS-PAGE e *Western blotting*;
- Investigar o efeito das VEs na atividade metabólica de diferentes tipos celulares, incluindo macrófagos murinos, células de epitélio renal e pneumócitos humanos;
- Investigar a capacidade das VEs de ativar macrófagos murinos analisando a produção de óxido nítrico e citocinas.

3. METODOLOGIA

3.1 Isolamento de vesículas extracelulares

3.1.1 Condições de cultivo

As VEs de *C. diphtheriae* foram obtidas seguindo os procedimentos estabelecidos em Informações Mínimas para o Estudo de Vesículas Extracelulares (*Minimal information for studies of extracellular vesicles*, MISEV2023) com algumas modificações (Witwer *et al* 2013; Welsh *et al.* 2024). Para o isolamento das VEs, foi utilizada a amostra atoxinogênica de *C. diphtheriae* ATCC 27010 ou a amostra toxinogênica de *C. diphtheriae* ATCC 27012.

Para o preparo do pré-inóculo, alíquotas de 20 µL das bactérias estocadas a -20°C foram inoculadas em 3 tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo tripton de soja (*Trypticase Soy Broth*, TSB, ISOFAR) e incubados a 37°C por 24h. Este volume foi

inoculado em um Erlenmeyer contendo 150mL de TSB e incubado por 24 h à 37°C sob agitação de 125 RPM (Incu-Shaker, Benchmark). Após a incubação, os 150 mL de crescimento bacteriano foram adicionados em um novo Erlenmeyer contendo 1350mL de TSB, seguido de uma nova incubação por mais 24 h à 37°C, sob agitação de 125 RPM (Incu-Shaker, Benchmark).

3.1.2 Isolamento das VEs

O volume total do caldo contendo o crescimento bacteriano foi adicionado em tubos de centrífuga de 500 mL (Nalgene) e uma centrifugação de alta velocidade a 12.000 g/10 min/4 °C (Hitachi CR21GII, Himac; Rotor R10A3, Himac) foi realizada. Após a centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em um sistema de filtração a vácuo (JetBiofil, Membrana PES, 0,22µm) com auxílio de uma bomba de vácuo (121 - Primatec).

Foi adicionado ao sobrenadante filtrado azida 1M (1:1000 - v/v) para evitar contaminação e o material foi submetido a uma filtração de fluxo tangencial em um sistema VivaFlow (Vivaflow® 200 TFF, 100kDa). O VivaFlow (**Figura 9**) é um sistema que realiza a concentração e ultrafiltração da amostra através de um fluxo tangencial, conhecido como TFF (*Tangential Flow Filtration*), por meio de uma tubulação e uma bomba peristáltica. O cassete possui uma membrana de 200 cm² de polietersulfona não-estéril, possuindo tamanho de poro de 100 kDa. Inicialmente, o sistema do VivaFlow foi montado acoplando as tubulações/mangueiras e a bomba peristáltica Masterflex L/S ao cassete. O sobrenadante foi recirculado e concentrado durante aproximadamente 3 horas no sistema até que o volume do concentrado se reduzisse até 40 mL.

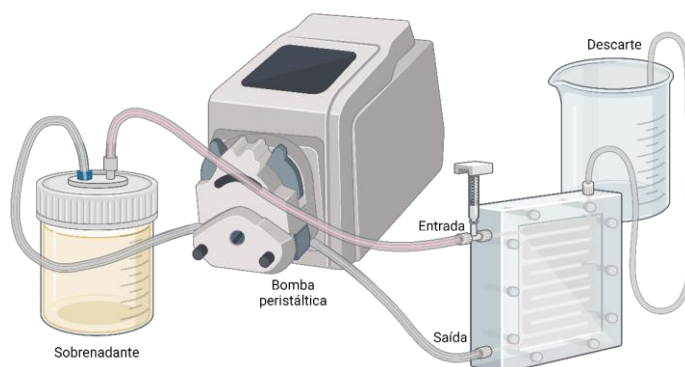


Figura 9 – Sistema VivaFlow. Cassete acoplado às mangueiras e a uma bomba peristáltica Masterflex L/S (Fonte: Imagem criada com BioRender).

Os 40 mL finais concentrados resultantes do processo foram adicionados em dois tubos de policarbonato de 26,3 mL (Beckman, 355618) e foram, então, ultracentrifugados em uma ultracentrífuga (Beckman, Optima™ LE-80K, Rotor tipo 70 Ti de ângulo fixo - 355618) a 100.000g por 1h a 4°C. Após esse processo, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspensionado em PBS estéril para ser centrifugado a 15.000g por 10 min. a 4°C para eliminar os debris restantes. O pellet formado foi descartado, o sobrenadante foi avolumado para 20 mL e ultracentrifugado novamente pelo mesmo processo descrito anteriormente. Ao final da segunda ultracentrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet contendo VEs foi ressuspensionado no menor volume de PBS estéril possível (~200µL) para a obtenção de um material mais concentrado. A concentração de proteínas totais foi dosada (Thermo, Pierce™ BCA-23227) e as VEs foram estocadas em um freezer -80°C na presença de penicilina-streptomicina (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de streptomicina) (**Figura 10**).

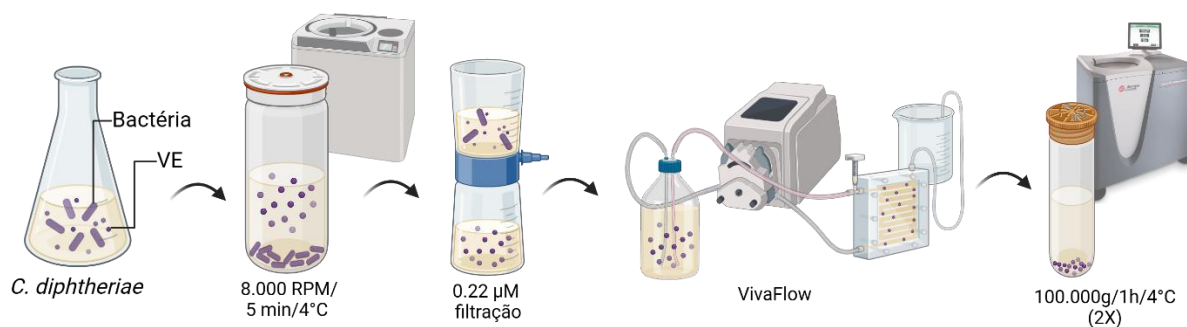


Figura 10 – Esquema do protocolo adaptado para isolamento e purificação de Vesículas Extracelulares (Fonte: Imagem criada com BioRender).

3.2 Análise estrutural de vesículas extracelulares

3.2.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A morfologia e o tamanho das VEs foram determinados por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) utilizando a técnica de coloração negativa (Vargas

et al., 2020). Este ensaio foi realizado em colaboração com o Dr. Jhon Jhamilton Artunduaga Bonilla sob supervisão do Dr. Leonardo Nimrichter do Laboratório de Glicobiologia de Eucariotos (IMPG, UFRJ). Em resumo, 5 μ L de VEs foram adsorvidas por 30 seg. em um filme de Formvar (Ted Pella, Inc.) em uma grade de cobre de malha 300 revestida com carbono. O excesso foi removido utilizando papel de filtro. Em seguida, as amostras foram coradas com acetato de uranila a 2,5% (Ted Pella, Inc.) por 30 segundos. As VEs foram visualizadas utilizando um microscópio eletrônico de transmissão (FEI Tecnai Spirit) operado a 120 kV. O *software* ImageJ (versão 1.53K) foi utilizado para medir o diâmetro das VEs.

3.2.2 Análise de rastreamento de nanopartículas por Zetaview

Os tamanhos das VEs foi estimado utilizando o analisador de rastreamento de nanopartículas ZetaView (NTA; Particle Metrix GmbH, Inning am Ammersee, Alemanha) (Valdez *et al.*, 2023). Este ensaio foi realizado em colaboração com o Dr. Alessandro F. Valdez sob supervisão do Dr. Leonardo Nimrichter do Laboratório de Glicobiologia de Eucariotos (IMPG, UFRJ). Para as medições, as amostras foram diluídas em PBS estéril (1:1000 - v/v) para obtenção de uma concentração ideal de partículas para a análise pelo *software* NTA (ZetaView *Software* versão 8.02.31, Particle Metrix GmbH). Os parâmetros que foram utilizados na análise foram a temperatura a 23°C, a sensibilidade de 30–85 *frames* por segundo (fps), uma velocidade do obturador de 55 ms e uma duração do pulso do laser igual à duração do obturador. Os parâmetros de aquisição foram definidos com um brilho mínimo de 20 unidade de brilho arbitrária (UBA) um tamanho máximo de 200 pixels e um tamanho mínimo de 5 pixels. Partículas de poliestireno (Microtrac GmbH, Haan, Alemanha) com um tamanho médio de 100 nm foram utilizadas paracalibrar o instrumento antes das leituras das amostras. Os dados foram analisados utilizando o *software* ZetaView (versão 8.02.31) e o GraphPad Prism 7 (GraphPad, CA, EUA). Para os gráficos de distribuição de tamanho, o número de partículas detectadas em cada ponto foi normalizado para o número total de partículas em cada amostra, e os resultados foram expressos como o número relativo de partículas/mL. Essa normalização foi realizada para facilitar a visualização da distribuição de tamanho entre os grupos.

3.3 Análise de conteúdo proteico das VEs

3.3.1 SDS-PAGE

O conteúdo de proteínas totais das VEs, foi inicialmente analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Para o preparo das VEs, uma alíquota correspondente a 30 µg/mL foi separada, adicionada ao tampão da amostra 2X e fervida a 96°C por 10 min. As VEs foram aplicadas ao gel de poliacrilamida 12%, para separação eletroforética à 200V (PowerPac Basic power supply - Biorad) por aproximadamente 1h30min. Em seguida, o gel foi corado com Coomassie Blue R-250 (45% metanol; 10% Ácido acético; 45% água deionizada; 3g/L Coomassie blue R-250, Sigma) *overnight*, 4°C e descorado em solução descorante (10% ácido acético; 50% água deionizada; 40% metanol) para observação e registro fotográfico.

3.3.2 Detecção da toxina diftérica por *Western blotting* (WB)

A pesquisa da presença de DT nas VEs purificadas foi realizada por WB. Alíquotas de 30µg de VEs e 15 µg de toxina diftérica purificada (Sigma), ambas na presença ou ausência do redutor de ligações dissulfeto, β-mercaptoetanol (21985-023, Gibco), foram separadas por SDS-PAGE. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (0,2 µm, Bio-Rad), em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glycine, pH 8.3, 20% methanol (vol/vol)) por 1h30 a 250mA. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com uma solução de 3% de leite desnatado em tampão TBS-T (Tris-buffered saline com Tween 20) por 1 h à temperatura ambiente (TA) para prevenir ligações inespecíficas. Em seguida, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário anti-toxina diftérica [11D9] (Abcam, ab53827) diluído na proporção de 1:2000 em PBS (3% BSA; 0,1% tween 20). Após a incubação *overnight* a 4°C as membranas foram lavadas três vezes com TBS-T. As membranas foram então incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG *mouse* HRP (Jackson ImmunoResearch, 115-035071) diluído a 1:10.000 em TBS-T com 3% de leite desnatado, por 1h. em temperatura ambiente. Após esta incubação, a membrana foi novamente lavada três vezes com TBS-T, e a detecção das bandas foi realizada utilizando um substrato de quimioluminescência ECL (Thermo Scientific™,

32109) em um equipamento ImageQuant™ LAS 500.

3.3.3 Proteômica

Para identificação do conteúdo proteico das VEs purificadas foi realizada análise cromatográfica em colaboração com a equipe Centro de Espectrometria de Massas de Biomoléculas (CEMBIO) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF-UFRJ). Nesta análise, foram utilizadas VEs da cepa atoxigênica (ATCC 27010) devido à ausência da toxina diftérica, o que as torna uma opção mais segura para manipulação em laboratório e mais adequadas para o desenvolvimento de imunobiológicos, uma vez que VEs que carregam a toxina podem não ser desejáveis para esta finalidade. Para isso, 100 µg/mL de VEs foram misturadas a 200 µL de uma solução (100 mM Tris HCl pH 8,6; 1% desoxicolato de sódio (DOC)), seguido de incubação 60°C/10min. Em seguida 800 µL de metanol, 200 µL de clorofórmio e 550 µL de água foram adicionados e a amostra foi centrifugada (14.000g/5min/TA). O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 600 µL de metanol e a centrifugação foi repetida. O pellet restante foi ressuscitado em 100 µL da solução inicial (100 mM Tris HCl pH 8,6; 1% DOC). As proteínas foram dosadas, reduzidas com 10 mM de Ditioneitol (DTT) e incubadas 60°C/1h. As proteínas foram alquiladas com 20 mM de ácido indol-3-acético (IAA) e incubadas TA/30min no escuro. Tripsina (1:30) foi adicionada e a amostra foi incubada TA/18h no escuro. Após a incubação, 1% de ácido trifluoroacético (TFA) 10% foram adicionados e a amostra foi centrifugada (14.000 g/ 1 min/ TA). O sobrenadante foi separado em um novo tubo e a dosagem de peptídeos foi realizada. Uma alíquota de 10 µg foi submetida ao zip tip e a amostra passou por secagem no rotaevaporador. A amostra foi ressuscitada em ácido fórmico 0,1% para 0,5 µg/ µL e aplicada em um sistema de cromatografia líquida NanoElute 2 (Bruker) em fase reversa com coluna C18 (15 cm x 75 µm 1,9 µm – Bruker) a 45°C. A corrida cromatográfica foi realizada no modo eluição por gradiente com fluxo de 0.2 µL/min, iniciando com fase móvel A (água com ácido fórmico 0,1%) a 98% e finalizando com fase móvel B (acetonitrila com ácido fórmico 0,1%) a 95%.

O detector utilizado para a análise foi o espectrômetro de massas Maxis Impact (ESI-Q-TOF – Bruker), programado no modo de aquisição dependente de dados (DDA/AutoMS), com isolamento/fragmentação de 20 precursores por ciclo. A fonte

de ionização foi um nanoEletrospray com pressão de nebulização de 0,4 bar e com polaridade positiva. A faixa de varredura foi de 70-2200 m/z. Os resultados foram analisados usando o *software* MaxQuant e comparados com o banco de dados proteômico de *Corynebacterium diphtheriae* do Uniprot (KAEWSEEKHAO *et al.*, 2023).

3.4 Ensaios de atividade biológica das VEs

3.4.1 Ensaio de atividade metabólica

O efeito biológico das VEs purificadas na atividade metabólica foi testada nas seguintes células: macrófagos murinos RAW ATCC 264.7 e AMJ2C11 ATCC CRL-2456, epitélio renal de macaco VERO ATCC CRL1586 e pneumócitos humanos ATCC A549 CCL-185. Os tubos armazenados em nitrogênio líquido contendo cada linhagem celular foram descongelados, centrifugados (360 g/5 min/4°C – centrífuga 5804R, rotor S-4-72, Eppendorf) e os pellets ressuspensos em meio DMEM suplementado (Dulbecco's Modified Eagle Medium; 10% soro fetal bovino; 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de streptomina), seguido de uma incubação a 37°C e 5% CO₂. O meio DMEM suplementado foi trocado a cada 48h até que as células atingissem confluência de 80%. Os macrófagos RAW foram removidos das garrafas com o auxílio de um *cell scraper*. As células VERO e A549 foram removidas com tripsina 0,05% (Gibco). Em seguida, todas foram centrifugadas (360 g/5 min/4°C – centrífuga 5804R, rotor S-4-72, Eppendorf), ressuspensas em DMEM suplementado e uma alíquota de 10 µL da suspensão foi misturada ao azul de tripan para determinação do número de células viáveis.

Para o ensaio, 5x10⁴ células foram adicionadas em cada poço de uma placa de poliestireno de 96 poços (Corning® 96-well Clear Flat Bottom Polystyrene, 3599) com volume final de 200 µL de DMEM suplementado. Após 24h, as células foram estimuladas com DMEM suplementado contendo diferentes concentrações (2,5, 5, 10, 17,5, 20 ou 30 µg/mL) de VEs provenientes da cepa atoxinogênica ATCC 27010 ou da cepa toxigenica ATCC 27012, ou tratadas com Triton 1% para induzir morte celular ou não foram estimuladas (NE). Uma DT comercial (Sigma) também foi utilizada nas concentrações de 5 e 10 µg/mL como um controle para atividade da DT.

Após do 24, 48, 72 ou 96h. do estímulo realizado, o sobrenadante foi

desprezado e foram adicionados à placa 200µL de DMEM suplementado e 10µL do reagente Tetrazólio de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT, 5mg/mL em PBS 1x) (fabricante) e a placa foi incubada a 37°C por 4 h. Após o período de incubação, foram adicionados aos poços 50µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (D2438, Sigma), seguido de nova incubação de 30 min. a 37°C. Após a incubação, a leitura foi realizada em leitor de placas (Thermo Scientific Multiskan GO Microplate Spectrophotometer) a 570 nm. A atividade metabólica celular foi detectada através da formação de um pigmento roxo correspondente à capacidade que enzimas mitocondriais das células possuem, quando metabolicamente ativas, de reduzir o MTT (corante amarelo) em um produto insolúvel de formazana de cor púrpura.

3.4.2 Ensaio de dosagem de óxido nítrico

Para o ensaio de dosagem de óxido nítrico, os macrófagos RAW ATCC 267.4 ou AMJ2C11 ATCC CRL-2456 foram adicionadas em placa de 24 poços (Corning, 351147) com volume final de 500 µL de DMEM suplementado (5×10^5 céls/poço). Após 24h, as células foram estimuladas com VEs (5, 10 ou 20µg/mL), por 24h, 48h e 72h. O LPS (Sigma) foi utilizado na concentração de 1 µg/mL como controle positivo. Em seguida, 50 µL do sobrenadante das células estimuladas anteriormente e a curva padrão foram adicionadas em uma nova placa e 50 µL do reagente de Griess (2,34% ácido fosfórico; 0,1% di cloridrato de N-1 naftalenodiamina; 1% sulfanilamida) foi adicionado em todos os poços. A leitura foi realizada em leitor de placas (Thermo Scientific Multiskan GO Microplate Spectrophotometer) a 540 nm.

3.4.3 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Para a detecção da produção de citocinas TNF- α , IL-10 e IL-12 foi realizado o ensaio imunoenzimático (ELISA), seguindo as instruções do fabricante para cada kit (Cat. n° 88-7324-88; Cat. n° 88-7064-88, Cat. n° 88-7105-88, Cat. n° 88-7121-88; Thermo Fisher Scientific). Em um microplaca de 96 poços foram adicionados 25 µL do anticorpo de captura para cada uma das citocinas e a placa foi incubada por 18h. a 4°C. Após a incubação, a placa foi lavada com PBS tween (0,05%), seguido de um bloqueio com 175 µL de Elisa *diluent* (solução diluída de 1:5 de acordo com o

fabricante) por poço e a placa foi incubada por 1 h. em temperatura ambiente. Após a incubação, a placa foi lavada novamente. A curva padrão correspondente a cada citocina e as amostras foram adicionadas à placa, que foi incubada por 18 h. em TA. O LPS (Sigma) foi utilizado na concentração de 1 µg/mL como controle positivo. Após a incubação, a placa foi lavada novamente e 25 µL do anticorpo de detecção para cada citocina foi adicionado aos poços e a placa foi incubada por 1 h. em TA. Após ser lavada novamente, foram adicionados aos poços 25 µL de enzima (avidina/estreptavidina) por 30 min. Por fim, a placa foi lavada e 50 µL do substrato 5,5'-tetrametil-benzidina (TMB) foi adicionado em todos os poços. As placas foram lidas no leitor de placas (Thermo Scientific Multiskan GO Microplate Spectrophotometer) a 650 nm.

3.4.4 Análises estatísticas

Os valores de n e o que eles representam podem ser encontrados em cada legenda das figuras. As análises estatísticas foram realizadas com o software Prism 8.0, utilizando ANOVA seguida do teste de Newman–Keuls–Student. Valores de $P < 0,05$ (teste bicaudal) foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Análise estrutural de VEs de *C. diphtheriae*

A primeira análise visual realizada após a purificação das VEs permitiu a observação de fluorescência no material após exposição a luz UV (**Figura 11a**). A análise, através de microscopia eletrônica de transmissão (TEM), das VEs revelou vesículas esféricas intactas de formato típico (**Figura 11b**). As amostras também foram analisadas por DLS (*dynamic light scattering*) para obtenção da distribuição de tamanho das vesículas em seu estado nativo. Os diâmetros encontrados variaram de 15 a 315 nm, o diâmetro médio das vesículas foi de 92.8 nm e as VEs de 100nm foram as mais abundantes por mL (**Figura 11c**).

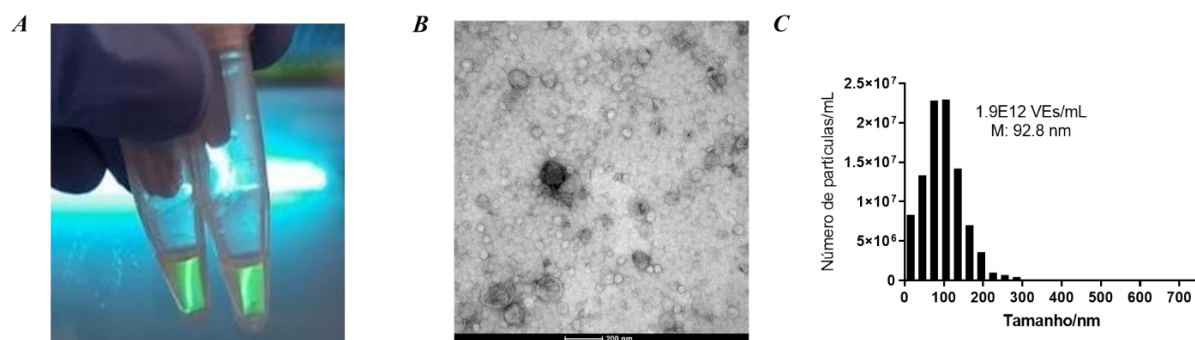


Figura 11 – Análise estrutural de VEs de *C. diphtheriae*. (A) Pellet de vesículas após ultracentrifugação ressuspensão em PBS estéril mostra fluorescência; (B) TEM dos pellets de vesículas mostra VEs esféricas intactas; (C) DLS mostra uma variação de 15 a 315 nm e tamanho médio de 92.8nm.

4.2 Análise de conteúdo proteico das VEs

4.2.1 SDS-PAGE

O conteúdo de proteínas totais das VEs foi analisado por meio de SDS-PAGE seguido de coloração com o corante azul de Coomassie (R-250). A análise revelou a presença de diversas bandas proteicas, que se apresentaram de forma consistente em outras análises semelhantes, sugerindo a conservação do perfil proteico nas VEs purificadas (**Figura 12**).

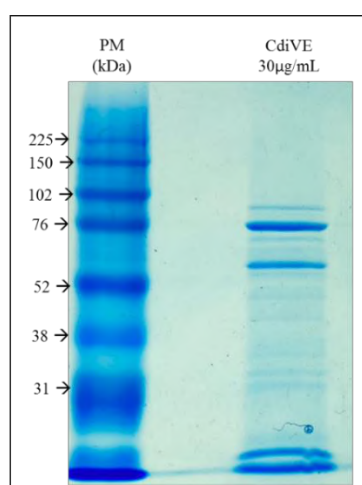


Figura 12 – Análise de VEs purificadas de *C. diphtheriae* ATCC 27010 por SDS-PAGE. Imagem representativa do perfil proteico de VEs de *C. diphtheriae* ATCC

27010, que parece consistente em todas as repetições do ensaio; PM, padrão de peso molecular; gel 12%.

4.2.2 Detecção da toxina diftérica por *Western blotting*

A análise da presença da DT nas VEs foi realizada por meio de *Western blotting*, utilizando o anticorpo monoclonal de camundongo anti-toxina diftérica [11D9] (Abcam, ab53827). Uma DT purificada comercial (Sigma) foi utilizada como controle positivo do ensaio. Os resultados demonstraram a presença da DT íntegra (63 kDa) nas VEs da cepa toxinogênica ATCC 27012, enquanto nenhuma detecção foi observada na cepa não toxinogênica ATCC 27010. O fragmento A (24 kDa) foi identificado exclusivamente em condições desnaturantes, ou seja, quando as amostras foram tratadas com β -mercaptoetanol (**Figura 13**). Estes resultados parecem demonstrar que a DT está presente nas VEs provenientes de cepas toxinogênicas e ausentes nas VEs de cepas atoxinogênicas.

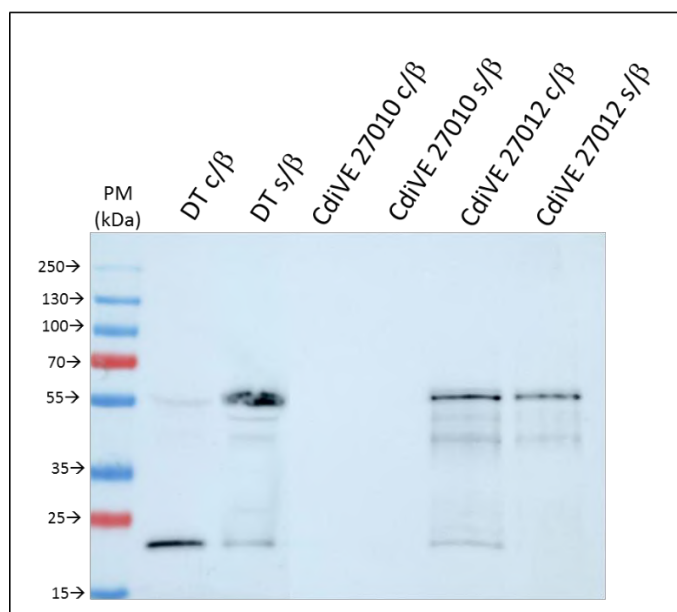


Figura 13 – Detecção da toxina diftérica (DT) nas VEs isoladas de *C. diphtheriae* produtor ou não de toxina. PM, padrão de peso molecular; DT c/ β , DT purificada (15 μ g) na presença de β -mercaptoetanol; DT s/ β , DT purificada (15 μ g) na ausência de β -mercaptoetanol; CdiVE 27010 c/ β , vesículas extracelulares purificadas da cepa atoxinogênica 27010 na presença de β -mercaptoetanol (30 μ g); CdiVE 27010 s/ β , vesículas extracelulares purificadas da cepa atoxinogênica 27010 na ausência de β -

mercaptoetanol (30 μ g); CdiVE 27012 c/ β , vesículas extracelulares purificadas da cepa toxinogênica 27012 na presença de β -mercaptoetanol (30 μ g); CdiVE 27012 s/ β , vesículas extracelulares purificadas da cepa toxinogênica 27012 na ausência de β -mercaptoetanol (30 μ g); gel 15%.

4.2.3 Proteômica das VEs de *C. diphtheriae*

Uma análise preliminar de proteômica das CdiVEs provenientes da cepa atoxinogênica (ATCC 27010) identificou a presença de 123 proteínas, conforme detalhado na Tabela 1, que inclui a lista completa das proteínas encontradas, juntamente com suas respectivas identificações, intensidades e pesos moleculares (PM). Do total de proteínas foi possível identificar diferentes fatores de virulência. Entre eles, destacam-se algumas, como a catalase, a septicolisina e a proteína bigA. Além disso, foram identificadas subunidades fimbriais ancoradas na superfície (spaD e spaF), proteínas relacionadas à aquisição de nutrientes, como a ferritina e proteínas de transporte de ferro e zinco, incluindo proteínas de ligação ao transportador ABC e sideróforo de ferro. Também foram detectadas enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase [Zn] e [Mn], e proteínas envolvidas na manutenção celular, como chaperonin GroEL 1 e proteína da família PspA/IM30. Além de diversas proteínas associadas à fisiologia bacteriana.

Nome da proteína	Intensidade	PM (kDa)
Alfa-1,4-glucano fosforilase	1392800000	92,068
Ferritina	452550000	18,041
Catalase	191070000	57,951
Glutamina sintetase	119090000	53,891
Enolase	67518000	45,029
Proteína de proteção de fase estacionária / inanição de DNA Dps	63512000	18,433
Proteína de biossíntese de molibdopterina MoeB	45910000	36,848
NADH desidrogenase / oxidoredutase dependente de FAD	26447000	49,356
Superóxido dismutase [-Zn] / Proteína da família Superóxido dismutase	23769000	20,292
Ni/Fe-hidrogenase subunidade O do citocromo tipo B	21111000	43,754
Glutamato desidrogenase	18677000	49,079
Chaperonina GroEL 2	18147000	57,205
Subunidade da 5-fosfato sintase piridoxal PdxS / Subunidade da 5-fosfato sintase liase piridoxal Pdx	17970000	31,34
Superóxido dismutase [Mn] / Superóxido dismutase	17571000	21,887
Proteína da família PspA/IM30 / Proteína não caracterizada	16894000	30,774
Enzima de ramificação 1,4-alfa-glucana GlgB	15432000	82,603
Diidroorotase	14307000	47,994
Septicolisina	14011000	17,600

Hidroperóxido de alquila redutase AhpD	12790000	18,814
Polipeptídeo repressível de ferro (redutase putativa) / peroxirredoxina	10071000	22,365
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase / Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase tipo I	9996300	36,212
23S rRNA (Guanosina(2251)-2'-O)-metiltransferase RlmB / SpoU rRNA Proteína da família da metilase	9872000	33,724
Proteína de membrana / proteína contendo domínio DUF5129	9702400	53,688
Polirribonucleotídeo nucleotídltransferase	7013800	81,266
Ribonuclease J	6560600	74,369
Protease	6198900	33,595
Chaperonina GroEL 1	5979000	56,771
Subunidade fimbrial ancorada na superfície	5963500	61,235
Difosfato quinase nucleosídeo	5306500	14,801
Proteína de ligação ao ATP do transportador ABC	4925700	33,167
Proteína de membrana / Proteína secretada	4772100	19,592
Proteína de ligação ao sistema de transporte de ferro (secretada) / Proteína de ligação ao sideróforo de ferro	4619000	32,238
Proteína secretada / Proteína não caracterizada	4389800	9,967
Antigénio secretado / Trealose corinomicolil transferase C	4232200	69,765
proteína contendo domínio DUF2505	4122800	17,868
Proteína não caracterizada	4086300	4,785
Regulador transcricional da família LytR	3925600	51,440
Proteína de ligação ao substrato do transportador ABC / Proteína secretada de ligação ao açúcar	3846600	43,528
Frutose-bifosfato aldolase / Frutose-bifosfato aldolase classe II	3744200	37,256
O sistema de transporte ABC exportou proteína / proteína de ligação ao substrato do transportador ABC de zinco	3607400	34,282
Proteína chaperona DnaK	3600300	65,834
Subunidade beta da ATP sintase	3575000	52,262
Helicase	3451200	83,983
Proteína A da camada superficial / Esterase	3344000	38,302
Subunidade catalítica aspartato carbamoiltransferase / aspartato carbamoiltransferase	3340900	34,11
Proteína de subunidade ribossômica grande uL2 / proteína ribossomal L2	2954800	31,094
Serina protease	2705800	43,809
Inosina-5-monofosfato desidrogenase / IMP desidrogenase	2666200	53,32
Proteína de transporte de ligação ao substrato	2515500	58,150
Malato desidrogenase	2492900	34,976
Hidrolase	2461300	39,574
Proteína bigA de virulência exposta à superfície	2201800	31,014
Ribose-fosfato difosfoquinase / Ribose-fosfato pirofosfoquinase	2180800	35,357
Receptor de ferrisideróforo Irp6A / proteína de ligação ao substrato do transportador ABC	1994100	43,101
Subunidade alfa da RNA polimerase DNA-dependente	1980500	36,974
Fator de alongamento Ts / Fator de alongamento de tradução Ts	1973500	29,463
Proteína de subunidade ribossômica pequena uS17 / 30S proteína ribossomal S17	1934100	10,519
Cisteína sintase / Cisteína sintase A	1848100	32,659
Proteína de subunidade ribossômica grande bL12 / proteína ribossomal L7/L12	1783600	13,213
Subunidade 2 da citocromo c oxidase / Citocromo B	1636900	40,467
Alfa-1,4-glucano:maltose-1-fosfato maltosiltransferase (GMPMT)	1612200	75,388
Aminopeptidase da família M18	1353800	48,35
Aldeído desidrogenase / succinato-semialdeído desidrogenase dependente de NAD	1282000	50,187
Proteína de membrana / proteína contendo domínio DUF418	1211400	34,558
Subunidade beta da RNA polimerase dirigida por DNA	1062900	147,984
Dihidrolipofila desidrogenase (LPD)	984290	50,153
Mureína transglicosilase endolítica / Transglicosilase endolítica MltG	975180	41,17
Proteína de subunidade ribossômica pequena uS9 / 30S proteína ribossomal S9	962740	19,112

Proteína de subunidade ribossômica pequena bS16 / 30S proteína ribossomal S16	916030	16,985
Tiorredoxina	907050	11,825
Proteína de subunidade ribossômica grande uL15	861470	15,632
Peptidase / Proteína Secretada	849860	28,563
UPF0182 proteína DIP0733 / proteína da família UPF0182	818890	108,774
Proteína de subunidade ribossômica grande bL20 / 50S proteína ribossomal L20	802880	14,652
Proteína de membrana / proteína de ligação ao substrato transportador ABC de zinco	797090	35,790
Subunidade alfa da ATP sintase	702520	58,215
Glicose-6-fosfato isomerase (GPI)	664480	59,411
Lipoproteína LpqE	662030	19,213
Proteína reguladora de nitrogênio / regulador de nitrogênio da família P-II	625170	12,197
Sistema PTS, componente IIABC específico para glicose / subunidade transportadora de beta-glicosídeo PTS EIIBC	609650	71,599
Proteína de membrana / Proteína não caracterizada	555660	34,651
Cadeia beta 1 da propionil-CoA carboxilase / Subunidade beta da acil-CoA carboxilase / Metilmalonil-CoA carboxiltra	552450	58,271
Peptidase M13	518650	73,695
Subunidade fimbrial ancorada à superfície / spaF	515090	110,282
Proteína secretada do sistema de transporte ABC / Proteína de ligação ao substrato do transportador ABC de metionina	504760	31,280
ATP fosforibosiltransferase (ATP-PRT)	490240	30,481
IMP desidrogenase / Proteína contendo domínio GMP redutase / Proteína relacionada à desidrogenase IMP da família G	475460	40,525
Proteína de ligação ao DNA de fita simples	466790	20,022
Subunidade de flavoproteína da succinato desidrogenase / succinato desidrogenase	462850	74,439
Proteína de subunidade ribossômica grande bL17 / 50S proteína ribossomal L17	441070	16,962
Subunidade de diidroxiacetona quinase / subunidade da DhaK (diidroxiacetona quinase)	431210	34,518
Proteína secretada do sistema de transporte de peptídeo / proteína de ligação ao substrato do transportador ABC	428210	57,408
Proteína de subunidade ribossômica grande uL11 / 50S proteína ribossomal L11	378360	15,077
Subunidade SecD da proteína translocase	365990	62,422
Aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAT)	346290	39,919
Piruvato desidrogenase / Piruvato oxidase	322000	62,497
Peptidil-prolil cis-trans isomerase (PPIase)	300060	19,197
Prolil aminopeptidase / Prolina iminopeptidase	279930	45,852
Desidrogenase	275900	20,370
Proteína secretada / Proteína de ligação ao substrato do transportador ABC de ferro ou zinco	271090	34,900
Fator de alongamento Tu	269360	43,944
Fator de gatilho (TF)	258050	49,515
Proteína secretada / Proteína não caracterizada	257920	15,636
Subunidade de ferro-enxofre de Rieske do complexo de citocromo bc1 / Ubiquinol-citocromo c redutase ferro-enxofre	248640	44,957
Sódio: antiportador de prótons / dicarboxilato / aminoácido: transportador catiônico	247810	45,512
Coproheme descarboxilase	239160	27,230
Proteína exportada / proteína contendo domínio de tiorredoxina / MdbA	195760	26,600
Subunidade b da ATP sintase	191430	21,009
Poliketídese sintase tipo I / Sintase de ácidos graxos	179500	313,950
Transaldolase	175510	38,850
Proteína férrica semelhante à nitrobindina	166930	23,825
Fosforibosilaminoimidazol-succinocarboxamida sintase / purC / Fosforibosilaminoimidazolesuccinoca	166180	33,170
Proteína relacionada ao estresse / Proteína universal do estresse	164990	15,246
Proteína secretada / proteína de ligação ao substrato transportador ABC	162870	52,466
Esterase / Trealose corinomicolicil transferase B / cmtB	145790	36,077
DNA topoisomerase 1	112430	106,551
Subunidade de cobaltoquelatase CobN / proteína relacionada à biossíntese de cobalamina	91827	133,598
1,4-di-hidroxi-2-naftoil-CoA sintase / menB	87038	32,252
Desoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolase (dUTPase)	72823	16,404
Fosfoenolpiruvato carboxiquinase [GTP]	68680	67,353
Micotona redutase	0	50,573
Proteção do DNA durante a proteína de fome / Proteína de proteção de fase estacionária / fome de DNA	0	18,223
Proteína primossomal	0	45,214

Tabela 1 - Análise proteômica de VEs de *C. diphtheriae* ATCC 27010 mostra um perfil de 123 proteínas totais detectadas.

As proteínas identificadas foram ainda organizadas em diferentes grupos com base em dois critérios principais: suas localizações subcelulares (**Figura 14a**) e suas categorias funcionais (**Figura 14b**). Em relação às localizações subcelulares, 39% das proteínas detectadas são citoplasmáticas, 23% estão associadas à membrana, 5% são secretáveis, 4% são periplasmáticas, 1% estão na superfície celular e 1% no nucleóide. Além disso, 27% das proteínas não tiveram sua localização subcelular definida e foram classificadas como desconhecidas.

As proteínas também foram agrupadas de acordo com suas categorias funcionais. Em relação a essas categorias, 13% das proteínas foram classificadas como fatores de virulência, 48,78% das proteínas foram associadas ao metabolismo e catabolismo, 23,27% das proteínas foram relacionadas à síntese e processamento de proteínas e ácidos nucleicos, 13% das proteínas foram associadas ao transporte de moléculas e 8,94% das proteínas estão envolvidas na resposta ao estresse e defesa. Além disso, 3,25% das proteínas foram classificadas em Síntese de Parede Celular e Processos Relacionados e 13% das proteínas não possuem sua função caracterizada.

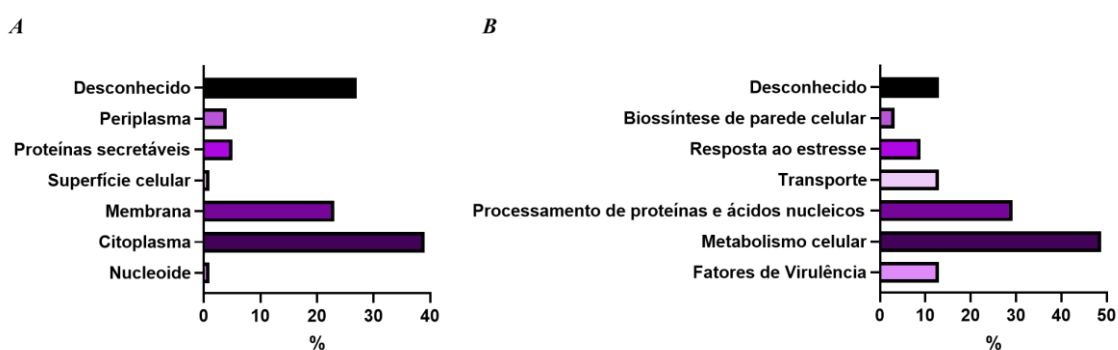


Figura 14 – Distribuição das 123 proteínas detectadas nas VEs de *C. diphtheriae*. As proteínas foram organizadas em grupos de acordo com suas (A) localizações subcelulares e suas (B) categorias funcionais.

4.3 Ensaios de atividade biológica

4.3.1 Efeito das VEs purificadas na atividade metabólica de diferentes células

O ensaio para avaliação do efeito das VEs produzidas pela cepa atoxinogênica de *C. diphtheriae* ATCC 27010 na atividade metabólica de macrófagos da linhagem RAW revelou uma diminuição da atividade metabólica das células apenas em concentrações mais elevadas de VEs (10 e 20 $\mu\text{g/mL}$) após 24 h. de estímulo (**Figura 15a**). No entanto, com tempos de incubação mais prolongados (72h), não foi observada uma redução significativa da atividade metabólica (**Figura 15b**), mesmo nas maiores concentrações testadas.

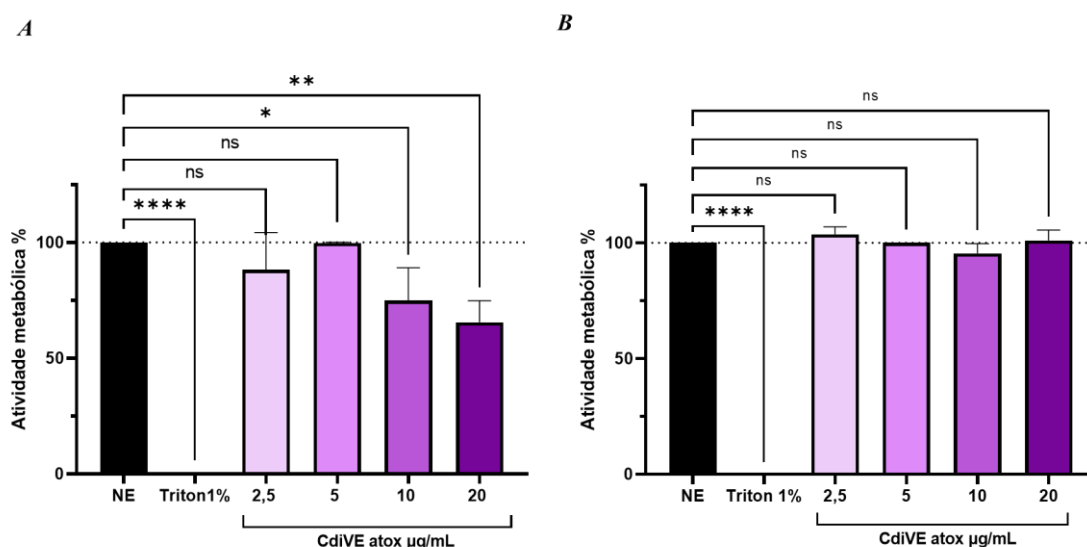


Figura 15 – Efeito das VEs de *C. diphtheriae* na atividade metabólica de macrófagos murinos (RAW ATCC 264.7) detectada através do ensaio MTT. Células RAW ATCC 264.7 tratadas com o VEs (2,5, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$) por (A) 24 h. e (B) 72 h. A significância estatística foi avaliada através de ANOVA; NE = não estimulado; *, $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Para os macrófagos alveolares AMJ2C11 (**Figura 16a**) e pneumócitos A549 CCL-185 (**Figura 16b**) estimulados com 10 $\mu\text{g/mL}$ de VEs da cepa atoxinogênica ATCC 27010, também não foi observada perda de atividade metabólica significativa após 24h. Indicando que, na concentração testada, as VEs não apresentam efeito na diminuição de atividade metabólica significativo.

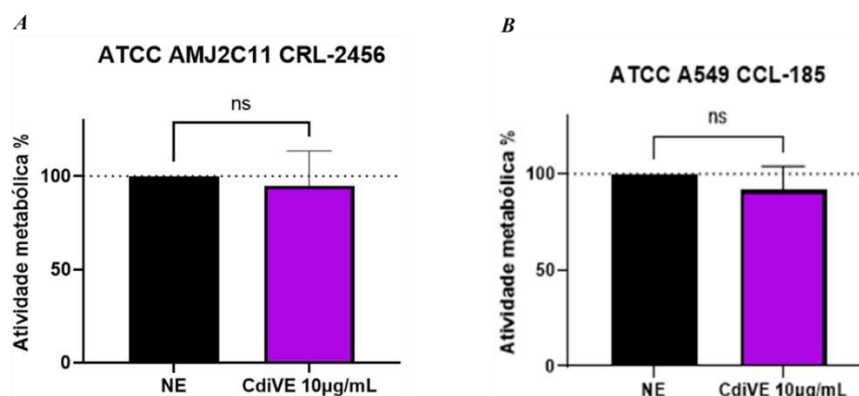


Figura 16 – Efeito das VEs de *C. diphtheriae* na atividade metabólica de macrófagos alveolares ATCC AMJ2C11 CRL-2456 e pneumócitos ATCC A549 CCL-185 detectada através do ensaio MTT. (A) Macrófagos alveolares e (B) pneumócitos tratados com 10 µg/mL de VE por 24 h. A significância estatística foi avaliada através de ANOVA; NE = não estimulado; ns = não significativo.

O ensaio de citotoxicidade também foi realizado em células de epitélio renal de macaco VERO ATCC CRL1586 estimuladas por 24h com VEs atoxinogênicas (provenientes da cepa ATCC 27010) nas concentrações de 5, 10, 20 e 30 µg/mL. Não foi observada diminuição de atividade metabólica significativa, exceto na concentração de 10 µg/mL (**Figura 17a**).

Além disso, o ensaio também foi testado em um maior tempo de incubação (96h) utilizando como estímulo as CdiVEs da cepa atoxinogênica (ATCC 27010) e da cepa toxigenígena (ATCC 27012). Neste caso, as CdiVEs toxigenígenas foram adicionadas ao ensaio devido a suscetibilidade que as células VERO possuem à DT, diferentemente das células murinas, que não possuem receptores suscetíveis à ação da toxina. O tempo de incubação de 96h escolhido foi utilizado levando em consideração trabalhos anteriores que utilizam as células VERO para avaliar a ação da DT (Miyamura *et al.*, 1974). Os resultados mostram perda de atividade metabólica significativa nas células estimuladas com a DT comercial (controle), com CdiVEs atoxinogênicas e com CdiVEs toxigenígenas. Estes resultados indicam que as CdiVEs parecem levar a diminuição de atividade metabólica das células VERO independentemente da presença da DT. Ainda, as CdiVEs atoxinogênicas levaram à uma diminuição de atividade metabólica mais significativa quando comparada às CdiVEs toxigenígenas, indicando que outros fatores de virulência parecem estar associados ao declínio metabólico observado (**Figura 17b**).

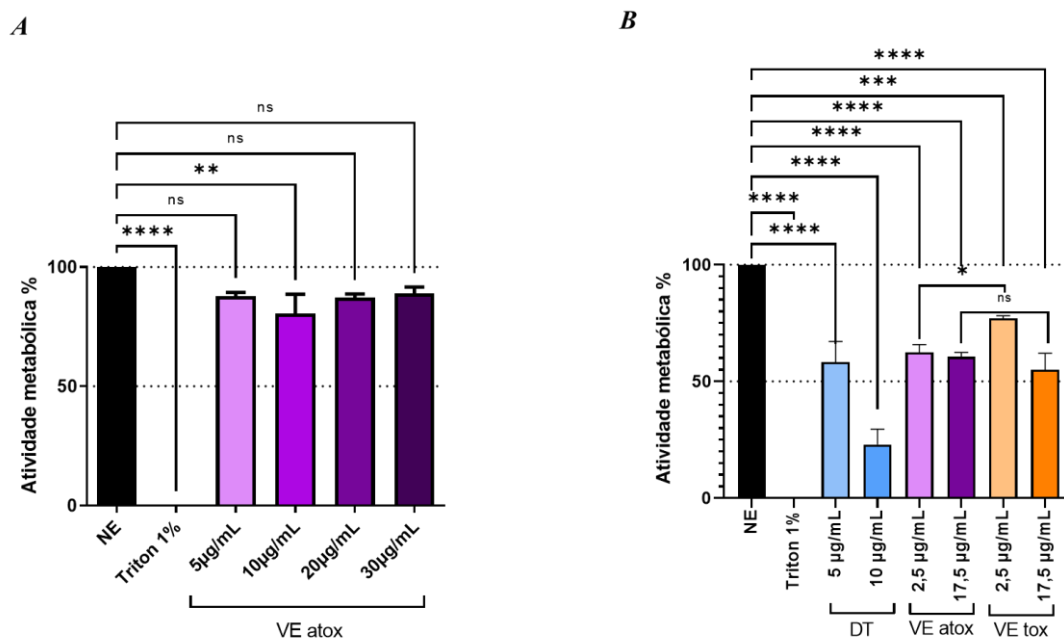


Figura 17 – Efeito das VEs de *C. diphtheriae* na atividade metabólica de células de epitélio renal de macaco VERO ATCC CRL1586 detectada através do ensaio MTT. (A) estímulo com 5-30µg/mL de VEs da cepa ATCC 27010 atoxinogênica por 24h (B) estímulo com 2,5 ou 17,5µg/mL de VEs da cepa ATCC 27010 atoxinogênica ou ATCC 27012 toxínogênica por 96 h; DT, toxina diftérica comercial (Sigma) 5 e 10 µg/mL; Triton 1%, controle positivo; A significância estatística foi avaliada através de ANOVA; NE = não estimulado; ns = não significativo; *, $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ** $p < 0,0001$.**

4.3.2 Indução da produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos murinos estimulados com VEs

No ensaio de dosagem de óxido nítrico, observou-se que as células RAW ATCC264.7 estimuladas com VEs em diferentes concentrações (5, 10 e 20µg/mL) apresentaram um aumento significativo na produção de óxido nítrico (NO) em comparação com o grupo controle, que não recebeu estímulo (NE). Esse aumento foi evidenciado em todos os três intervalos de tempo distintos que foram avaliados: 24, 48 e 72 horas (**Figura 18, a, b, c**). O pico de produção de NO pelas células murinas foi observado 48 h. após a exposição ao estímulo com VEs.

O estímulo dos macrófagos AMJ2C11 ATCC CRL-2456 com as VEs na concentração de 10µg/mL também proporcionou um aumento significativo na

produção de NO em comparação com o grupo controle, que não recebeu estímulo. Este aumento foi observado 24 h. após o estímulo das células murinas com as VEs (Figura 18d).

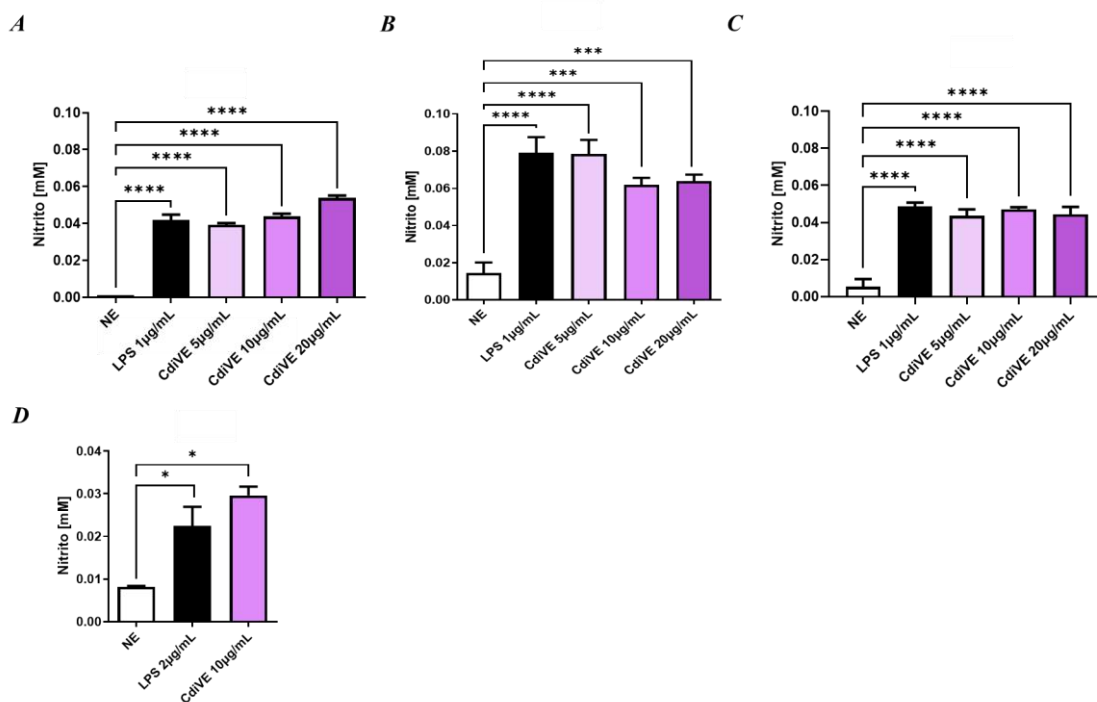


Figura 18 – Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos murinos estimulados com diferentes concentrações de VEs de *C. diphtheriae*. Célula RAW ATCC 264.7 estimulada com VEs purificadas nas concentrações de 5, 10 ou 20 mg/mL por (A) 24h, (B) 48h e (C) 72h; (D) Macrófagos alveolares AMJ2C11 ATCC CRL-2456 estimulados com VEs purificadas na concentração de 10µg/mL por 24h; A significância estatística foi avaliada através de ANOVA; *, $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.

4.3.3 Detecção da produção de citocinas em macrófagos estimulados com VEs purificadas

O ensaio ELISA foi realizado para quantificar a produção de citocinas em células RAW 264.7 estimuladas com VEs em diferentes concentrações. Os resultados mostraram um aumento significativo nos níveis de TNF- α quando as células foram estimuladas com 5, 10 e 20 µg/mL de VEs após 24h de incubação com o estímulo (Figura 19a). Em contrapartida, as citocinas IL-12 e IL-10 não apresentaram variações significativas nos seus níveis de produção após 24h do estímulo em comparação ao

controle não estimulado, independentemente da concentração de VEs utilizada (**Figura 19b e c**).

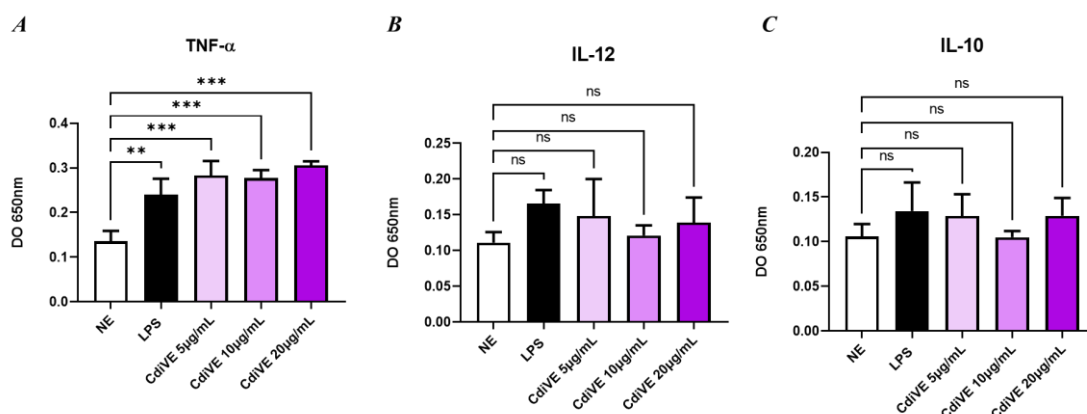


Figura 19 – Detecção da produção de citocinas por macrófagos RAW ATCC 264.7 estimulados com VEs purificadas. As células RAW ATCC 264.7 foram estimuladas com VEs purificadas (5, 10 ou 20 mg/mL) por 24h e a produção de (A) TNF- α (B) IL-12 e (C) IL-10, detectada por kit ELISA, seguindo as recomendações do fabricante. A significância estatística foi avaliada através de ANOVA; ns = não significativo; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

5. DISCUSSÃO

O aumento dos casos de difteria, que, apesar da disponibilidade da vacina, continua a representar um desafio significativo para a saúde pública (Clarke *et al.*, 2019) e o alarmante aumento do número de casos de infecções causadas por cepas de *C. diphtheriae* não produtoras de toxina (Wagner *et al.*, 2010; Indumathi, Shikha e Suryaprakash, 2014) evidencia que a vacinação, que se concentra na proteção contra a DT, pode não ser suficiente para prevenir doenças associadas a estas cepas (Clarke *et al.*, 2019). Esta situação mostra a necessidade de estudos sobre outros fatores de virulência do bacilo diftérico que possam estar relacionados a sua patogênese.

Em paralelo, as VEs emergem como um alvo terapêutico promissor devido à sua capacidade de carrear padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs), que são reconhecidos pelo sistema imunológico (Micoli e MacLennan, 2020). Estudos anteriores demonstram que VEs que carregam MAMPs podem ativar receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs) nas células do hospedeiro, desencadeando respostas imunes robustas e potencialmente eficazes contra infecções

(Prados-rosales *et al.*, 2014c; Kopparapu *et al.*, 2021; Yerneni *et al.*, 2021). Além disso, as VEs não possuem a capacidade de se replicar, o que minimiza o risco de recuperação da capacidade replicativa que outros tipos de vacina podem possuir. Também, são altamente estáveis quando expostas a diferentes temperaturas e tratamentos e contêm muitos dos componentes imunogênicos associados à membrana da bactéria de origem o que confere a essas nanopartículas uma atividade adjuvante própria, capaz de potencializar as respostas de anticorpos e células T aos antígenos. Por fim, também se destacam pela possibilidade de serem bioengenheiradas para expressar qualquer antígeno escolhido e manipuladas para reduzir sua endotoxicidade, ampliando ainda mais seu potencial terapêutico e vacinal (Kaparakis-liaskos e Ferrero, 2015).

Nossos resultados demonstraram, pela primeira vez, que o *C. diphtheriae* é capaz de produzir VEs (CdiVEs) em quantidade satisfatória para a realização dos ensaios posteriores. Os ensaios de avaliação da estrutura das VEs por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) mostraram uma estrutura esférica típica, intacta (15 - 315 nm), corroborando com dados já descritos na literatura para VEs de diversas espécies bacterianas, como *Streptomyces* (30-250nm) (Schrempf *et al.*, 2011), *Mycobacterium* (20-250) (Lee *et al.*, 2015) e *Bacillus anthracis* (50-250nm) (Rivera *et al.*, 2010).

Em nossos ensaios preliminares de análise proteômica das CdiVEs da amostra de *C. diphtheriae* atoxinogênica, foi possível observar a presença de 123 proteínas, entre as quais se destacam fatores de virulência, proteínas relacionadas ao metabolismo celular, ao transporte de nutrientes e à resposta ao estresse. Esses resultados indicam que as CdiVEs podem desempenhar um papel multifacetado na patogênese da infecção, não apenas como veículos de transporte de fatores de virulência, mas também como estruturas envolvidas em processos essenciais para a sobrevivência e adaptação bacteriana no ambiente do hospedeiro.

A identificação de proteínas como a catalase, a septicolisina e a proteína bigA, além de subunidades fimbriais como spaD e spaF, sugere que as VEs transportam componentes diretamente relacionados à adesão bacteriana e à evasão da resposta imune. A catalase, por exemplo, atua no estresse oxidativo induzido pelo sistema imune do hospedeiro (Cappelli *et al.*, 2022), enquanto a septicolisina pode estar envolvida na formação de poros na membrana de células hospedeiras, facilitando a disseminação da infecção (Schröder, 2024). As subunidades fimbriais podem desempenhar um papel crucial na adesão da bactéria à superfície das células do hospedeiro, essencial para a colonização e o início da infecção (Kang *et al.*, 2014).

Outro aspecto relevante foi a presença de proteínas associadas à aquisição de nutrientes, como a ferritina e as proteínas de transporte de ferro e zinco, incluindo os sideróforos de ferro. Estudos anteriores demonstram que situações de limitação de ferro são capazes de estimular uma maior produção de VEs e como estas VEs aparentam carrear mais sideróforos (Prados-rosales *et al.*, 2014b). Isso indica que as VEs podem facilitar a captação de nutrientes essenciais para a sobrevivência bacteriana durante a infecção. O ferro, em particular, é um nutriente limitado durante a resposta imune, e os sideróforos são fundamentais para a bactéria superar essa limitação, favorecendo sua proliferação dentro do hospedeiro. Para *C. diphtheriae*, a regulação do ferro é particularmente importante para a expressão de sua DT, um dos principais fatores de virulência da bactéria. Estudos envolvendo as VEs de *M. tuberculosis* demonstram sua superexpressão em ambientes com limitação de ferro (Prados-rosales *et al.*, 2014b). Além disso, a presença de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, reforça a ideia de que as VEs ajudam a proteger *C. diphtheriae* contra os mecanismos de defesa do hospedeiro, permitindo à bactéria uma maior resistência ao estresse oxidativo.

A análise das localizações subcelulares das proteínas revelou que a maioria das proteínas identificadas estão associadas ao citoplasma e à membrana celular. Isso sugere que as VEs não apenas contêm proteínas secretadas, mas também proteínas envolvidas em processos internos essenciais à fisiologia bacteriana. A presença de proteínas de transporte e de manutenção celular, como a chaperonina GroEL e proteínas da família PspA/IM30, por exemplo, indica que as VEs também parecem estar envolvidas na proteção e manutenção da integridade das células bacterianas durante a infecção, além de facilitar a adaptação a condições adversas (Elderkin *et al.*, 2002; Goyal, Qamra e Mande, 2006). A análise da proteômica também revelou a presença da adesina DIP0733, que é capaz de interagir com colágeno, fibrinogênio, eritrócitos e células epiteliais, parece ter papel relevante para a colonização bacteriana e já foi associada anteriormente à citotoxicidade e apoptose de células epiteliais (Sabbadini *et al.*, 2012).

Em relação à função das VEs na infecção, a combinação de fatores de virulência, proteínas antioxidantes, e componentes relacionados ao transporte de nutrientes e à adesão celular sugere que as VEs desempenham um papel essencial na modulação da interação entre *C. diphtheriae* e as células hospedeiras. Por fim, a diversidade funcional das proteínas encontradas nas VEs de *C. diphtheriae* sugere que as VEs são componentes multifuncionais que vão além da simples liberação de toxinas, desempenhando um papel crucial na modulação da virulência bacteriana e na adaptação

ao microambiente do hospedeiro.

Neste trabalho, foi demonstrado que as VEs provenientes da cepa de *C. diphtheriae* produtora de toxina (ATCC 27012) parecem carrear a DT, visto que foi observada marcação positiva quando o anticorpo monoclonal contra DT foi utilizado. Ensaios de análise proteômica de CdiVEs isoladas da amostra toxinogênica são necessários para confirmar a presença da DT nessas VEs. A presença de DT na CdiVE sugere que as VEs podem atuar como veículos de transporte direcionados, facilitando a entrega da toxina às células do hospedeiro. Tal mecanismo já foi descrito em outros estudos envolvendo VEs de diversas espécies bacterianas, nos quais desempenham um papel central na disseminação de fatores de virulência (Fiocca *et al.*, 1999; Kesty *et al.*, 2004; Effah *et al.*, 2024).

Esse resultado levanta questões relevantes sobre o mecanismo de internalização da DT mediada pelas VEs. Estudos futuros são necessários para elucidar a localização exata da toxina – no interior das vesículas ou associada à sua membrana – e compreender se a internalização da DT pelas VEs depende de sua interação com o receptor HB-EGF. Além disso, a capacidade das VEs de transportar e proteger a DT pode ter implicações importantes na virulência de *C. diphtheriae*, permitindo que a bactéria explore mecanismos adicionais de evasão imune e maior eficiência na disseminação de fatores tóxicos.

Uma hipótese interessante a ser considerada é que a introdução da vacina baseada na DT pode estar induzindo uma pressão seletiva sobre o bacilo diftérico, estimulando a bactéria a desenvolver novos mecanismos de adaptação para proteger a toxina e garantir sua sobrevivência no hospedeiro. Nesse contexto, o transporte da DT dentro das VEs poderia representar uma estratégia evolutiva da bactéria para evitar a neutralização da toxina pelo sistema imunológico do hospedeiro.

Ademais, essa adaptação poderia também envolver a modificação das toxinas transportadas pelas VEs, em um esforço para eludir a resposta imunológica ou as estratégias terapêuticas que visam neutralizar a toxina. Já se sabe que *C. diphtheriae* produz variantes modificadas da DT o que podem alterar seu reconhecimento pelo sistema imunológico dos hospedeiros vacinados (Will *et al.*, 2021).

A vacina atual contra a difteria é obtida através do cultivo da cepa hipertoxinogênica de *C. diphtheriae* seguida da remoção das bactérias por centrifugação e tratamento com formaldeído para inativação da toxina. Após o tratamento, o toxóide é concentrado por ultrafiltração e purificado por uma combinação de fracionamento de

sal e métodos cromatográficos, e é então testado quanto à potência, toxicidade, esterilidade e reversibilidade (Linggood, 1963). Para preparação da vacina, os toxóides são absorvidos em hidróxido de alumínio (Rappuoli e Malito, 2014).

Sem dúvida, a criação da vacina de toxoide contra a difteria representa um marco histórico para a medicina e para a humanidade. Entretanto, não está claro se a produção de anticorpos para neutralizar os efeitos da exotoxina são suficientes para prevenir a colonização ou eliminar cepas não toxigênicas do hospedeiro. Além disso, não se sabe se a seleção induzida por vacinas desempenha algum papel no surgimento de cepas invasivas não toxigênicas de *C. diphtheriae* (Hoskisson, 2018). Nesse sentido, a identificação de antígenos presentes nas VEs pode abrir novas perspectivas para o desenvolvimento de imunobiológicos mais eficazes contra *C. diphtheriae*, que estimulem uma ativação mais abrangente e robusta do sistema imunitário.

Investigar essas questões é essencial para compreender a dinâmica da interação entre o principal fator de virulência de *C. diphtheriae* e as células do hospedeiro, além de oferecer informações valiosas para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e estratégias vacinais.

Os resultados aqui obtidos sugerem que as VEs de *C. diphtheriae* da cepa ATCC 27010 apresentam baixo efeito na atividade metabólica de diferentes tipos celulares, como macrófagos alveolares, pneumócitos e células epiteliais renais, quando avaliadas em um período de incubação de 24 h. Já as células RAW, parecem ter sua atividade metabólica afetada pelas VEs da cepa ATCC 27010 em um período de incubação de 24 h. apenas quando testadas em maiores concentrações. Entretanto, em períodos de incubação mais prolongados, como 72 h., observa-se que as células RAW demonstram a capacidade de superar o efeito de diminuição de atividade metabólica inicialmente causado pelas VEs em concentrações mais elevadas. Conforme evidenciado nos resultados, após esse intervalo de tempo, as células retomam sua capacidade proliferativa, indicando uma possível adaptação ou recuperação frente à exposição prolongada às VEs.

A baixa citotoxicidade observada é uma característica desejável que permite que as VEs induzam respostas imunes eficazes, carregando antígenos específicos que estimulam a produção de anticorpos e a ativação de células T, promovendo uma resposta imune robusta sem causar danos significativos às células do hospedeiro (Xie *et al.*, 2022). Estudos adicionais utilizando variadas concentrações de VEs e diferentes tempos de incubação, além da utilização de células humanas não imortalizadas, são necessários.

A exposição prolongada das células VERO às CdiVEs isoladas de ambas as cepas atoxinogênica (ATCC 27010) e toxinogênica (ATCC 27012) resultou em uma citotoxicidade significativa em todas as concentrações avaliadas. Esse efeito foi observado em tempos de incubação mais longos (96h), indicando que, mesmo em concentrações mais baixas de VE, a interação prolongada com as células foi suficiente para desencadear danos consideráveis.

É importante considerar que a escolha dos tipos celulares no estudo foi baseada em suas características específicas. As células VERO, derivadas de rim de macaco-verde africano, foram selecionadas devido à sua conhecida susceptibilidade à DT (Morris *et al.*, 1985), enquanto os macrófagos RAW não são suscetíveis à ação da DT. Apesar dessa diferença, os resultados mostraram que as VEs das cepas de *C. diphtheriae* que não produzem toxina também foram capazes de induzir citotoxicidade em células VERO. Isso sugere que a perda de atividade metabólica observada pode não estar exclusivamente associado à DT e pode estar sendo mediado por outros fatores de virulência presentes nas VEs.

Além disso, possivelmente, devido a diferenças na origem e características específicas de cada linhagem as células VERO apresentaram maior susceptibilidade à citotoxicidade das VEs em comparação às células RAW. Essa diferença pode ser atribuída a diversos fatores, como variações na composição da membrana plasmática, na expressão de receptores celulares, ou mesmo na capacidade de ativação de vias de reparo e defesa celular.

A ativação de macrófagos é um processo essencial da resposta imune inata, desempenhando um papel fundamental na defesa contra patógenos. Ao serem ativados, os macrófagos se tornam células efetoras altamente funcionais, capazes de reconhecer e eliminar microrganismos invasores (Trost *et al.*, 2010). Além disso, são mediadores cruciais na comunicação entre a imunidade inata e adaptativa. Um dos principais mecanismos de *killing* bacteriano dos macrófagos é a produção de NO (Slauch, 2011), que ocorre através da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS2), a qual é induzida em resposta a estímulos inflamatórios, como a ativação de PRRs (Weinberg, 1998).

Por esse motivo, realizamos experimentos de dosagem de nitrito em macrófagos da linhagem RAW e macrófagos alveolares AMJ que foram estimulado por 24h. com CdiVEs da cepa atoxinogênica. As CdiVEs se mostraram capazes de estimular a produção de NO nestes macrófagos, o que também ocorre quando o estímulo é realizado com o bacilo diftérico vivo (Vidal, 2019).

Além disso, quando ativados, por exemplo, por meio de PRRs, os macrófagos se tornam uma fonte crucial de mediadores pró-inflamatórios, como o TNF- α e as interleucinas (ILs) como IL-10 e IL-12, conhecidos por seu papel na resposta inflamatória (Degré, 1996). O TNF- α é uma citocina produzida principalmente por macrófagos e células T ativadas e desempenha um papel fundamental na mediação da inflamação e na ativação de outras células do sistema imunitário. A elevada produção de TNF- α em resposta às CdiVEs da cepa atoxinogênica indica uma ativação significativa dos macrófagos, estimulando-os a liberar essa citocina, mesmo quando as VEs foram utilizadas em baixas concentrações. Tal resultado corrobora com outros estudos que encontraram concentrações elevadas de TNF- α no sobrenadante de culturas de células e no plasma de camundongos (Peixoto *et al.*, 2014; Vidal, 2019). Apesar do estímulo dos macrófagos com as CdiVEs da cepa atoxinogênica levar a produção significativa de TNF- α , não foi observada uma produção significativa das interleucinas IL-10 e IL-12. A IL-10, conhecida por suas propriedades regulatórias, desempenha um papel regulatório crucial da resposta imune. Por outro lado, a IL-12 é fundamental para a ativação de células T e a promoção de respostas imunes adaptativas, especialmente na defesa contra patógenos intracelulares (Degré, 1996).

Estes resultados, assim como trabalhos anteriores, demonstram o potencial que VEs de diferentes espécies bacterianas possuem de elicitar uma resposta do sistema imunitário do hospedeiro. Trabalhos anteriores demonstram que monócitos e macrófagos estimulados com VEs de *Neisseria meningitidis* induzem a produção de CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-12p70 e TNF (Tavano *et al.*, 2009). De forma semelhante, VEs de *Helicobacter pylori* promovem a produção de IL-6 por células mononucleares de sangue periférico humano (Winter *et al.*, 2014), enquanto OMVs de *Salmonella spp.* induzem a produção de TNF e NO por macrófagos de camundongos (Alaniz *et al.*, 2007). Além disso, surge a hipótese de que as CdiVEs possam ser internalizadas pelas células do hospedeiro, semelhante ao observado com VEs de outras espécies. Por exemplo, estudos demonstraram a presença de VEs de *Legionella pneumophila* no citoplasma de macrófagos (Jäger *et al.*, 2014). Considerando que o próprio bacilo diftérico possui a capacidade de ser internalizado por macrófagos, é plausível questionar se as VEs de Cdi apresentam comportamento semelhante (Vidal, 2019).

Os dados obtidos neste trabalho demonstram que as VEs de *C. diphtheriae* representam importantes veículos de biomoléculas associadas à virulência,

comunicação e fisiologia bacteriana, além de seu potencial de modular resposta imunitária e a fisiologia de células hospedeiras. Estes achados contribuem para a compreensão dos mecanismos pelos quais *C. diphtheriae* interage com o hospedeiro, fornecendo subsídios para estudos futuros sobre seu papel na patogênese e potenciais aplicações terapêuticas das VEs.

6. CONCLUSÕES

- *C. diphtheriae* é capaz de produzir VEs com diâmetros variando entre 15 e 315 nm, com um tamanho médio de 92,8 nm, conforme demonstrado por DLS e microscopia eletrônica de transmissão;

- As VEs isoladas da amostra toxinogênica de *C. diphtheriae* ATCC 27012 apresentaram a DT, detectada por *Western blotting*.

- A análise por proteômica das CdiVEs evidenciou a presença de 123 proteínas, entre as quais, foram detectados fatores de virulência, como catalase, septicolisina e proteína bigA, além de proteínas associadas à fisiologia bacteriana, ressaltando a relevância das VEs como portadoras de moléculas essenciais envolvidas na patogênese bacteriana.

- Ensaio de citotoxicidade revelaram que as VEs de *C. diphtheriae* possuem baixa citotoxicidade em células AMJ2C11 e A549. Entretanto, macrófagos RAW foram sensíveis a determinadas concentrações de VE após estímulo por 24h.

- Células VERO foram sensíveis as VEs após 96h de estímulo, independentemente da presença da DT;

- O estímulo de macrófagos com VEs resultou em aumento significativo na produção de óxido nítrico (NO) e produção de TNF- α , sugerindo um papel potencial na modulação da resposta inflamatória.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alaniz, R. C., Deatherage, B. L., Lara, J. C. e Cookson, B. T. (2007) Membrane Vesicles Are Immunogenic Facsimiles of *Salmonella typhimurium* That Potently Activate Dendritic Cells, Prime B and T Cell Responses, and Stimulate Protective Immunity In Vivo. *The Journal of Immunology*, v. 179, n. 11, p. 7692–7701.
- Araújo, M. R. B., Sousa, M. A. B., Seabra, L. F., Caldeira, L. A., Faria, C. D., Bokermann, S., Sant'Anna, L. O., Santos, L. S. e Mattos-Guaraldi A. L. (2021) Cutaneous infection by non-diphtheria-toxin producing and penicillin-resistant *Corynebacterium diphtheriae* strain in a patient with diabetes mellitus. *Access Microbiology*, v. 3, n. 11.
- Bernard, K. A. e Funke, G. (2015) *Corynebacterium*. Em: WHITMAN, W. B. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 1. ed. [s.l.] Wiley, p. 1–70.
- Bläckberg, A., Falk, L., Oldberg, K., Olaison, L., Rasmussen, M. (2021) Infective Endocarditis Due to *Corynebacterium* Species: Clinical Features and Antibiotic Resistance. *Open Forum Infectious Diseases*, v. 8, n. 3, p. ofab055.
- Briaud, P.; Carroll, R. K. (2020) Extracellular Vesicle Biogenesis and Functions in Gram-Positive Bacteria. *Infection and Immunity*, v. 88, n. 12, p. e00433-20.
- Burkovski, A. (2023) Proteomics of Toxigenic *Corynebacteria*. *Proteomes*, v. 12, n. 1, p. 2, 30.
- Buzas, E. I. (2023) The roles of extracellular vesicles in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, v. 23, n. 4, p. 236–250.
- Cappelli, E. A., Cucinelli, A. E. S., Simpson-Louredo, L., Canellas, M. E. F., Antunes, C. A., Burkovski, A., da Silva, J. F. R., Mattos-Guaraldi, A. L., Saliba, A. M., Santos, L. S. (2022) Insights of OxyR role in mechanisms of host-pathogen interaction of *Corynebacterium diphtheriae*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 53, n. 2, p. 583–594.
- Chippaux, J.-P. (2024) Gaston Ramon's Big Four. *Toxins*, v. 16, n. 1, p. 33.
- Chu, G. C., Katakura, K., Zhang, X. Yoshida, T. e Ikeda-Saito M. (1999) Heme Degradation as Catalyzed by a Recombinant Bacterial Heme Oxygenase (Hmu O) from *Corynebacterium diphtheriae*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 30, p. 21319–21325.
- Clarke, K. E. N., MacNeil, A., Hadler, S., Scott, C., Tiwari, T. S. P. e Cherian, T. (2019) Global Epidemiology of Diphtheria, 2000-2017. *Emerging Infectious Diseases*, v. 25, n. 10, p. 1834–1842.
- Dandinaraiaiah, M., Vikram, B. K., Krishnamurthy, N., Chetan, A. C., e Jain, A. (2013) Diphtheria Re-emergence: Problems Faced by Developing Countries. *Indian Journal of Otolaryngology and Head and Neck Surgery: Official Publication of the Association of Otolaryngologists of India*, v. 65, n. 4, p. 314–318.
- Dias, A. A. S. O., Santos, L. S., Sabbadini, P. S., Santos, C. S., Silva Junior, F. C., Napoleão, F., Nagao, P. E., Villas-Bôas, M. H. S., Hirata Junior, R., e Mattos Guaraldi, A. L. (2011) Difteria pelo *Corynebacterium ulcerans*: uma zoonose emergente no Brasil e no mundo. *Revista de Saúde Pública*, v. 45, n. 6, p. 1176–1191.
- Effah, C. Y., Ding, X., Drokow, E. K., Li, X., Tong, R., e Sun, T. (2024) Bacteria-derived extracellular vesicles: endogenous roles, therapeutic potentials and their biomimetics for the treatment and prevention of sepsis. *Frontiers in Immunology*, v. 15, p. 1296061.
- Elderkin, S., Jones, S., Schumacher, J., Studholme, D., e Buck, M. (2002) Mechanism of Action of the *Escherichia coli* Phage Shock Protein PspA in Repression of the AAA Family Transcription Factor PspF. *Journal of Molecular Biology*, v. 320, n. 1, p. 23–37.

- Fiocca, R., Necchi, V., Sommi, P., Ricci, V., Telford, J., Cover, T. L., e Solcia, E. (1999) Release of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by both a specific secretion pathway and budding of outer membrane vesicles. Uptake of released toxin and vesicles by gastric epithelium. *The Journal of Pathology*, v. 188, n. 2, p. 220–226.
- Freeman, V. J. (1951) Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *Journal of Bacteriology*, v. 61, n. 6, p. 675–688.
- Galazka, A. M.; Robertson, S. E.; Oblapenko, G. P. (1995) Resurgence of diphtheria. *European Journal of Epidemiology*, v. 11, n. 1, p. 95–105.
- Gomes, D. L. R., Martins, C. A. S., Faria, L. M. D., Santos, L. S., Santos, C. S., Sabbadini, P. S., Souza, M. C., Alves, G. B., Rosa, A. C. P., Nagao, P. E., Pereira, G. A., Hirata, R., e Mattos-Guaraldi, A. L. (2009) *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence. *Journal of Medical Microbiology*, v. 58, n. 11, p. 1419–1427.
- Goyal, K.; Qamra, R.; Mande, S. C. (2006) Multiple Gene Duplication and Rapid Evolution in the groEL Gene: Functional Implications. *Journal of Molecular Evolution*, v. 63, n. 6, p. 781–787.
- Hadfield, T. L., McEvoy, P., Polotsky, Y., Tzinslerling, V. A., e Yakovlev, A. A. (2000) The pathology of diphtheria. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 181 Suppl 1, p. S116-120.
- Han, P., Bartold, P. M., Salomon, C., e Ivanovski, S. (2021) Salivary Outer Membrane Vesicles and DNA Methylation of Small Extracellular Vesicles as Biomarkers for Periodontal Status: A Pilot Study. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 5, p. 2423.
- Hoskisson, P. A. (2018) Microbe Profile: *Corynebacterium diphtheriae* - an old foe always ready to seize opportunity. *Microbiology (Reading, England)*, v. 164, n. 6, p. 865–867.
- Indumathi, V.; Shikha, R.; Suryaprakash, D. (2014) Diphtheria-like illness in a fully immunised child caused by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. *Indian Journal of Medical Microbiology*, v. 32, n. 4, p. 443–445.
- Jäger, J., Marwitz, S., Tiefenau, J., Rasch, J., Shevchuk, O., Kugler, C., Goldmann, T., e Steinert, M. (2014) Human Lung Tissue Explants Reveal Novel Interactions during *Legionella pneumophila* Infections. *Infection and Immunity*, v. 82, n. 1, p. 275–285.
- Jeon, H., Oh, M. H., Jun, S. H., Kim, S. I., Choi, C. W., Kwon, H. I., Na, S. H., Kim, Y. J., Nicholas, A., Selasi, G. N., e Lee, J. C. (2016) Variation among *Staphylococcus aureus* membrane vesicle proteomes affects cytotoxicity of host cells. *Microbial Pathogenesis*, v. 93, p. 185–193.
- Murphy, J. R. (1996) *Corynebacterium Diphtheriae* in: *Medical microbiology*. 4th edition ed. Galveston, Texas: University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas.
- Kang, H. J., Paterson, N. G., Kim, C. U., Middleditch, M., Chang, C., Ton-That, H., e Baker, E. N. (2014) A slow-forming isopeptide bond in the structure of the major pilin SpaD from *Corynebacterium diphtheriae* has implications for pilus assembly. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, v. 70, n. Pt 5, p. 1190–1201.
- Kaparakis-Iliaskos, M.; Ferrero, R. L. (2015) Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nature Reviews Immunology*, v. 15, n. 6, p. 375–387.
- 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*, v. 23, n. 23, p. 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*, v. 40, p. 97–104.

- Kim, M.-R., Hong, S.-W., Choi, E.-B., Lee, W.-H., Kim, Y.-S., Jeon, S. G., Jang, M. H., Gho, Y. S., e Kim, Y.-K. (2012) Staphylococcus aureus -derived extracellular vesicles induce neutrophilic pulmonary inflammation via both T h1 and T h17 cell responses. *Allergy*, v. 67, n. 10, p. 1271–1281.
- Kim, S., Oh, D.-B., Kwon, O., e Kang, H. A. (2010) Identification and functional characterization of the NanH extracellular sialidase from *Corynebacterium diphtheriae*. *Journal of Biochemistry*, v. 147, n. 4, p. 523–533.
- Klieve, A. V., Yokoyama, M. T., Forster, R. J., Ouwerkerk, D., Bain, P. A., e Mawhinney, E. L. (2005) Naturally Occurring DNA Transfer System Associated with Membrane Vesicles in Cellulolytic *Ruminococcus* spp. of Ruminant Origin. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 8, p. 4248–4253.
- Kopparapu, P. K., Deshmukh, M., Hu, Z., Mohammad, M., Maugeri, M., Götz, F., Valadi, H., e Jin, T. (2021) Lipoproteins Are Responsible for the Pro-Inflammatory Property of Staphylococcus aureus Extracellular Vesicles. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 13, p. 7099.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680–685.
- Laird, W.; Groman, N. (1976) Prophage map of converting corynebacteriophage beta. *Journal of Virology*, v. 19, n. 1, p. 208–219, jul. 1976.
- 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., e Gho, Y. S. (2009) Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: Proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus* -derived membrane vesicles. *PROTEOMICS*, v. 9, n. 24, p. 5425–5436.
- Lee, J., Kim, S.-H., Choi, D.-S., Lee, J. S., Kim, D.-K., Go, G., Park, S.-M., Kim, S. H., Shin, J. H., Chang, C. L. e Gho, Y. S. (2015) Proteomic analysis of extracellular vesicles derived from *Mycobacterium tuberculosis*. *PROTEOMICS*, v. 15, n. 19, p. 3331–3337.
- Li, Y., Zhao, R., Cheng, K., Zhang, K., Wang, Y., Zhang, Y., Li, Y., Liu, G., Xu, J., Xu, J., Anderson, G. J., Shi, J., Ren, L., Zhao, X. e Nie, G. (2020) Bacterial Outer Membrane Vesicles Presenting Programmed Death 1 for Improved Cancer Immunotherapy via Immune Activation and Checkpoint Inhibition. *ACS nano*, v. 14, n. 12, p. 16698–16711.
- Liu, Y., Defourny, K. A. Y., Smid, E. J. e Abee, T. (2018) Gram-Positive Bacterial Extracellular Vesicles and Their Impact on Health and Disease. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 1502.
- Livingood, C. S.; Perry, D. J.; Forrester, J. S. (1946) Cutaneous diphtheria; a report of 140 cases. *The Journal of Investigative Dermatology*, v. 7, n. 6, p. 341–364.
- Lovelock, T., du Plessis, M., van der Westhuizen, C., Janson, J. T., Lawrence, C., Parker, A., Pecoraro, A., Prozesky, H., von Gottberg, A. e Taljaard, J. (2024) Non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* endocarditis: A cluster of five cases. *Southern African Journal of Infectious Diseases*, v. 39, n. 1, p. 539.
- Mattos-Guaraldi, A. L., Moreira, L. O., Damasco, P. V. e Hirata Júnior, R. (2003) Diphtheria remains a threat to health in the developing world--an overview. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 8, p. 987–993.
- Medugu, N., Musa-Booth, T. O., Adegboro, B., Onipede, A. O., Babazhitsu, M. e Amaza, R. (2023) A review of the current diphtheria outbreaks. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, v. 24, n. 2, p. 120–129.
- Pfaller, M. A e Murray, P. R. (2017) *Microbiologia Médica*. 8ª edição ed. [s.l.] Elsevier.
- Micoli, F.; Maclennan, C. A. (2020) Outer membrane vesicle vaccines. *Seminars in Immunology*, v. 50, p. 101433.

- Degré, M. (1996) Cytokines and bacterial infections. *Biotherapy*, v. 8, p. 219–228.
- Ministério da Saúde (1998) Programa Nacional de Imunizações: PNI 25 anos.
- Miyamura, K., Nishio, S., Ito, A., Murata, R. e Kono, R. (1974) Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titres using VERO cells. *Journal of Biological Standardization*, v. 2, n. 3, p. 189–201.
- Moreira, L. O.; Mattos-guaraldi, A. L.; Andrade, A. F. B. (2008) Novel lipoarabinomannan-like lipoglycan (CdiLAM) contributes to the adherence of *Corynebacterium diphtheriae* to epithelial cells. *Archives of Microbiology*, v. 190, n. 5, p. 521–530.
- Morris, R. E., Gerstein, A. S., Bonventre, P. F. e Saelinger, C. B. (1985) Receptor-mediated entry of diphtheria toxin into monkey kidney (Vero) cells: electron microscopic evaluation. *Infection and Immunity*, v. 50, n. 3, p. 721–727
- Murphy, J. R. (1996) *Corynebacterium diphtheriae*. Em: BARON, S. (Ed.). *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Murphy, J. R. (2011) Mechanism of Diphtheria Toxin Catalytic Domain Delivery to the Eukaryotic Cell Cytosol and the Cellular Factors that Directly Participate in the Process. *Toxins*, v. 3, n. 3, p. 294–308.
- Nagakubo, T.; Nomura, N.; Toyofuku, M. (2019) Cracking Open Bacterial Membrane Vesicles. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 3026.
- Ott, L., Höller, M., Gerlach, R. G., Hensel, M., Rheinlaender, J., Schäffer, T. E. e Burkovski, A. (2010) *Corynebacterium diphtheriae* invasion-associated protein (DIP1281) is involved in cell surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells. *BMC microbiology*, v. 10, p. 2.
- Ott, L.; Möller, J.; Burkovski, A. (2022) Interactions between the Re-Emerging Pathogen *Corynebacterium diphtheriae* and Host Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 6, p. 3298.
- Pappenheimer, A. M. (1977) Diphtheria toxin. *Annual Review of Biochemistry*, v. 46, p. 69–94.
- Peixoto, R. S., Pereira, G. A., Dos Santos, L. S., Rocha-de-Souza, C. M., Gomes, D. L. R., Dos Santos, C. S., Werneck, L. M. C., Dias, A. A. S. O., Hirata, R., Nagao, P. E. e Mattos-Guaraldi, A. L. (2014) Invasion of endothelial cells and arthritogenic potential of endocarditis-associated *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbiology*, v. 160, n. 3, p. 537–546.
- Peixoto, R. S., Hacker, E., Antunes, C. A., Weerasekera, D., Dias, A. A., Martins, C. A., Hirata Jr, R., Santos, K. R. N. D., Burkovski, A. e Mattos-Guaraldi, A. L. (2016) Pathogenic properties of a *Corynebacterium diphtheriae* strain isolated from a case of osteomyelitis. *Journal of Medical Microbiology*, v. 65, n. 11, p. 1311–1321.
- Peixoto, R. S., Antunes, C. A., Lourêdo, L. S., Viana, V. G., Dos Santos, C. S., Silva, J. F. R. da, Hirata Jr, R., Hacker, E., Mattos-Guaraldi, A. L. e Burkovski, A. (2017) Functional characterization of the collagen-binding protein DIP2093 and its influence on host-pathogen interaction and arthritogenic potential of *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbiology (Reading, England)*, v. 163, n. 5, p. 692–701.
- Prados-Rosales, R., Brown, L., Casadevall, A., Montalvo-Quirós, S. e Luque-Garcia, J. L. (2014a) Isolation and identification of membrane vesicle-associated proteins in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *MethodsX*, v. 1, p. 124–129.
- Prados-Rosales, R., Weinrick, B. C., Piqué, D. G., Jacobs Jr, W. R., Casadevall, A. e Rodriguez, G. M. (2014b) Role for Mycobacterium tuberculosis Membrane Vesicles in Iron Acquisition. *Journal of Bacteriology*, v. 196, n. 6, p. 1250–1256.
- Prados-Rosales, R., Carreño, L. J., Batista-Gonzalez, A., Baena, A., Venkataswamy, M. M., Xu, J., Yu, X., Wallstrom, G., Magee, D. M., LaBaer, J., Achkar, J. M., Jacobs Jr, W. R., Chan, J., Porcelli, S. A. e

- Casadevall, A. (2014c) Mycobacterial Membrane Vesicles Administered Systemically in Mice Induce a Protective Immune Response to Surface Compartments of Mycobacterium tuberculosis. *mBio*, v. 5, n. 5, p. e01921-14.
- Rappuoli, R.; Malito, E. (2014) History of Diphtheria Vaccine Development. Em: BURKOVSKI, A. (Ed.). *Corynebacterium diphtheriae and Related Toxigenic Species*. Dordrecht: Springer Netherlands, p. 225–238.
- Resch, U., Tsatsaronis, J. A., Le Rhun, A., Stübiger, G., Rohde, M., Kasvandik, S., Holzmeister, S., Tinnefeld, P., Wai, S. N., e Charpentier, E. (2016) A Two-Component Regulatory System Impacts Extracellular Membrane-Derived Vesicle Production in Group A Streptococcus. *mBio*, v. 7, n. 6, p. e00207-16.
- Rivera, J., Cordero, R. J. B., Nakouzi, A. S., Frases, S., Nicola, A. e Casadevall, A. (2010) *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 44, p. 19002–19007.
- Roier, S., Zingl, F. G., Cakar, F., Durakovic, S., Kohl, P., Eichmann, T. O., Klug, L., Gadermaier, B., Weinzerl, K., Prassl, R., Lass, A., Daum, G., Reidl, J., Feldman, M. F. e Schild, S. (2016) A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *Nature Communications*, v. 7, n. 1, p. 10515.
- Rosenqvist, E., Høiby, E. A., Wedege, E., Bryn, K., Kolberg, J., Klem, A., Rønnild, E., Bjune, G. e Nøkleby, H. (1995) Human antibody responses to meningococcal outer membrane antigens after three doses of the Norwegian group B meningococcal vaccine. *Infection and Immunity*, v. 63, n. 12, p. 4642–4652.
- Sabbadini, P. S., Assis, M. C., Trost, E., Gomes, D. L. R., Moreira, L. O., Dos Santos, C. S., Pereira, G. A., Nagao, P. E., Azevedo, V. A. C., Hirata Júnior, R., Dos Santos, A. L. S., Tauch, A. e Mattos-Guaraldi, A. L. (2012) *Corynebacterium diphtheriae* 67-72p hemagglutinin, characterized as the protein DIP0733, contributes to invasion and induction of apoptosis in HEp-2 cells. *Microbial Pathogenesis*, v. 52, n. 3, p. 165–176.
- Schmitt, M. P. e Holmes, R. K. (1991) Iron-dependent regulation of diphtheria toxin and siderophore expression by the cloned *Corynebacterium diphtheriae* repressor gene *dtxR* in *C. diphtheriae* C7 strains. *Infection and Immunity*, v. 59, n. 6, p. 1899–1904.
- Schrempf, H., Koebsch, I., Walter, S., Engelhardt, H. e Meschke, H. (2011) Extracellular *Streptomyces* vesicles: amphorae for survival and defence. *Microbial Biotechnology*, v. 4, n. 2, p. 286–299.
- Schröder, J. (2024) Discovery of natural bispecific antibodies: Is psoriasis induced by a toxigenic *Corynebacterium simulans* and maintained by CIDAMPS as autoantigens? *Experimental Dermatology*, v. 33, n. 1, p. e15014.
- Schulz, E., Goes, A., Garcia, R., Panter, F., Koch, M., Müller, R., Fuhrmann, K. e Fuhrmann, G. (2018) Biocompatible bacteria-derived vesicles show inherent antimicrobial activity. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, v. 290, p. 46–55.
- Sharma, N. C., Efstratiou, A., Mokrousov, I., Mutreja, A., Das, B. e Ramamurthy, T. (2019) Diphtheria. *Nature Reviews. Disease Primers*, v. 5, n. 1, p. 81.
- Sierra, G. V., Campa, H. C., Varcacel, N. M., Garcia, I. L., Izquierdo, P. L., Sotolongo, P. F., Casanueva, G. V., Rico, C. O., Rodriguez, C. R. e Terry, M. H. (1991) Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH annals*, v. 14, n. 2, p. 195–207; discussion 208-210.
- Skogen, V., Jenum, P. A., Danilov, E., Korolev, V. N., Halvorsen, D. S. e Sjursen, H. (2000) Immunity to diphtheria among children in Northern Norway and North-Western Russia. *Vaccine*, v. 19, n. 2–3, p. 197–203.

- Slauch, J. M. (2011) How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. *Molecular Microbiology*, v. 80, n. 3, p. 580–583.
- Starnes, C. O. (1992) Coley's toxins. *Nature*, v. 360, n. 6399, p. 23.
- Storz, G., Tartaglia, L. A., Farr, S. B. e Ames, B. N. (1990) Bacterial defenses against oxidative stress. *Trends in genetics: TIG*, v. 6, n. 11, p. 363–368.
- Surve, M. V., Anil, A., Kamath, K. G., Bhutda, S., Sthanam, L. K., Pradhan, A., Srivastava, R., Basu, B., Dutta, S., Sen, S., Modi, D. e Banerjee, A. (2016) Membrane Vesicles of Group B Streptococcus Disrupt Feto-Maternal Barrier Leading to Preterm Birth. *PLOS Pathogens*, v. 12, n. 9, p. e1005816.
- Tavano, R., Franzoso, S., Cecchini, P., Cartocci, E., Oriente, F., Aricò, B. e Papini, E. (2009) The membrane expression of *Neisseria meningitidis* adhesin A (NadA) increases the proimmune effects of *MenB* OMVs on human macrophages, compared with NadA– OMVs, without further stimulating their proinflammatory activity on circulating monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 86, n. 1, p. 143–153.
- Thay, B.; Wai, S. N.; Oscarsson, J. (2013) Staphylococcus aureus α -Toxin-Dependent Induction of Host Cell Death by Membrane-Derived Vesicles. *PLoS ONE*, v. 8, n. 1, p. e54661.
- Tiley, S. M., Kociuba, K. R., Heron, L. G. e Munro, R. (1993) Infective Endocarditis Due to Nontoxicogenic *Corynebacterium diphtheriae*: Report of Seven Cases and Review. *Clinical Infectious Diseases*, v. 16, n. 2, p. 271–275.
- Trost, E., Ott, L., Schneider, J., Schröder, J., Jaenicke, S., Goesmann, A., Husemann, P., Stoye, J., Dorella, F. A., Rocha, F. S., Soares, S. de C., D'Afonseca, V., Miyoshi, A., Ruiz, J., Silva, A., Azevedo, V., Burkovski, A., Guiso, N., Join-Lambert, O. F., Kayal, S. e Tauch, A. (2010) The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene-regulatory networks contributing to virulence. *BMC Genomics*, v. 11, n. 1, p. 728.
- Tzipilevich, E.; Habusha, M.; Ben-yehuda, S. (2017) Acquisition of Phage Sensitivity by Bacteria through Exchange of Phage Receptors. *Cell*, v. 168, n. 1–2, p. 186–199.e12.
- Valdez, A. F., Souza, T. N., Bonilla, J. J. A., Zamith-Miranda, D., Piffer, A. C., Araujo, G. R. S., Guimarães, A. J., Frases, S., Pereira, A. K., Fill, T. P., Estevao, I. L., Torres, A., Almeida, I. C., Nosanchuk, J. D. e Nimrichter, L. (2023) Traversing the Cell Wall: The Chitinolytic Activity of *Histoplasma capsulatum* Extracellular Vesicles Facilitates Their Release. *Journal of Fungi*, v. 9, n. 11, p. 1052.
- Vidal, V. M. (2019) Resposta Imunitária inata contra o *Corynebacterium diphtheriae*. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Inflamação) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 190f.
- Vimr, E. R. (1994) Microbial sialidases: does bigger always mean better? *Trends in Microbiology*, v. 2, n. 8, p. 271–277.
- Wagner, K. S., White, J. M., Crowcroft, N. S., De Martin, S., Mann, G. e Efstratiou, A. (2010) Diphtheria in the United Kingdom, 1986–2008: the increasing role of *Corynebacterium ulcerans*. *Epidemiology and Infection*, v. 138, n. 11, p. 1519–1530.
- Wang, X., Thompson, C. D., Weidenmaier, C. e Lee, J. C. (2018) Release of Staphylococcus aureus extracellular vesicles and their application as a vaccine platform. *Nature Communications*, v. 9, n. 1, p. 1379.
- Wedge, E., Bolstad, K., Aase, A., Herstad, T. K., McCallum, L., Rosenqvist, E., Oster, P. e Martin, D. (2007) Functional and specific antibody responses in adult volunteers in new zealand who were given one of two different meningococcal serogroup B outer membrane vesicle vaccines. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, v. 14, n. 7, p. 830–838.

Weinberg, J. B. (1998) Nitric Oxide Production and Nitric Oxide Synthase Type 2 Expression by Human Mononuclear Phagocytes: A Review. *Molecular Medicine*, v. 4, n. 9, p. 557–591.

Welsh, J. A., Goberdhan, D. C. I., O'Driscoll, L., Buzas, E. I., Blenkiron, C., Bussolati, B., Cai, H., Di Vizio, D., Driedonks, T. A. P., Erdbrügger, U., Falcon-Perez, J. M., Fu, Q.-L., Hill, A. F., Lenassi, M., Lim, S. K., Mahoney, M. G., Mohanty, S., Möller, A., Nieuwland, R., Ochiya, T., Sahoo, S., Torrecilhas, A. C., Zheng, L., Zijlstra, A., Abuelreich, S., Bagabas, R., Bergese, P., Bridges, E. M., Brucale, M., Burger, D., Carney, R. P., Cocucci, E., Crescitelli, R., Hanser, E., Harris, A. L., Haughey, N. J., Hendrix, A., Ivanov, A. R., Jovanovic-Taliman, T., Kruh-Garcia, N. A., Faustino, V. K.-L., Kyburz, D., Lässer, C., Lennon, K. M., Lötvall, J., Maddox, A. L., Martens-Uzunova, E. S., Mizenko, R. R., Newman, L. A., Ridolfi, A., Rohde, E., Rojalín, T., Rowland, A., Saftics, A., Sandau, U. S., Saugstad, J. A., Shekari, F., Swift, S., Ter-Ovanesyan, D., Tosar, J. P., Useckaite, Z., Valle, F., Varga, Z., van der Pol, E., van Herwijnen, M. J. C., Wauben, M. H. M., Wehman, A. M., Williams, S., Zendrini, A., Zimmerman, A. J., MISEV Consortium, Théry, C. and Witwer, K. W. (2024) Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *Journal of Extracellular Vesicles*, v. 13, n. 2, p. e12404.

Wenzel, E. V., Bosnak, M., Tierney, R., Schubert, M., Brown, J., Dübel, S., Efstratiou, A., Sesardic, D., Stickings, P. e Hust, M. (2020) Human antibodies neutralizing diphtheria toxin in vitro and in vivo. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 571.

Will, R. C., Ramamurthy, T., Sharma, N. C., Veeraraghavan, B., Sangal, L., Haldar, P., Pragasam, A. K., Vasudevan, K., Kumar, D., Das, B., Heinz, E., Melnikov, V., Baker, S., Sangal, V., Dougan, G., Mutreja, A. (2021) Spatiotemporal persistence of multiple, diverse clades and toxins of *Corynebacterium diphtheriae*. *Nature Communications*, v. 12, n. 1, p. 1500.

Winter, J., Letley, D., Rhead, J., Atherton, J. e Robinson, K. (2014) *Helicobacter pylori* Membrane Vesicles Stimulate Innate Pro- and Anti-Inflammatory Responses and Induce Apoptosis in Jurkat T Cells. *Infection and Immunity*, v. 82, n. 4, p. 1372–1381.

Witwer, K. W.; Wolfram, J. Extracellular vesicles versus synthetic nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Materials*, v. 6, n. 2, p. 103–106, 7 jan. 2021.

OMS (2018) Organização Mundial de Saúde. Diphtheria vaccine: WHO position paper, August 2017 – Recommendations. *Vaccine*, v. 36, n. 2, p. 199–201.

Xie, J., Li, Q., Haesebrouck, F., Van Hoecke, L., e Vandembroucke, R. E. (2022) The tremendous biomedical potential of bacterial extracellular vesicles. *Trends in Biotechnology*, v. 40, n. 10, p. 1173–1194.

Yerneni, S. S., Werner, S., Azambuja, J. H., Ludwig, N., Eutsey, R., Aggarwal, S. D., Lucas, P. C., Bailey, N., Whiteside, T. L., Campbell, P. G., Hiller, N. L. (2021) Pneumococcal Extracellular Vesicles Modulate Host Immunity. *mBio*, v. 12, n. 4, p. e01657-21.

Zakikhany, K.; Efstratiou, A. (2012) Diphtheria in Europe: current problems and new challenges. *Future Microbiology*, v. 7, n. 5, p. 595–607.