

**STEFANIE CAMARGO DA COSTA**

**EMPACOTAMENTO DE GENES DE RESISTÊNCIA AOS  
ANTIMICROBIANOS EM VESÍCULAS EXTRACELULARES PRODUZIDAS  
POR BACTÉRIAS RECUPERADAS DE ÁGUAS COSTEIRAS**



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

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO  
JANEIRO / 2023**

**Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Renata Cristina Picão e co-orientação de Roberto Guardatti Gambine Moreira.**

## CIP - Catalogação na Publicação

C816e Camargo da Costa, Stefanie  
EMPACOTAMENTO DE GENES DE RESISTÊNCIA AOS  
ANTIMICROBIANOS EM VESÍCULAS EXTRACELULARES  
PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS RECUPERADAS DE ÁGUAS  
COSTEIRAS / Stefanie Camargo da Costa. -- Rio de  
Janeiro, 2023.  
60 f.

Orientadora: Renata Cristina Picão.  
Coorientador: Roberto Guardatti Gambine Moreira.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto  
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia, 2023.

1. genes de resistência. 2. bactérias  
multirresistentes. 3. vesículas de membrana  
extracelular. 4. RAM. 5. GRA. I. Picão, Renata  
Cristina, orient. II. Guardatti Gambine Moreira,  
Roberto, 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: **Stefanie Camargo da Costa**  
 DRE: 119060149

BANCA EXAMINADORA: Profa. Eliane de Oliveira Ferreira (Presidente)  
 Profa. Joana Montezano Marques  
 M.Sc. Isadora Silva Barcellos  
 Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius (Suplente)

Título da Monografia: **“Empacotamento de genes de resistência aos antimicrobianos em vesículas extracelulares produzidas por bactérias recuperadas de águas costeiras”**

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/ssq-jaom-vob?hs=224>

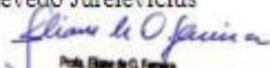
Data e hora de início: **13 de janeiro de 2023 às 10:00h**

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 9,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.


Rio de Janeiro, 13 ..... de ..... Janeiro..... de 2023.

NOTA	Banca Examinadora:
<u>9,0</u>	Profa. Eliane de Oliveira Ferreira
<u>9,0</u>	Profa. Joana Montezano Marques
<u>9,0</u>	M.Sc. Isadora Silva Barcellos
_____	Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius

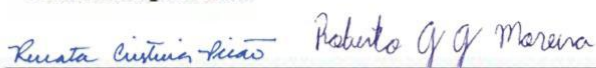
Presidente da banca \_\_\_\_\_

  
 Profa. Eliane de Oliveira Ferreira

Aluno: \_\_\_\_\_

  
 Stefanie Camargo da Costa

Orientador: \_\_\_\_\_

  
 Profa. Renata Cristina Picão / Coorientador: M.Sc. Roberto Guardatti Gambine Moreira

Coordenador  
 de TCC \_\_\_\_\_

  
 Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus orixás e ancestrais, que zelam pelos meus caminhos, que permitiram que cada passo fosse dado em seu resguardo até o presente momento, iluminando meus caminhos e me reerguendo nas batalhas da vida. Eshú é caminho, laroyê eshú, eshú é mojubá!

Aos meus pais que permitiram que eu trilhasse o caminho certo para alcançar os meus sonhos, à minha irmã que sempre esteve comigo, sendo exemplo, inspiração, parceira e alicerce. Ao meu sobrinho e afilhado Davi, por ter me dado tanta alegria neste período, vocês são a minha base.

À minha namorada e futura esposa Luiza, por todo o apoio nessa jornada, por ter me acompanhado, acreditado em mim, por toda a admiração, carinho, cuidado e parceria. Você é a mulher mais linda, amável, inspiradora, forte, caridosa, obrigada por tudo, eu te amo sem limites meu raio de sol.

Aos meus amigos Pedro, Bela, Vini, Renan, Matheus, Art, Ralice e Dudu, vocês foram tudo de mais incrível que me aconteceu na graduação, chegamos juntos e continuaremos juntos, formamos uma família sólida, feliz, diversa e amorosa, vocês são o sinônimo de amor e alegria para mim.

À minha orientadora, Renata Cristina Picão, cujo agradecimento é infundável. Obrigada por toda a confiança depositada em mim neste processo, por me acolher, por partilhar tanto conhecimento, pelo tempo investido, pelas risadas e pelo direcionamento, levarei tudo isso sempre em meu caminho.

Ao meu coorientador, mestre, amigo, colega temporário de apartamento Roberto Guardatti Gambine Moreira, sem você não teria chegado até aqui. Acredito que o nosso encontro foi uma das coincidências mais felizes da vida, nossa troca, partilha de horas infinitas de trabalho, inúmeras risadas, transmissões de pensamento, músicas, foram incríveis e levarei sempre comigo. Obrigada por toda a dedicação, suporte e carinho ao me coorientar.

Ao Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica, agradeço por todo o conhecimento compartilhado, por a base e suporte oferecido nessa jornada, vocês foram fundamentais.

À UFRJ, meu sonho mais almejado, segunda casa, símbolo de resistência e coragem, agradeço por tudo que me proporcionou, pelas experiências que nunca imaginei viver, por todo o conhecimento e sua maestria, sou filha da Minerva com orgulho!

Ao Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes agradeço o ambiente científico, a troca e a oportunidade de me formar acima de tudo, cientista.

Aos órgãos de fomento CNPq e FAPERJ, agradeço o financiamento que tornou viável a realização deste trabalho.

Muito obrigada a todos que fizeram parte da minha jornada!

**RESUMO****STEFANIE CAMARGO DA COSTA****EMPACOTAMENTO DE GENES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS  
EM VESÍCULAS EXTRACELULARES PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS  
RECUPERADAS DE ÁGUAS COSTEIRAS****Orientadora: Renata Cristina Picão****Coorientador: Roberto Guardatti Gambine Moreira**

**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.**

A disseminação da resistência aos antimicrobianos (RAMs) aumenta a morbidade e letalidade das infecções, dificultando seu tratamento. Em espécies de bactérias gram-negativas a propagação desses genes tem afetado a eficácia de diversos antimicrobianos. A RAM emerge principalmente nas instituições de saúde, mas as bactérias resistentes não estão restritas a esses ambientes. A aquisição de genes de resistência aos antimicrobianos (GRAs) se deve a três principais mecanismos: conjugação, transdução e transformação. Porém, recentemente, foi descrita a aquisição de GRAs mediada por vesículas extracelulares (VEs), a vesidução. Estas estruturas são constituídas a partir da membrana celular, e podem empacotar uma ampla gama de moléculas do periplasma e citoplasma bacterianos. Embora alguns estudos tenham confirmado a atuação de VEs na transferência de GRAs em condições laboratoriais, o empacotamento de genes que conferem mecanismos de resistência considerados de alto risco para a saúde humana permanece pouco explorado. O objetivo do presente trabalho avaliar se VEs extraídas de bactérias coletadas do ambiente aquático são carreadoras de GRA. Para isso, foram estudadas cepas bacterianas previamente caracterizadas, isoladas de águas costeiras recreativas, portadoras de GRAs mediados por plasmídeos. Foram incluídas na coleção do

estudo cepas resistentes aos carbapenemas pela produção de carbapenemases, incluindo *Enterobacter kobei* FL23, *Klebsiella pneumoniae* ST11-FLC262, *Citrobacter werkmanii* IncQ - LB887; e uma cepa resistente à polimixina pela produção de *mcr*, *Escherichia coli* ST683/CC155 - JP24. A extração de VEs foi realizada a partir de crescimento em meio sólido submetido a ultracentrifugações em PBS, e filtração por membranas com 0,45 micrômetros de poro, para garantir a retenção de células remanescentes. O material foi visualizado por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET), demonstrou a presença de filamentos proteicos e bacteriófagos interagindo com a amostra. A análise do tamanho da população de vesículas foi realizada por rastreamento de nanopartículas (NTA -Nanoparticle Tracking Analysis), cujo resultado demonstrou vesículas entre 100nm a 400nm. A presença de GRAs e dos grupos de incompatibilidade plasmidial dos replicons que carregam esses genes foram pesquisados por meio da técnica de PCR antes e depois do tratamento das VEs com proteinase K e DNase. Os resultados apontaram para a presença dos genes de incompatibilidade plasmidial IncX3, IncU, IncX4, IncI1, IncQ1, IncA e IncR e dos genes *bla*<sub>NDM-1</sub> e *mcr-1*.

**Palavras-chave:** genes de resistência, bactérias multirresistentes, vesículas de membrana extracelular, RAMs, GRAs.



**ABSTRACT****STEFANIE CAMARGO DA COSTA****PESQUISA DO EMPACOTAMENTO DE GENES DE RESISTÊNCIA AOS  
ANTIMICROBIANOS EM VESÍCULAS EXTRACELULARES PRODUZIDAS  
POR BACTÉRIAS RECUPERADAS DE ÁGUAS COSTEIRAS****Orientadora: Renata Cristina Picão****Coorientador: Roberto Guardatti Gambine Moreira**

**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.**

The spread of antimicrobial resistance (AMRs) increases the morbidity and lethality of complications, making their treatment difficult. In gram-negative bacterial species these genes have affected the effectiveness of several antimicrobials. AMR emerges primarily in healthcare institutions, but resistant bacteria are not restricted to these environments. Such spread can have consequences for human and animal health and therefore deserves further investigation. The ability to acquire antimicrobial resistance genes (ARGs) must have three main mechanisms: conjugation, transduction and transformation. However, the acquisition of ARGs mediated by extracellular vesicles (EVs), a process named “vesiduction” was recently described. These structures originate from the cell membrane, and can package a wide range of substances from the bacterial periplasm or cytoplasm. Although some studies have confirmed the role of EVs in transferring ARGs under laboratory conditions their role in an aquatic environment is still unexplored. Therefore, our hypothesis is that vesicular transport is an important mechanism for the transfer of ARGs in the aquatic environment, due to the delivery capacity even when there is no close contact between donors and recipients. The objective of the present work is to test a solid medium extraction methodology to assess whether EVs extracted from bacteria collected from the aquatic environment package ARGs in vitro. For this, the strains *Enterobacter kobei* FL23, *Klebsiella pneumoniae* ST11-FLC262, *Escherichia coli* ST683/CC155 - JP24 and

*Citrobacter werkmanii* IncQ - LB887 were incubated to obtain their respective EVs. The extraction of EVs was performed from growth in solid medium subjected to ultracentrifugation in PBS, and filtration through membranes with 0.45 micrometers of pore, to ensure the retention of remaining cells. The material was visualized by transmission electron microscopy (TEM), demonstrating the presence of protein filaments and bacteriophages interacting with the sample. The analysis of the size of the population of vesicles was performed by tracking nanoparticles (NTA -Nanoparticle Tracking Analysis), whose result showed vesicles between 100nm and 400nm. The presence of GRAs and the plasmid incompatibility groups of the replicons that carry these genes were investigated using the PCR technique before and after the treatment of EVs with proteinase K and DNase. The results pointed to the presence of the plasmid incompatibility genes IncX3, IncU, IncX4, IncI1, IncQ1, IncA and IncR and the blaNDM-1 and mcr-1 genes.

**Key words:** resistance genes, multiresistant bacteria, extracellular membrane vesicles, RAMs, GRAs.

**RESUMO PARA LEIGOS****STEFANIE CAMARGO DA COSTA****PESQUISA DO EMPACOTAMENTO DE GENES DE RESISTÊNCIA AOS  
ANTIMICROBIANOS EM VESÍCULAS EXTRACELULARES PRODUZIDAS  
POR BACTÉRIAS RECUPERADAS DE ÁGUAS COSTEIRAS****Orientador: Renata Cristina Picão****Coorientador: Roberto Guardatti Gambine Moreira**

**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.**

Faz parte de nosso cotidiano conviver com bactérias em múltiplos ambientes, como em hospitais, na agricultura, no meio aquático e muitos outros, através dessa interação boa parte dessas células é responsável por causar infecções e agravamento de quadros clínicos na medicina humana e veterinária. Dentro desse contexto, sabe-se que estes microrganismos são capazes de resistir ao tratamento com antibióticos, compostos utilizados para tratar o surgimento de infecções no organismo. O surgimento dessa resistência está associado principalmente a sua prescrição exacerbada na clínica, posologia incorreta e no despejo indiscriminado dos compostos em redes de água e esgoto. Porém, para se tornarem resistentes é necessário que os microrganismos adquiram essa resistência, e isso ocorre através da aquisição de plasmídeos contendo essa multirresistência. O estudo no último reservatório da resistência apontado, o meio aquático, ainda é pouco explorado em termos de propagação da resistência quando o assunto é a transferência horizontal de genes (THG). A THG funciona de forma similar a um jogo, quando o personagem evolui ao passar de fase adquirindo maior destreza para burlar os desafios. Seguindo o raciocínio, a bactéria se torna o personagem, os antibióticos são os desafios que ela precisa ultrapassar, a resistência é a destreza adquirida para que a mesma consiga se multiplicar e a transferência horizontal de genes é o mecanismo utilizado para que a aquisição do gene de resistência ocorra. Para adquirir essa resistência, a

bactéria utiliza de variadas técnicas, similar ao uso de manobras para atingir o objetivo de forma mais prática dentro do jogo. Essas técnicas são nomeadas como transformação, transdução, conjugação e recentemente foi descrito o processo de vesidução. O processo de vesidução consiste na entrega de material genético através de vesículas extracelulares. Pode-se associar o processo a aquisição de um bônus ou presente que um parceiro te entrega para que você fique mais potente no jogo sem que seja necessária a interação direta entre os jogadores. Em meio aquático, o processo de vesidução se mostra bastante vantajoso, por realizar a entrega de forma protegida e direcionada, como se o presente entregue no jogo tivesse uma embalagem super bacana e chegasse de forma extremamente veloz, por isso focamos em investigar o processo neste meios específico. No presente trabalho o processo de vesidução foi investigado em quatro tipos de bactérias provenientes da água do mar isoladas pelo nosso laboratório, devido a ausência da descrição do processo em relação a estes microrganismos na literatura. Na investigação descobrimos que, o empacotamento dos genes de resistência através de vesículas extracelulares realmente acontece entre as bactérias sendo uma possibilidade posterior a aquisição de resistência pelas cepas, muitos filamentos de proteínas e bacteriófagos foram vistos fazendo parte e interagindo com as amostras analisadas, demonstrando ser um processo muito importante em meio aquático devido à instabilidade e alcance do meio em questão, abrindo questionamento acerca da disseminação da resistência através deste mecanismo.

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ATP - Adenosina Trifosfato

BCA - Aminoácido de cadeia ramificada

BGN - Bactérias gram-negativas

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças

COVID-19 - Doença infecciosa causada pelo vírus SARS-CoV-2.

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

GES -  $\beta$ -lactamase da família *Guiana extended spectrum*.

GRA - Genes de resistência aos antimicrobianos

GTP - Trifosfato de Guanosina

KPC - *Carbapenemase de Klebsiella pneumoniae*

LPS - Lipopolissacarídeo

MCR - Resistência móvel a colistina

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

NDM - *Metallo- $\beta$ -lactamase de Nova Déli*

NTA - Rastreador de nanopartículas

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - Salina tamponada com fosfato

PCR - Reação em cadeia da polimerase

RAM - Resistência aos antimicrobianos

RNA - Ácido ribonucleico

THG - Transferência horizontal de genes

TSA - Ágar tripticase de soja

UFC - Unidades formadoras de colônias

VE - Vesículas extracelulares

## ÍNDICE

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	viii
RESUMO PARA LEIGOS .....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Bactérias e a questão da resistência .....	14
1.2 Mecanismos de disseminação da resistência .....	17
1.3 Vesículas extracelulares .....	19
1.4 Vesículas extracelulares e a disseminação de RAM .....	22
2. JUSTIFICATIVA .....	25
3. OBJETIVOS .....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	26
4.1 Cepas utilizadas .....	26
4.2 Condições para a extração de VEs de bactérias gram-negativas.....	27
4.3 Obtenção de VEs.....	27
4.4 Quantificação e caracterização vesicular .....	26
4.5 Purificação dos extraídos vesiculares.....	27
4.6 Quantificação de proteínas e remoção de DNA extravesicular.....	28
4.7 Remoção de bacteriófagos e DNA extravesicular.....	29
4.8 Pesquisa de GRA e marcadores plasmidiais.....	29
5. Resultados.....	30
5.1 Análises das frações vesiculares extraídas das bactérias em estudo.....	30
5.1.1 <i>Enterobacter kobei</i> FL23.....	30
5.1.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> ST11-FL-C262 .....	31
5.1.3 <i>Escherichia coli</i> ST683/CC155 - JP24 .....	33
5.1.4 <i>Citrobacter werkmanii</i> IncQ - LB887.....	35
5.2 Remoção dos filamentos proteicos e bacteriófagos.....	37
5.2.1 <i>Enterobacter kobei</i> FL23 purificada com proteinase.....	38
5.2.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> ST11-FL-C262 purificada com iodixanol.....	40
5.2.3 <i>Escherichia coli</i> ST683/CC155 - JP24 purificada com proteinase.....	42
5.2.4 <i>Citrobacter werkmanii</i> IncQ - LB887 purificada com iodixanol.....	44
5.3 Quantificação de proteínas e DNA.....	46
5.4 Presença intravesicular de genes de resistência e grupos de incompatibilidade plasmidial.....	48
5.5 Presença de KPC, NDM e MCR .....	48
6. Discussão.....	49
7. Conclusão.....	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	55

## 01. Introdução

### 1.1 Bactérias e a questão da resistência

Bactérias são microrganismos unicelulares, procariontes, metabolicamente ativos, altamente adaptáveis às variações que ocorrem no meio, e com processos sofisticados para sua replicação e sobrevivência. Sua existência está amplamente difundida por todo o planeta, com vida livre ou parasitária. São apontados como uma das principais causas de doenças (Barão, 1996). Assim, medidas terapêuticas como o uso de antimicrobianos se fazem pertinentes para a manutenção da saúde. Estes medicamentos perturbam o metabolismo do agente infeccioso e são eficazes no combate de doenças (Habboush, Guzmán, 2022). No entanto, bactérias comumente alteram seus processos metabólicos em resposta à exposição aos antimicrobianos, o que possibilita a manutenção do patógeno e disseminação no meio em que está inserido (Livermore, 2003).

A resistência aos antimicrobianos (RAM) causa aumento da letalidade das infecções (Livermore, 2003) e é apontada como uma das principais ameaças à saúde pública, comprometendo a prevenção e tratamento de doenças ocasionadas por infecções bacterianas (Porooshat Dadgostar, 2019). Estudos apontam que o impacto econômico anual da RAM na Europa é da ordem de 900 milhões de Euros (Prestinaci, Pezzotti e Pantosti, 2015). Esse impacto está diretamente relacionado com uso de antibióticos mais caros, equipamentos especializados, maior permanência hospitalar e procedimentos de isolamento para os pacientes, tendo ainda os custos sociais que incluem a morte e perda de produtividade (Prestinaci, Pezzotti e Pantosti, 2015). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a projeção é que ocorra um grau de mortalidade superior a dez milhões de pessoas anualmente, em todo o mundo, até 2050, levando apenas a RAM em consideração caso não ocorram ações interventoras na evolução da resistência (WHO, 2017). Nos EUA, O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estimou mais de dois milhões de pessoas afetadas por infecções resistentes a antibióticos a cada ano, com pelo menos 23.000 morrendo como resultado da infecção (CDC, 2013). O Brasil é considerado entre os países da América Latina, um dos que apresenta os níveis mais elevados de resistência bacteriana para os principais patógenos, particularmente os bacilos gram-negativos (Andrade *et al*, 2008).

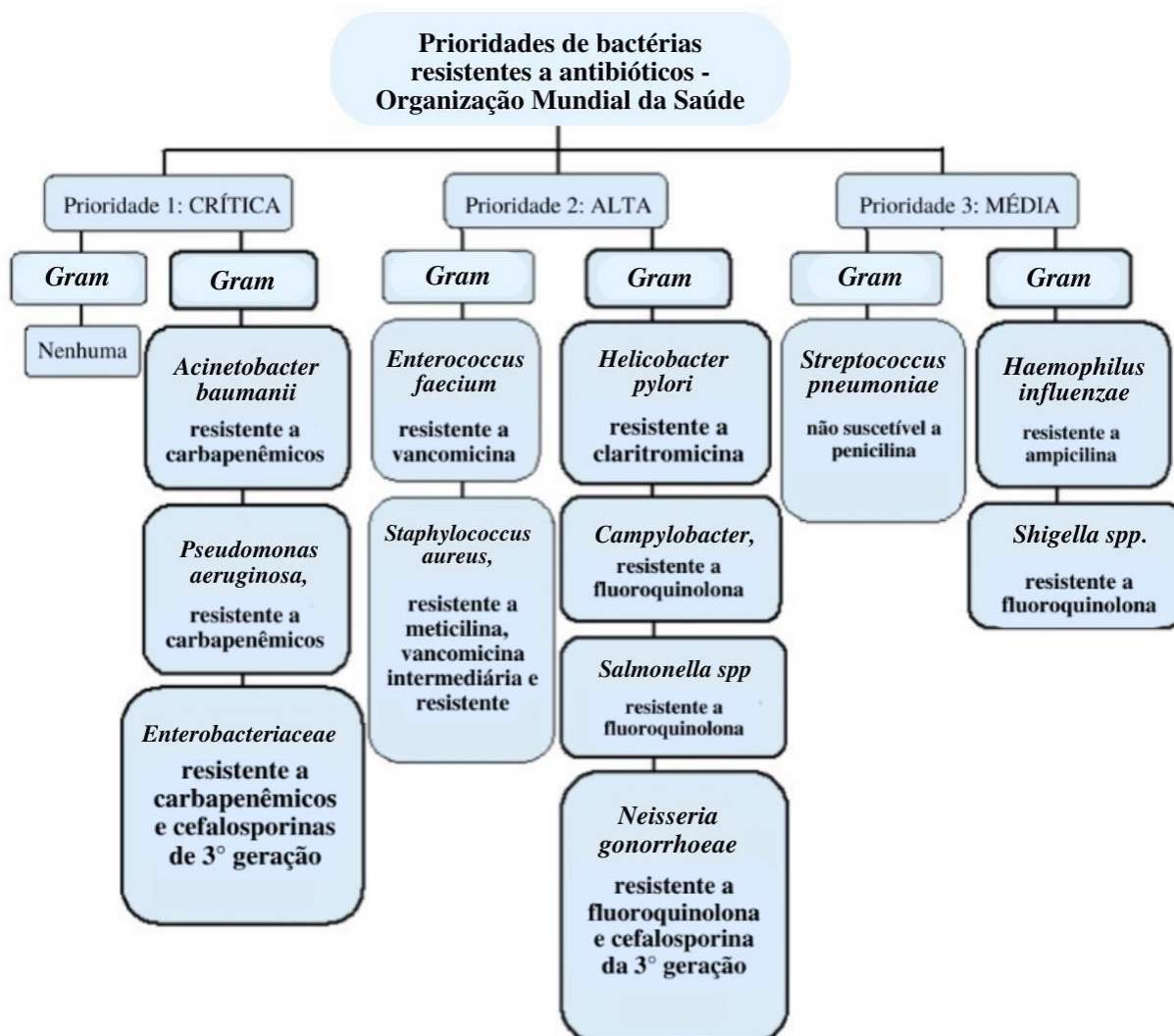
A acelerada evolução da resistência bacteriana relaciona-se diretamente com o uso de antimicrobianos (Laxminarayan, 2014). A utilização desses fármacos nas instituições de saúde, em grande quantidade e variedade, faz desses locais ambientes críticos para o acúmulo e

disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos (GRA) (Spellberg, 2018). Porém, essa utilização não ocorre somente na medicina humana, mas também em práticas agropecuárias na prevenção de infecções e na promoção do crescimento animal. (Van Boeckel *et al*, 2019). Além disso, o descarte indevido dessas substâncias também pode contribuir para a disseminação da RAM (De Man *et al.*, 2000; O’Neill, 2014). Como consequência, as bactérias resistentes não estão restritas às instituições saúde e podem afetar as esferas humana, ambiental e animal por outras vias de contaminação, aumentando também a morbidade e letalidade das infecções adquiridas fora do ambiente hospitalar (O’Neill 2014, WHO 2017a).

Bactérias gram-negativas (BGNs) foram classificadas pela Organização Mundial da Saúde (WHO) como patógenos prioritários por causa da RAM (Figura 1). Nesse grupo bacteriano a aquisição de maior variedade de GRAs é descrita e de forma mais frequente. Além disso, são bactérias que modulam e/ou alteram uma série de atributos cromossômicos como porinas, lipopolissacarídeos da membrana, sistemas de dois componentes, bombas de efluxo, e mesmo os alvos dos antimicrobianos nas células, resultando em resistência a diferentes classes de antimicrobianos (Lepe, Martínez, 2022).

Ainda é importante ressaltar a resistência a carbapenêmicos e polimixinas, ambas descritas como fármacos de último recurso. (Jeannot, Bolard e Plésiat, 2017; Nordmann, 2010). Atualmente, patógenos gram-negativos do gênero *Enterobacteriaceae* são descritos como altamente relevantes na disseminação da resistência a esses fármacos, cujos os mecanismos de resistência envolvem a expressão de enzimas KPC e NDM que clivam o anel betalactâmico dos carbapenêmicos; e genes *mcr*, que modificam o LPS impedindo a ação das polimixinas (Nordmann, 2010) (Dortet , Poirel e Nordmann 2014).





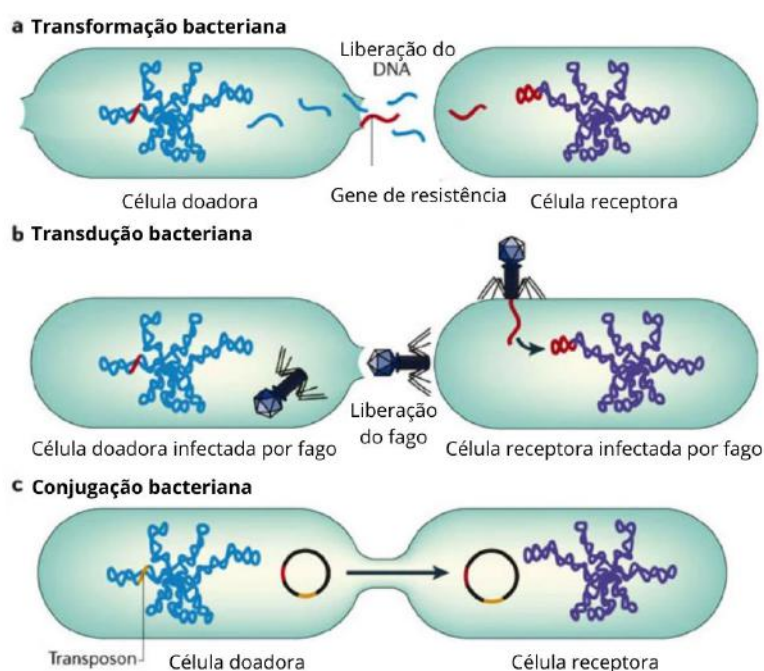
**Figura 1** - Patógenos prioritários no contexto da RAM segundo a classificação da Organização mundial de saúde. Imagem adaptada de Breijyeh, Jubeh e Karaman, 2020.

Matrizes aquáticas se destacam entre os ambientes de disseminação de RAMs (Dinesh *et al.* 2016). A disseminação de RAMs nesses ambientes já foi descrita por todo o mundo, como no Canadá (Dinesh *et al.* 2016), Sudeste da Ásia (Makkaew *et al.* 2021), EUA (Ahmed *et al.* 2018), Japão (Azuma *et al.* 2019), Sri Lanka (Guruge *et al.* 2021) e no Brasil, onde GRAs como *blaKPC*, *mcr*, e codificadores de carbapenemases tipo GES, NDM foram abundantemente encontrados em águas fluviais e costeiras urbanas do Rio de Janeiro (Paschoal *et al.* 2017).

Tendo em vista, a correlação do desenvolvimento da resistência com o metabolismo celular, é importante pontuar que a existência destes mecanismos é proveniente de alterações genéticas fruto de um processo evolutivo, podendo ocorrer por meio de mutações ou através da aquisição horizontal de genes (Livermore, 2003).

## 1.2 Mecanismos de disseminação da resistência

A capacidade de adquirir GRAs se dá por meio da ação de elementos genéticos móveis repassados por três mecanismos mais estudados: **transformação**, a absorção de DNA livre no ambiente; **conjugação**, dependente de plasmídeos que codificam a maquinaria necessária para se transferir; e **transdução**, que envolve a aquisição de DNA exógeno por meio da ação de bacteriófagos durante a infecção (Burmeister, 2015) (Figura 2). Todos podem ocorrer comumente no ambiente, sendo responsáveis por levarem ao acúmulo de GRAs (Stokes & Gillings 2011).



**Figura 2** - Transferência horizontal de genes entre bactérias. **a** | O processo de transformação ocorre a partir da liberação do DNA de um organismo que é em seguida reabsorvido por outro organismo. **b** | A transdução, consiste na transferência dos genes de resistência a antibióticos por meio de bacteriófagos. **c** | A conjugação ocorre por contato direto entre duas células bacterianas pelo pilus conjugativo. Adaptado de Furuya e De Lowy, 2006.

O processo de transformação foi descrito primeiramente por Fred Griffith em 1928. A descoberta propiciou a visualização da alteração fenotípica e do desenvolvimento das infecções a partir da capacidade de absorção de DNA, caracterizando o processo de transformação. A aquisição do DNA transformador do meio livre só acontece sob o estado de competência da célula bacteriana. O estado de competência consiste em um estado fisiológico específico da cepa que necessita da expressão das proteínas associadas ao processo, para que ocorra a

regulação da capacidade de transformação, restringindo o potencial da transformação como mecanismo de disseminação de resistência, as que possuem esse mecanismo naturalizado expressam um conjunto de proteínas dedicadas à captação que muitas vezes estão associadas a membrana externa da bactéria (Jhonston *et al*, 2014). Bactérias do gênero *Neisseria*, por exemplo, são descritas como naturalmente transformáveis, pois sintetizam suas proteínas de competência de forma constitutiva. O estado de competência nesse caso requer o funcionamento da maquinaria de biogênese associada ao *pili IV* e suas proteínas que captam o DNA exógeno, permitindo que o processo de transformação ocorra. Porém, para que a agregação do gene seja possível é necessário que o DNA passe pelo processo de circularização ou recombinação homóloga permitindo sua incorporação ao cromossomo (Aas *et al*, 2002).

A conjugação é um processo que requer o contato célula-célula mediado pelo pilus conjugativo, em caso de bactérias gram-negativas (Sørensen *et al*, 2005). Durante a interação, ocorre a transferência de DNA plasmidial da célula doadora para a receptora. Essa transferência ocorre em forma de fita simples, sendo reconvertida a fitas duplas nos citoplasmas tanto do doador quanto do receptor de maneira subsequente (Wozniak e Waldor, 2010). A maquinaria relaciona o seu funcionamento aos plasmídeos conjugativos e também aos elementos integrados ao genoma bacterianos promotores da conjugação (Wozniak e Waldor, 2010). O referido processo é o mais estudado entre as vias de disseminação da resistência, sendo também o mais vantajoso por realizar a transferência em ambiente estável e protegido do meio, demonstrando sua eficácia e facilidade na realização da transferência horizontal de genes (Wintersdorff *et al*, 2016).

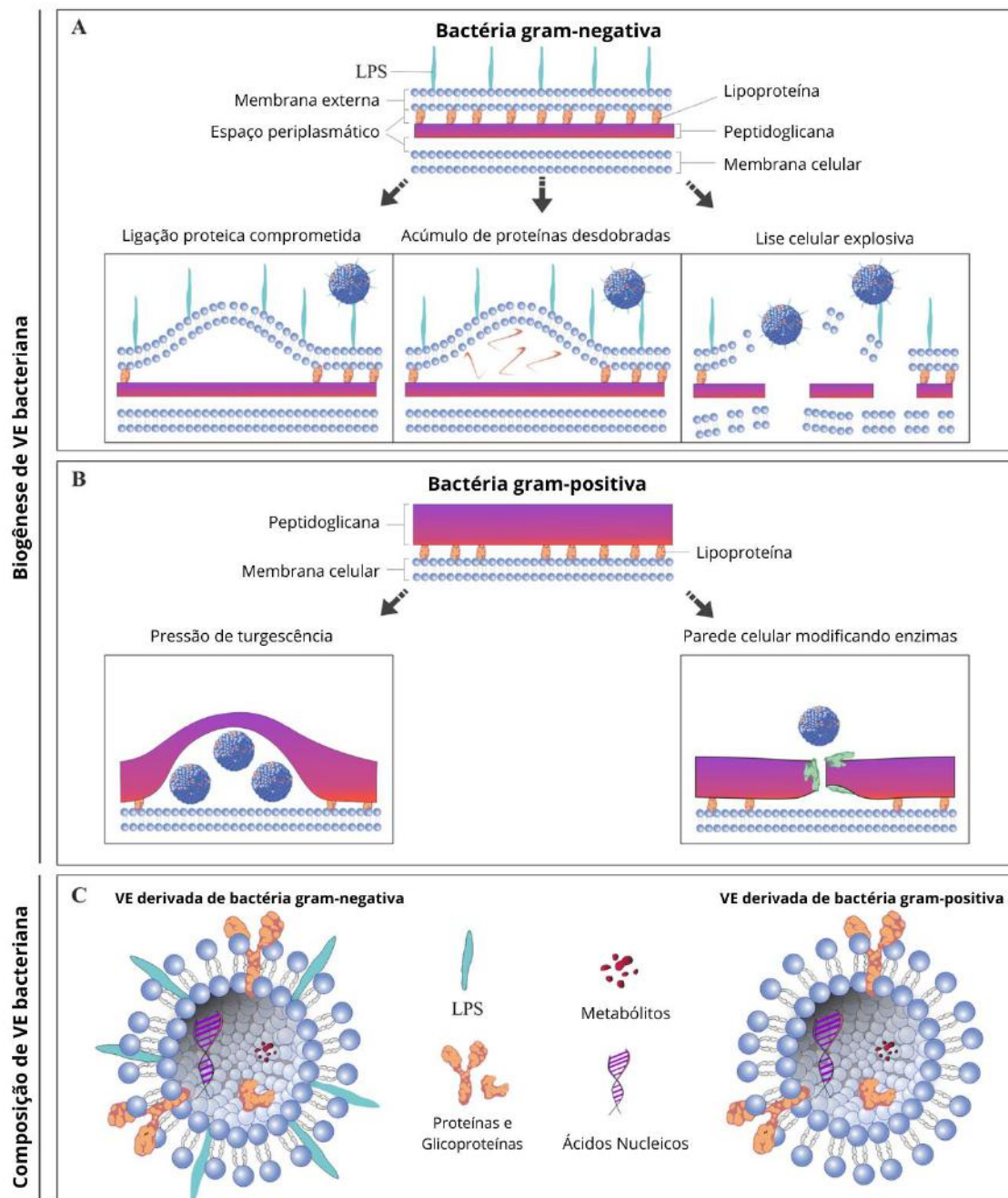
A transdução, é o mecanismo de transferência que exige a atuação de um bacteriófago carreador do gene de resistência durante o processo infeccioso (Schneider, 2017). Durante a infecção, os vírus podem realizar o empacotamento errôneo do DNA das respectivas bactérias hospedeiras envolvidas no processo, carreando os genes e transferindo-os para a próxima célula infectada (Schneider, 2017). A transferência de genes se dá por duas vias: i) especializada quando o bacteriófago realiza a integração do genoma viral ao cromossomo bacteriano e, ao final do processo infeccioso, retira fragmentos inseridos na região de ligação, ou ii) generalizada, quando a agregação de DNA bacteriano ao bacteriófago não é programada, ocorrendo de forma aleatória ou equivocada. Ambas as vias contribuem de forma eficaz para a disseminação da RAM (Brown-Jaque, Calero-Cáceres e Muniesa, 2015).

Os mecanismos descritos até agora são os mais explorados na literatura, porém não atuam com exclusividade na transferência horizontal de genes de resistência. A partir disso, é possível elucidar novos mecanismos de forte atuação no tema, dentre eles a atuação de vesículas de membrana que serão descritas a seguir (García-Aljaro, Ballesté e Muniesa, 2017; Liu, Thomsen e Olsen, 2021; Sun, 2018).

### **1.3 Vesículas extracelulares**

Vesículas extracelulares (VEs) são nanopartículas esféricas de caráter lipídico que medem entre 20 e 400 nm de diâmetro e, em seu processo de excisão, levam consigo características da membrana celular do organismo de origem (Toyofuku, Nomura e Eberl, 2019). VEs atuam de forma múltipla e abundante entre todos os extratos existentes nos domínios da vida, possuindo caráter patogênico ou comunicativo (Nasarabadi, Berleman e Auer, 2019). Sua nomenclatura pode ser especializada se relacionada com a célula originária de sua secreção: em caso de organismos eucarióticos denominam-se microvesículas ou exossomas e, em caso de procariotos, são comumente chamadas de VEs (Camussi *et al*, 2010; Deatheradge e Cookson, 2012).

Em bactérias gram-negativas, as VEs podem ser constituídas apenas pela membrana externa ou pela membrana interna e a camada de peptidoglicano (Toyofuku, Nomura e Eberl, 2019). Na caracterização destas vesículas (Figura 3) é possível observar proteínas e lipídeos formando uma bicamada em sua estrutura quando são vesículas de membrana externas, originárias da porção mais exterior da célula bacteriana. Em outro contexto, pode-se avaliar a existência de vesículas de membrana interna e externa, cujo a composição envolve as três camadas estruturais de bactérias gram negativas com duas camadas membranosas envolvendo a de peptidoglicano, sendo consideravelmente maiores que as outras vesículas de membrana (Pérez-Cruz *et al*, 2015).



**Figura 3 -** Biogênese, composição e funções do VE bacteriano. **A** | VEs derivadas de bactérias gram-negativas podem ser liberadas através da membrana externa (i) por ligações proteicas diminuídas entre a membrana externa e o peptidoglicano; (ii) por acúmulo de proteínas desdobradas e/ou fragmentos de peptidoglicano no espaço periplasmático gerando pressão de turgescência; e (iii) por lise celular explosiva. **B** | VEs derivadas de bactérias gram-positivas podem ser liberadas através da parede celular (i) pela pressão de turgescência causada pelo acúmulo de VEs; e (ii) pela ação de enzimas que degradam a parede celular. **C** | A composição bacteriana das VEs inclui uma dupla camada fosfolipídica, proteínas, glicoproteínas, metabólitos e ácidos nucleicos. As VEs gram-negativas diferenciam-se das VEs derivados de gram-positivos pela presença de LPS em sua superfície. **D** | VEs funcionam durante as interações entre bactérias ou células hospedeiras. VEs, vesículas extracelulares; LPS, lipopolisacáridos. Adaptado de Palomino *et al.*, 2021.

Dentre as vias de biogênese das vesículas, podemos citar o estímulo da sua formação a partir da modulação das ligações cruzadas entre a membrana externa e o peptidoglicano. Alguns estudos apontam o estímulo da vesiculação a partir da ausência da porina de membrana externa OmpA, com efeito inverso em sua presença. (Moon *et al.*, 2012; Deatherage *et al.*, 2009, Shewchheimer e Kuehn, 2015).

Estudos apontam grande diversidade acerca do conteúdo intravesicular e na modulação da produção, ambas as características são ocasionadas pelas condições do meio em que se encontram as bactérias (Bager *et al.*, 2013; Jasim *et al.*, 2018; Orench-Rivera e Kuehn, 2016). Dessa forma, é possível afirmar que o processo de vesiculação ocorre de maneira não-aleatória, determinando o caráter das vesículas envolvidas no processo (Guerrero-Mandujano *et al.*, 2017; Toyofuku, Nomura e Eberl, 2019).

A privação de aminoácidos e o uso de antimicrobianos também são fatores que estimulam a formação de vesículas, demonstrando que o desequilíbrio do meio pode induzir o surgimento de VEs (Kim JH, 2015). A explicação para este processo surge a partir de um resultado de renovação da parede celular, cuja origem surge na cadeia de peptidoglicano onde um turgor se originaria na membrana externa inchando-a e induzindo a formação de bolhas que originariam as VEs (Leah Zhou *et al.* 1998).

Referente ao uso de antimicrobianos, em vesículas produzidas sob exposição aos fármacos foi relatado um conteúdo proteico significativamente maior, não necessariamente atrelado à dimensão das vesículas, sugerindo um papel importante no carreamento de fatores de virulência por meio de processos envolvidos em choque séptico (JL Kadurugamuwa & J Beveridge 1995). Neste mesmo estudo, foi encontrado no interior de VEs frações referentes ao LPS, enzimas como fosfolipase C, proteases, hemolisinas e fosfatases alcalinas, sendo estes fatores que regularmente contribuem para a patogenicidade das infecções pelo gênero *Pseudomonas*. Em outro trabalho, há a descrição da entrega de  $\beta$ -lactamases mediada por vesículas, fator indicativo de um mecanismo de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em bastonetes gram-negativos (Ciofu *et al.* 2000, Schaar *et al.*, 2011, Devos *et al.*, 2015). A partir de ambas as pesquisas, acredita-se que através da localização periplasmática destas enzimas ocorra a contribuição para empacotamento das mesmas em VEs. Assim é possível concluir que as mesmas podem atingir certo potencial na contribuição do aumento temporário da RAM (Ciofu *et al.* 2000).

Também é possível associar a produção de VEs à partir da alteração do conteúdo lipídico de regiões da membrana externa (McMahon e Boucrot, 2015). Mesmo que não completamente elucidado é possível afirmar que o acúmulo de ácidos graxos com cadeias pares de carbono em áreas específicas da membrana externa pode propiciar regiões lipídicas mais favoráveis ao processo de vesiculação, fator que também pode estar associado aos tipos de ligação entre os ácidos graxos envolvidos, que quando em ligações menos estáveis podem facilitar a ocorrência do mecanismo (Shwechheimer, Rodriguez e Kuehn, 2015).

Outra via que demonstra o princípio do processo de vesiculação e está associada a via anterior aponta a curvatura da membrana externa entreposta por ligações proteicas à porção lipídica como influenciadora em potencial do processo. As ligações proteicas causam a expansão da porção externa ocasionando a curvatura da membrana pela diferença de tamanho entre as porções lipídicas (Shewchheimer, Rodriguez e Kuehn, 2015).

Há ainda uma via da biogênese cujo processo parece independer das modulações membranares acima exploradas. Sua ocorrência é descrita a partir da agregação de proteínas defectivas, moléculas de LPS disformes e fragmentos da peptidoglicana que favorecem a formação de um território estimulatório ao processo de vesiculação indicando estresse celular. (Shwechheimer, Rodriguez e Kuehn, 2014). Estudos reforçam a teoria da biogênese ao analisar o estímulo da vesiculação em culturas cujo fragmentos são mais abundantes no envoltório celular. Ainda assim seria necessário que o brotamento das vesículas nesta situação fosse facilitado pela redução de ligações proteicas e lipídicas entre a membrana externa e a camada de peptidoglicano (Shwechheimer, Rodriguez e Kuehn, 2015)

#### **1.4 VEs e a disseminação da RAM**

Analisando seu conteúdo e mecanismos de biogênese, é possível avaliar o papel de VEs na disseminação da resistência. Esses processos são realizados sem gasto de ATP/GTP, tornando-os bastante benéficos a partir da compreensão que vesículas são capazes de carrear moléculas solúveis e insolúveis a alvos distantes e de forma concentrada, protegida e direcionada (Adam Kulp e Meta J. Kuehn, 2010). Foi possível analisar o desenvolvimento de resistência à polimixina, antimicrobiano de último recurso, em *Pseudomonas syringae* após a adição de VEs ao meio de cultura, com origem provável a partir do sequestro da ligação antimicrobiana a vesículas, apontando seu potencial no papel transformante (Kulkarni *et al.* 2015).

O potencial de transformação das VEs é bem explorado, havendo comprovação da possibilidade do carregamento de DNA entre as bactérias. Tal processo foi identificado em cepas de *Neisseria gonorrhoeae*, onde as frações BI e BII de suas respectivas VEs continha DNAs lineares e circulares, além de proteínas de ligação ao DNA (Dorward *et al.* 1989;). Em *P. aeruginosa* as vesículas demonstraram a presença de LPS e várias enzimas como fosfolipase C, protease, hemolisina e fosfatase alcalina, conhecidas por atuarem na patogenicidade de infecções por *Pseudomonas*. Neste caso, os tipos de vesículas analisadas no estudo atuaram como veículo de transporte para o DNA e fatores de virulência (Kadurugamuwa and Beveridge 1995). Outro estudo utilizou cepas de *E.coli O57:H7* para avaliar o potencial transformante das vesículas, as quais demonstraram resultado positivo para a presença de DNA que codifica os genes de virulência *eae*, *stx1*, *stx2*, e *uidA*. Além disso, as toxinas Shiga 1 e 2 estão contidas nas vesículas sugerindo que as vesículas podem entregar material genético a outros organismos gram-negativos (Kolling and Matthews 1999).

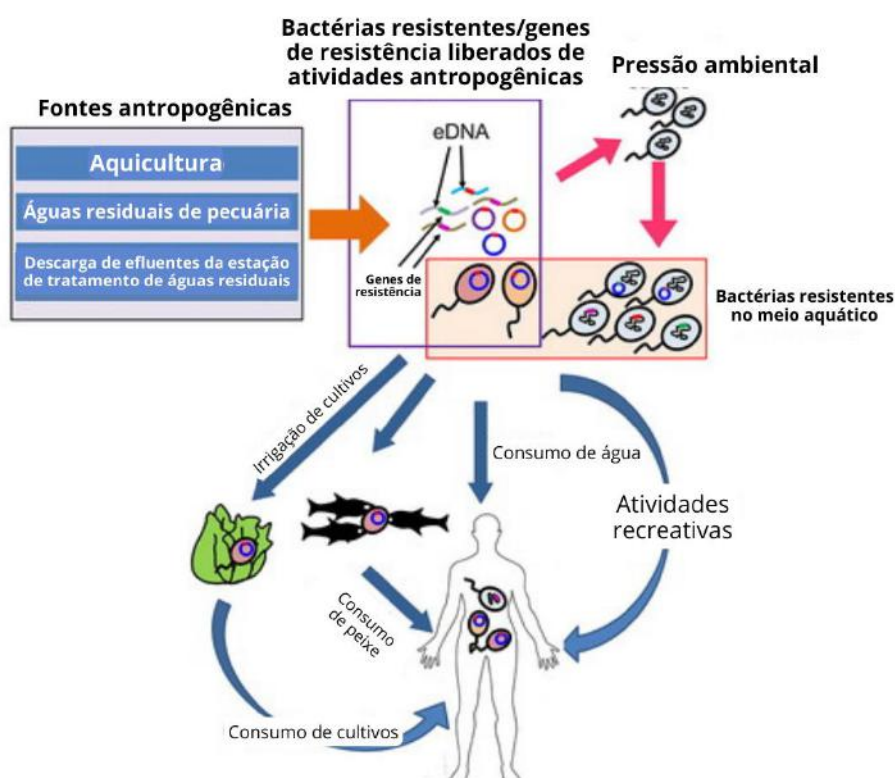
Dessa forma, o carregamento do DNA e a sua entrega seria facilitada pela proteção fornecida contra as exonucleases na estrutura vesicular, exacerbando o seu potencial transformante visto que, a partir dos processos citados, se tornaria possível a contribuição para sobrevivência, patogenicidade e toxicidade de bactérias (Renelli 2003). Em acréscimo, também foi descrito que VEs protegem o DNA da ação da DNase ou enzimas de restrição e, portanto, constituem um meio inteligente de transporte para o DNA de uma célula para outra (Kahn *et al.*, 1983; Dorward *et al.*, 1989; Domingues and Nielsen, 2017).

Por isso, é de extrema relevância abordar as nanopartículas em questão como perpetuadoras de resistência em modelos *in vitro*, obtendo papel de destaque ainda maior como mecanismos de THG no meio ambiente. O processo foi denominado como vesidução (Soler, N., & Forterre, P. 2020), no estudo a vesidução consistiria nas seguintes etapas: (i) saída da VE contendo DNA de uma célula doadora, (ii) migração do VE para o ambiente, (iii) fixação da VE para uma superfície celular receptora, (iv) transporte de DNA no citoplasma e (v) aquisição de genes.

Para além do meio ambiente, temos humanos, animais, plantas, alimentos como impulsionadores da resistência antimicrobiana, reforçando a relevância da abordagem do conceito de *One Health* como alternativa para o controle dessa problemática (Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance, 2019). Dentro deste contexto, cabe salientar o papel dos ambientes aquáticos como transmissores e de concentração de RAMs (Karkman, Do, Walsh, & Virta, 2018; Suzuki, Pruden, Virta, & Zhang, 2017 ; Wellington *et al.*, 2013). Em contrapartida, a relação com os riscos à saúde humana entre bactérias resistentes e seus



respectivos genes de resistência em ambientes aquáticos ainda não são completamente compreendidos, tal fator está associado a ausência de informações e estudos de caráter exploratório na literatura (Ashbolt *et al.*, 2013 ; Pepper, Brooks, & Gerba, 2018). A principal via de risco à saúde humana do desenvolvimento de RAM em meio aquático está associada à ingestão de bactérias resistentes, assim como o papel do eDNA, associado a aquisição de RAMs por bactérias ambientais por meio da transformação natural. Havendo ainda, a contribuição da fração viável, mas não cultivável de bactérias do ambiente que também atuam na propagação da RAM, dificultando o detalhamento do processo e seus efeitos na saúde humana (Mohan Amarasiri, Daisuke Sano & Satoru Suzuki 2020)



**Figura 4.** Procedimento de avaliação quantitativa de risco microbiano para avaliar os riscos à saúde humana por bactérias resistentes a antibióticos e genes de resistência em ambiente aquático. O diagrama descreve brevemente o processo e fornece um resumo do conhecimento atual. Imagem adaptada de Mohan Amarasiri, Daisuke Sano & Satoru Suzuki 2020.

Dentro desse contexto, pode-se abordar a atuação de VEs no ambiente marinho. Um estudo em culturas de *Prochlorococcus*, uma cianobactéria marinha, é comprovada a liberação de VEs de caráter lipídico carreadoras de proteínas, DNA e RNA, demonstrando também a abundância de vesículas carreadoras de DNA no mar costeiro e aberto (Biller *et al.* 2014). Tendo em vista,

a existência de bactérias resistentes em águas costeiras (Paschoal *et al.* 2017) e o papel transformante de VEs (Dorward *et al.* 1989; Kadurugamuwa and Beveridge 1995; Kahn *et al.* 1983; Kolling and Matthews 1999; Lo *et al.* 1998, Schaar *et al.* 2011) é possível inferir a importância da investigação do potencial transformante de VEs de bactérias provenientes do meio aquático.

## **2. Justificativa**

O presente estudo baseia-se na investigação em busca de novos mecanismos de disseminação da RAM na natureza replicados em modelos *in vitro*, tendo em vista a ausência de estudos pesquisando o carreamento e disseminação de GRAs de último recurso pelo transporte vesicular. A indiscriminada utilização de antimicrobianos em diferentes estratos, sendo ainda reforçado com uso sem fundamentação de antimicrobianos em meio a pandemia de COVID-19 é mais que evidente a crescente emergência de novas cepas resistentes aos compostos ao redor do mundo. Por isso, a presente investigação pode auxiliar fundamentalmente em pesquisas futuras abordando mecanismos alternativos para combater a disseminação da resistência a nível ambiental.

O estudo é exploratório e busca mostrar a perpetuação de GRAs por meio de VEs de microrganismos multirresistentes isolados do mar que podem apontar, no longo prazo, medidas de intervenção mais eficazes para reduzir a propagação destes genes em ambientes aquáticos. Portanto, sugere-se que o transporte vesicular é um mecanismo importante para a transferência de GRAs de último recurso, tendo em vista a capacidade de entrega ainda que não haja contato próximo entre doadores e receptores e a pressão antropogênica, sofrida pelas cepas ao entrarem em contato por exemplo, com o esgoto de origem hospitalar, sendo este um fator importante já documentado em relação a disseminação de RAMs (Jiang *et al.*, 2022).

## **3. Objetivos**

### **Objetivo geral**

Avaliar se VEs extraídas de bactérias coletadas do ambiente aquático são carreadoras de GRA.

## Objetivos específicos

- Estabelecer um protocolo para extração em meio sólido de VEs de bacilos gram-negativos produtores de KPC, NDM e MCR que foram recuperados de águas costeiras.
- Avaliar o carreamento dos grupos de incompatibilidade plasmidial e principais genes de resistência pelas VEs extraídas

## 4. Metodologia

### 4.1. Cepas utilizadas

As cepas utilizadas neste estudo foram isoladas em trabalhos prévios do Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica. As escolhas foram feitas a partir de bactérias sabidamente resistentes coletadas em águas costeiras e cujos genomas encontram-se sequenciados. Entre as cepas a serem estudadas foram escolhidas *Enterobacter kobei* FL23 (Kraychete *et al*, 2022), *Klebsiella pneumoniae* ST11-FL-C262 (Campana *et al*, 2017), *Escherichia coli* ST683/CC155 - JP24 (Cordeiro-Moura *et al*, 2022), *Citrobacter werkmanii* IncQ - LB887 (Campana *et al*, 2022).

**Tabela 1:** Tabela com grupos de incompatibilidade plasmidial e genes de resistência contidos nas cepas bacterianas

<b>Cepa bacteriana</b>	<b>Grupos de incompatibilidade</b>	<b>Genes de resistência</b>
<i>Enterobacter kobei</i> FL23	IncX3 IncU	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ST11-FLC262	IncA/C	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>
<i>Escherichia coli</i> ST683/CC155 - JP24	IncX4 IncI1	<i>mcr-1</i>
<i>Citrobacter werkmanii</i> IncQ - LB887	IncQ1, IncA e IncR	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>

## 4.2. Condições para a extração de VEs de bactérias gram-negativas

Inicialmente foi realizado o cultivo das respectivas cepas em meio LB (Luria Bertani) líquido sob agitação contínua a 120 rpm por 24 horas a 37°C, utilizando-se uma colônia de repique recente para inocular 20ml de meio de cultura. Em seguida, para os inóculos em placa que foram utilizados para extração das VEs, o crescimento em meio líquido que foi diluído na proporção de 1:50 e teve sua densidade ótica mensurada para absorção em 600nm. O volume de 200µL de tal diluição foi então espalhado em placas de meio TSA com auxílio de alças de Drigalski com subsequente incubação a 37°C por 18h. Esse processo foi realizado para que houvesse uma padronização do processo que permitisse relacionar a quantidade de vesículas obtidas a partir do número de células bacterianas. Após incubação, as placas foram processadas conforme o item a seguir.

## 4.3 Obtenção de VEs

Após a etapa inicial foi realizado sequencialmente o plaqueamento das amostras em concentração de 1:50, onde cada cepa foi cultivada em 4 placas de Petri com 12ml de TSA (*trypticase soy agar*) com 200 µL da amostra em tapete uniforme que, após a secagem, seguiu para incubação em estufa a 37°C por 24 horas. O processo de centrifugação ocorreu após a raspagem das placas, seguido de inoculação de todo o conteúdo retirado em 20ml de PBS 1X para remover células intactas. A condição da centrifugação inicial foi 7,000 x g por 15 minutos e o sobrenadante obtido foi novamente centrifugado a 15,000 x g por 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante recuperado foi submetido a filtração em membranas de poro 0,45 µm, para garantir a retenção de células remanescentes. Por fim, o volume obtido foi submetido à ultracentrifugação a 141.000 x g por 1 hora. Ao final desta etapa, todo o sobrenadante foi descartado e as vesículas depositadas no fundo foram ressuspensas em 200µL de PBS 1X no tubo de ultracentrifugação e posteriormente armazenadas em eppendorfs.

## 4.4. Quantificação e caracterização vesicular

Para quantificação e caracterização das distribuições de tamanho do conteúdo obtido na etapa anterior, foi utilizada a metodologia de rastreamento de nanopartículas (NTA - Nanoparticle Tracking Analysis). Em seguida, foram realizadas análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET), com finalidade de confirmação acerca do conteúdo e a pureza das VEs. A preparação das amostras foi feita pelo método de contrastação negativa, onde a

primeira etapa envolveu a separação das grades de microscopia eletrônica recobertas com FormVar e carbono. Por conseguinte, foi necessário adicionar uma placa de vidro recoberta com parafilm e adicionar 50 microlitros da amostra sobre o parafilm para formar uma gota. Em seguida, a grade recoberta com FormVar foi colocada sobre a gota para adesão das VEs durante 60 minutos e, então, procedemos com a secagem da grade por capilaridade, encostando um papel de filtro na sua parte inferior. Então, as grades foram lavadas com 30  $\mu$ l de PBS 1x, estéril e filtrado em membrana de 0,2 micrômetros. Para fixar as amostras foi adicionado 30  $\mu$ l de solução KARNOVSKY (karnovsky paraformaldeído 4% e GA 2,5% em tampão fosfato, 0,2 molar em água destilada q.s.p) e as grades foram mantidas por 10 minutos à temperatura ambiente em capela de exaustão de gases. Logo em seguida, o material foi lavado por três vezes com PBS 0,1 M. O contraste foi realizado com acetato de uranila 5% por 2 min protegido da luz. Para baixar os precipitados de uranila, a solução foi centrifugada por 12.000 g por 2 minutos. Por fim, lavamos todas as grades uma vez com água destilada, secamos com papel filtro pela lateral da grade e as mantivemos em temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas.

#### **4.5 Purificação dos extratos vesiculares**

Concluídas as etapas anteriores, uma etapa adicional utilizando do iodixanol foi realizada quando foi percebida a necessidade purificação da amostra. Para esta etapa, o material obtido no item 4.3 foi ressuspenso em 10 mL. Esta nova suspensão foi depositada sobre 550  $\mu$ l de PBS com concentração de 0,01 M (Horstman, A.L. and Kuehn, M.J. 2000) para realizar uma etapa de suspensão das vesículas, findando ajustar e fornecer um meio em condições isomóticas para manter a integridade estrutural estabilizando-as para o processo de gradiente de densidade (OptiPrep Application Sheet S62, 2020) com a adição de iodixanol, OptiPrep 60%, em 0,4 mL tubo de ultracentrifugação. Por fim, o tubo foi submetido à ultracentrifugação (141,000  $\times$  g, 60 min), com posterior coleta das frações inferiores.

#### **4.6 Quantificação de proteínas e remoção de DNA extravesicular**

Como uma segunda forma de quantificar as extrações de VEs, diluições de 1:100 das amostras obtidas no item 4.3 tiveram seu conteúdo proteico quantificado por meio da utilização do Kit de Ensaio de Proteína Pierce BCA (*Thermo Scientific*), seguindo as recomendações do fabricante). A quantificação do DNA foi realizada através dos fluorômetros Qubit detectam corantes fluorescentes especificamente ligados à molécula alvo. Com ensaios Qubit otimizados,

eles podem distinguir dsDNA de ssDNA ou intacto de RNA degradado, mesmo em quantidades extremamente pequenas ou na presença de contaminantes, de acordo com as instruções do fabricante no Kit Qubit 1X dsDNA BR Ensaio Padrão Lambda (*ThermoFisher*).

#### **4.7 Remoção de bacteriófagos e DNA extravesicular**

Para extinguir a contaminação por DNA fora do conteúdo intravesicular, foi realizado o tratamento com DNase de acordo com as especificações do Kit Qubit 1X dsDNA BR Ensaio Padrão Lambda (*ThermoFisher*). O uso da proteinase K (*ThermoFisher*) também se fez necessário, para degradação da estrutura dos bacteriófagos presentes encontrados na amostra.

#### **4.8 Pesquisa de GRA e marcadores plasmidiais**

Também foi realizada a etapa de PCR simplex usando a química SYBR Green para detectar todos os alelos conhecidos dos genes para extração e identificação de DNA no interior vesicular onde é necessário um par de oligonucleotídeos iniciadores (*forward* e *reverse*) específicos para os genes de resistência a serem pesquisados os quais, com o auxílio da enzima Taq polimerase, são capazes de realizar a amplificação de apenas um gene alvo por amostra. Cada reação foi realizada visando um volume final de 10 $\mu$ l por tubo contendo 5 $\mu$ l Master Mix SYBR Green; 0,5 $\mu$ l de *primer forward* e *reverse*, 0,3 $\mu$ l de água MilliQ estéril e 1 $\mu$ l (50 a 100 ng) de DNA. Foram empregados os iniciadores sequenciados e descritos na biblioteca do laboratório, cujo os ciclos descrevem-se da seguinte maneira: 95°C por 10 minutos, 95°C por 30 segundos, 53°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos, 72°C por 7 minutos em 35 ciclos

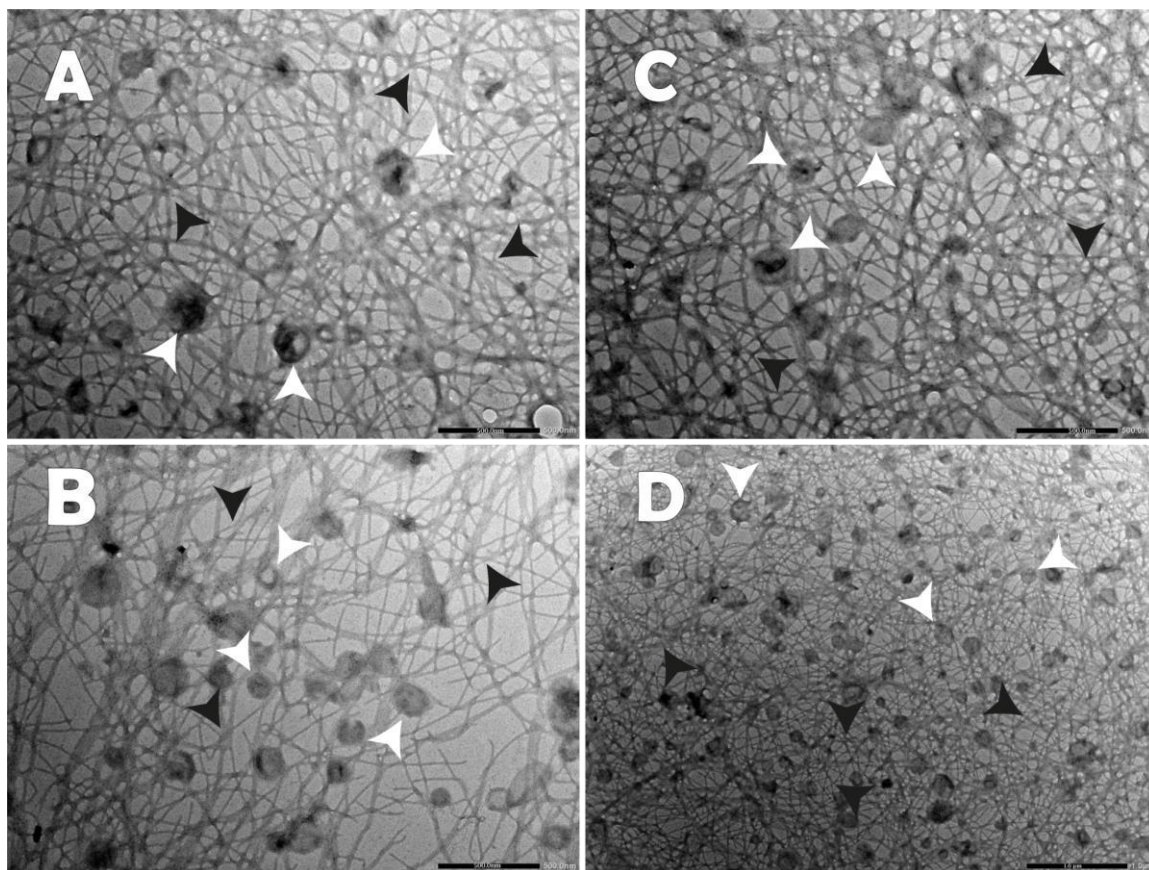
## **5. Resultados**

### **5.1 Análise das frações vesiculares extraídas das bactérias em estudo**

#### **5.1.1. *Enterobacter kobei* FL23**

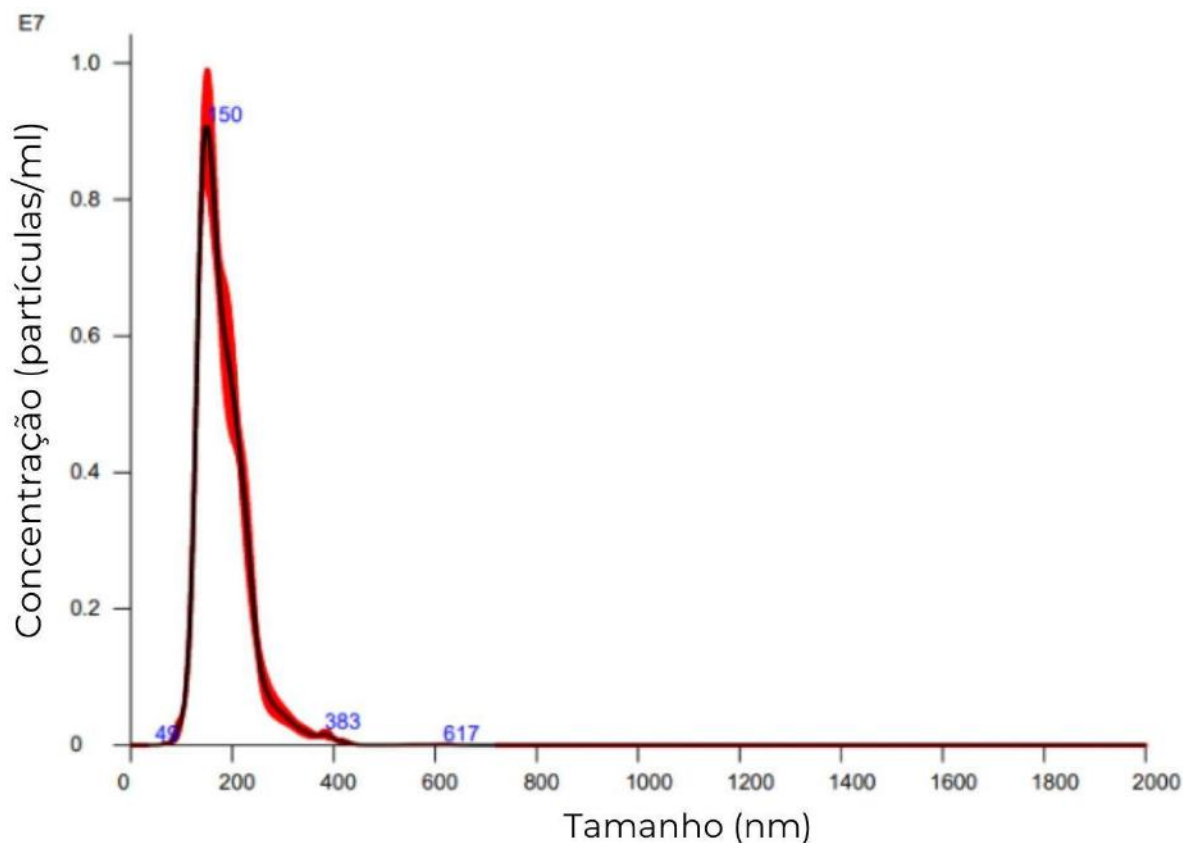
Na microscopia eletrônica de transmissão desta cepa foi possível observar as estruturas das VEs junto a filamentos proteicos provenientes da cepa de origem. A imagem (Figura 5) foi capturada em uma magnificação de 20.000 vezes nas letras A, B e C e em um aumento de 10.000 vezes na letra D, sendo possível observar a estrutura das VEs de forma mais completa

como indicado nas setas brancas em meio aos conglomerados filamentosos sinalizado pelas setas pretas.



**Figura 5:** Microscopia eletrônica de transmissão de extraído vesicular de *Enterobacter kobei* FL23. Nas imagens A, B, C e D é possível observar estruturas de vesículas extracelulares (setas brancas) em meio ao aglomerado de filamentos proteicos (setas pretas).

O tamanho e concentração das VEs extraídas da cepa foi avaliado através do rastreamento de nanopartículas logo após a etapa de extração (Figura 6) visando uma avaliação quantitativa e qualitativa do perfil de vesículas extracelulares investigado. É possível observar que a moda da concentração de VEs está na faixa de 150nm cujo a média de tamanho encontra-se na faixa dos 182,7nm com desvio padrão de 51.7nm em uma concentração de  $4,5 \times 10^{11}$  partículas por mililitro.

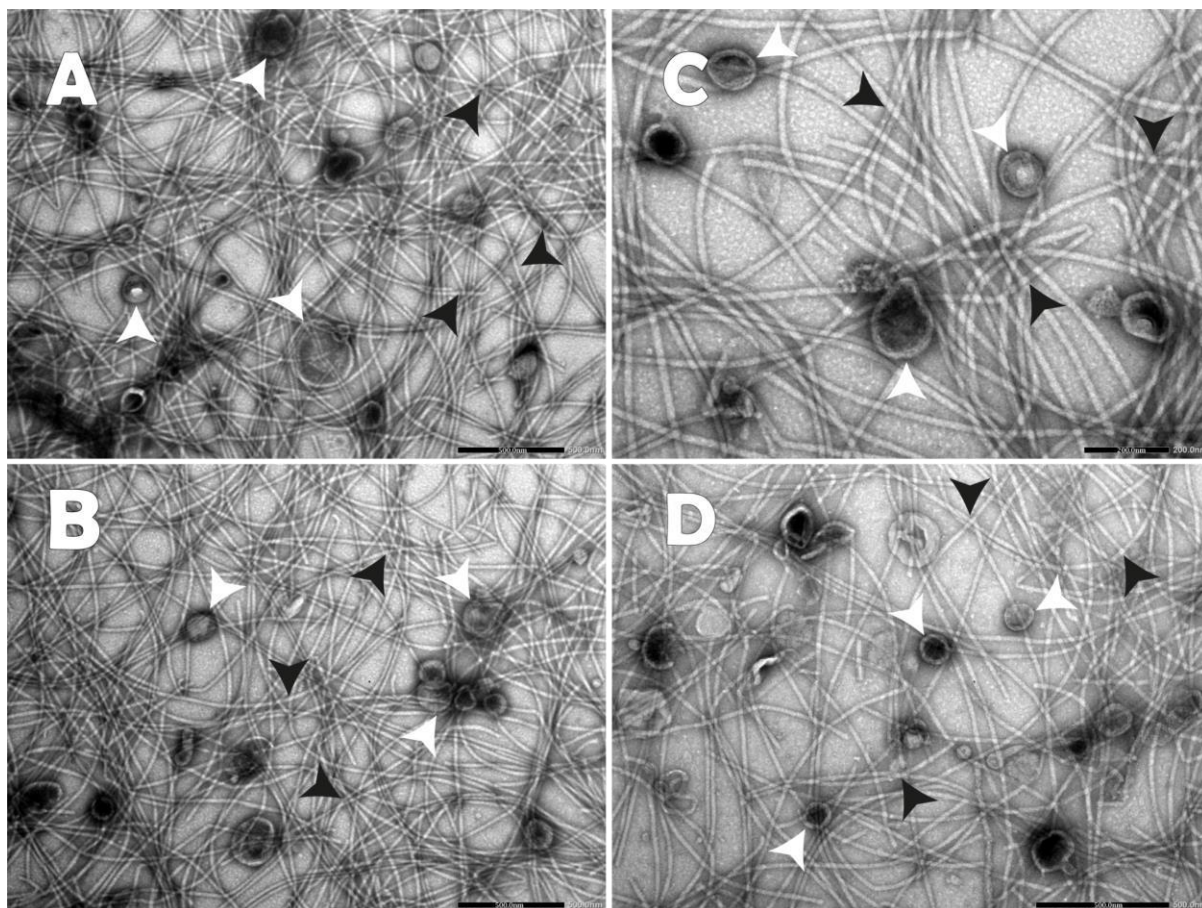


**Figura 6:** Gráfico de concentração/tamanho de vesículas extracelulares extraídas da cepa de *Enterobacter kobei* FL23. No gráfico a linha preta representa a média de tamanho e o destaque em vermelho representa o desvio padrão.

### 5.1.2. *Klebsiella pneumoniae* ST11-FLC262

Seguindo o procedimento do item 5.1.1 para a caracterização de VEs, a microscopia eletrônica de transmissão desta cepa demonstrou similarmente as estruturas vesiculares em meio a filamentos proteicos. A imagem (Figura 7) foi capturada em uma magnificação de 20.000 vezes nas letras A e B, 25.000 aumentos na letra C e 40.000 aumentos na letra D, sendo possível observar a estrutura das VEs indicadas pelas setas brancas em meio a amálgama filamentosa sinalizado pelas setas pretas.

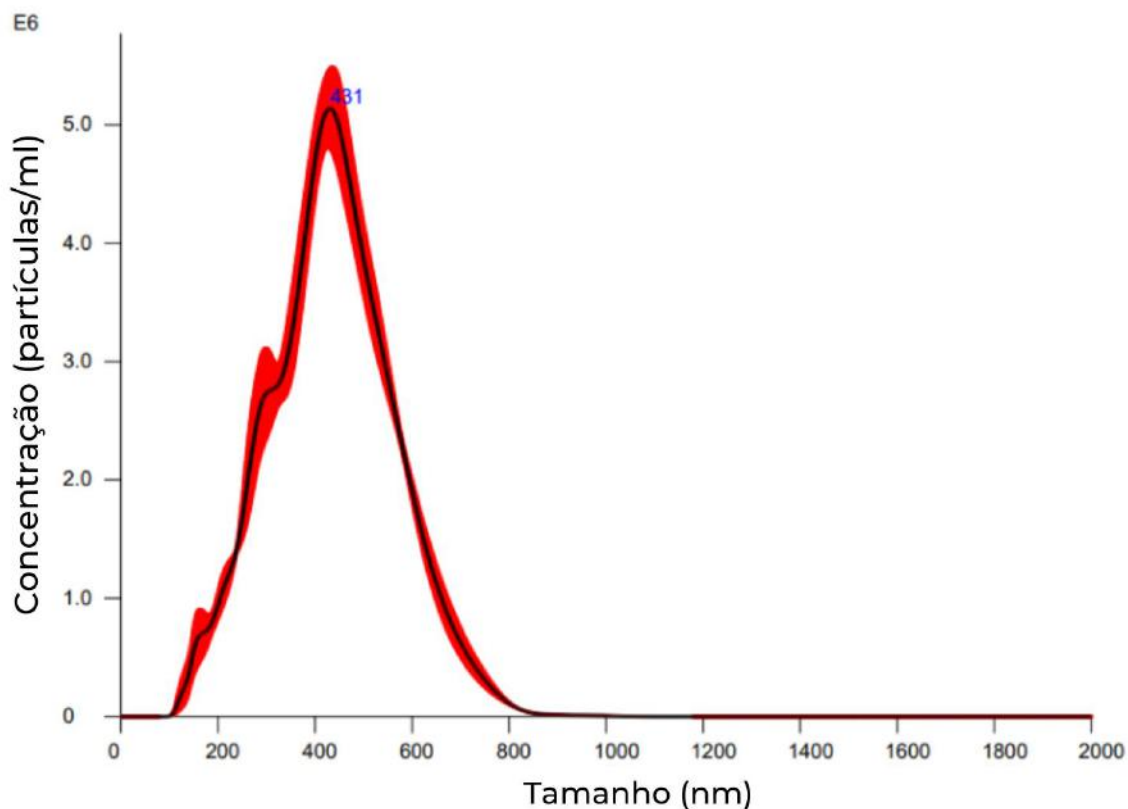




**Figura 7:** Microscopia eletrônica de transmissão de extraído vesicular de *Klebsiella pneumoniae* ST11-FLC262.

Nas imagens A e B é possível observar estruturas de vesículas extracelulares (setas brancas) em meio ao conglomerado de filamentos proteicos (setas pretas). Nas imagens C e D pode-se em maior aumento as estruturas de vesículas extracelulares, sendo possível avaliar a bicamada lipídica de suas respectivas membranas.

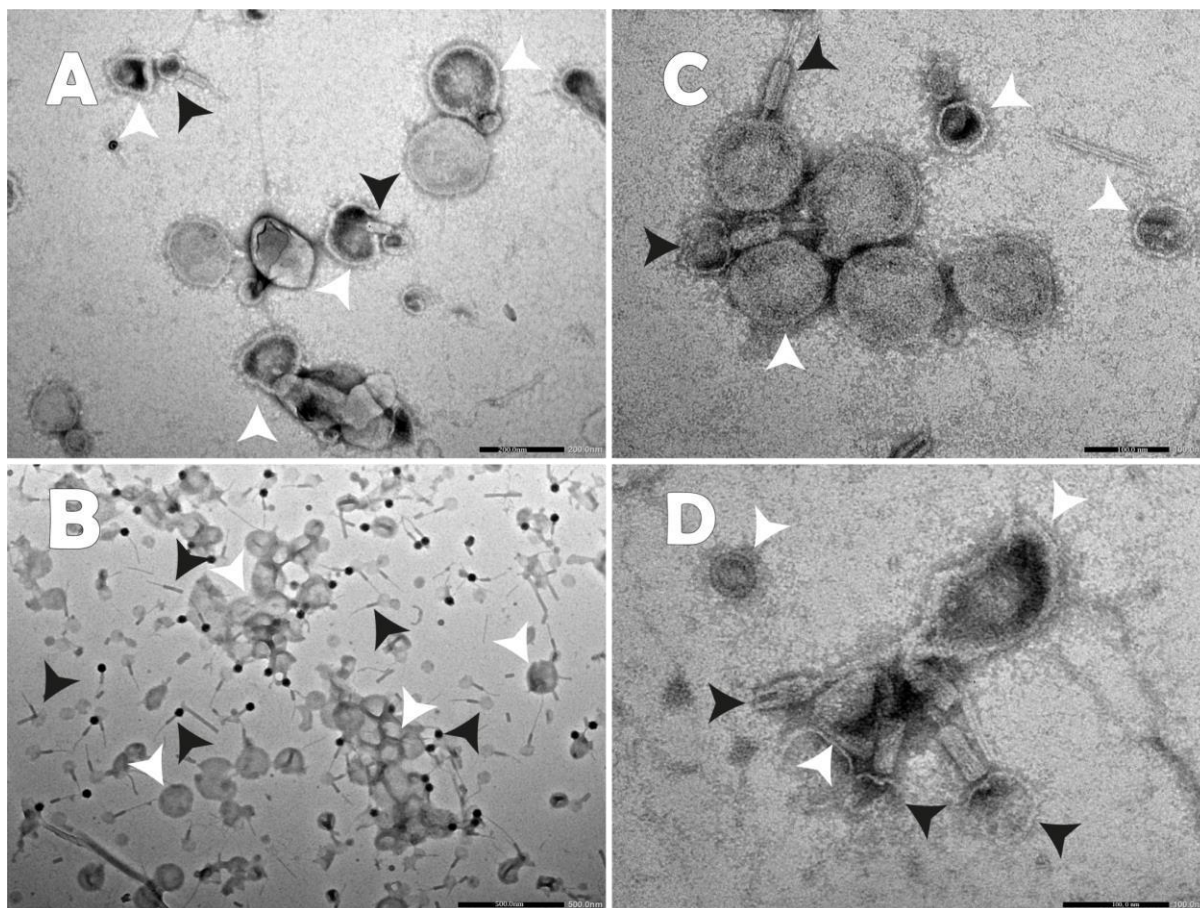
Seguindo o modelo de análise, a concentração das VEs extraídas da cepa após a etapa de extração (Figura 8) foi quantificada. A maior concentração de VEs está na faixa de 431nm, a média de tamanho das vesícula encontra-se na faixa dos 437.1nm, com desvio padrão de 129.2nm, indicando uma amostra heterogênea na diversidade dos extraídos preliminares, em uma concentração de  $1,48 \times 10^{12}$  partículas por mililitro.



**Figura 8:** Gráfico de concentração/tamanho de VEs extraídas da cepa de *Klebsiella pneumoniae* ST11-FLC262. No gráfico acima a linha preta representa a média de tamanho e o destaque em vermelho representa o desvio padrão.

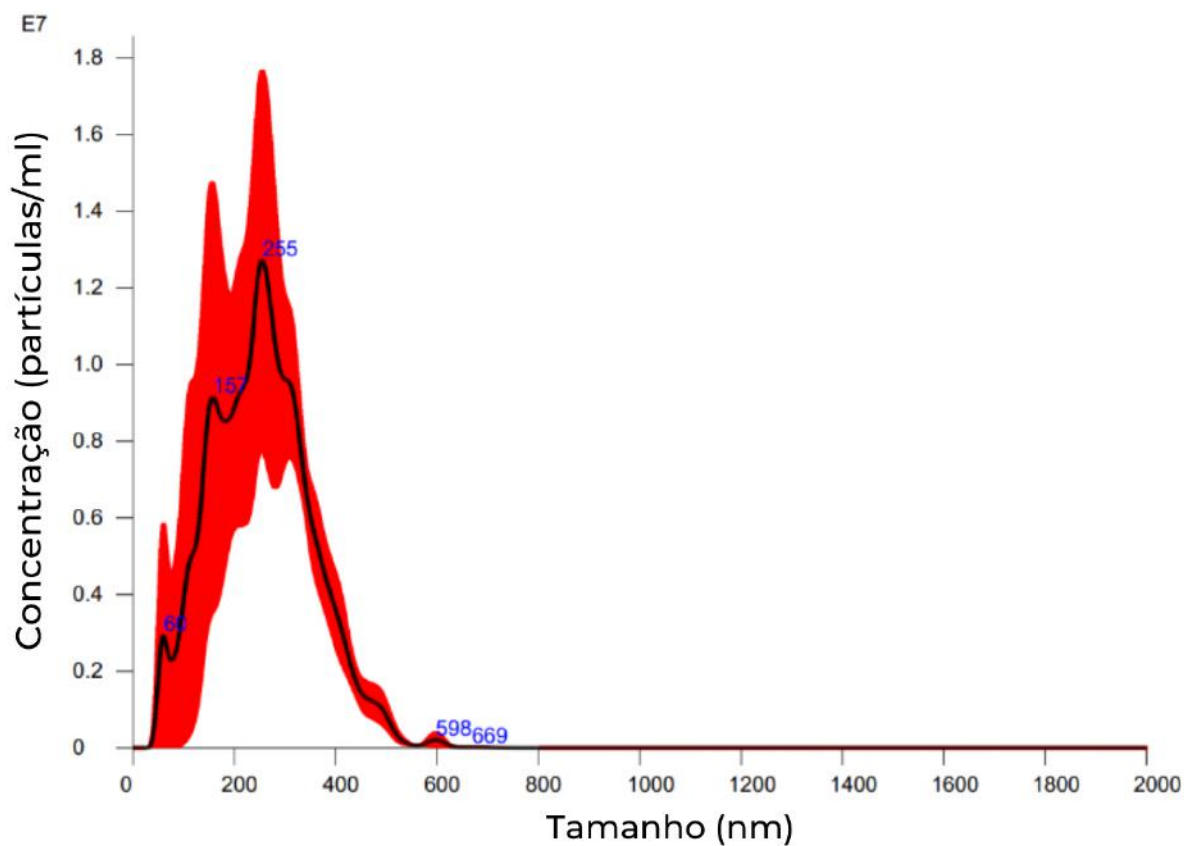
### 5.1.3. *Escherichia coli* ST683/CC155 - JP24

Nesta análise microscópica, de forma divergente às anteriores, observou-se a presença das frações vesiculares junto a bacteriófagos bem distribuídos em toda a área da amostra analisada (Figura 9). Nas imagens A e B é possível notar diferentes morfologias de bacteriófagos em uma magnificação de 40.000 vezes. Nas imagens C e D é possível analisar a morfologia da bicamada lipídica das VEs interagindo com as estruturas de bacteriófagos em uma magnificação de 80.000 e 100.000 vezes, respectivamente.



**Figura 9:** Microscopia eletrônica de transmissão de extraído vesicular de *Escherichia coli* ST683/CC155 - JP24. Nas imagens A e B é possível observar estruturas de vesículas extracelulares (setas brancas) em meio a diferentes morfologias de bacteriófagos (setas pretas). Nas imagens C e D pode-se observar de forma mais aproximada as estruturas de vesículas extracelulares (setas brancas), sendo possível avaliar a bicamada lipídica interagindo diretamente com estruturas de bacteriófagos (setas pretas).

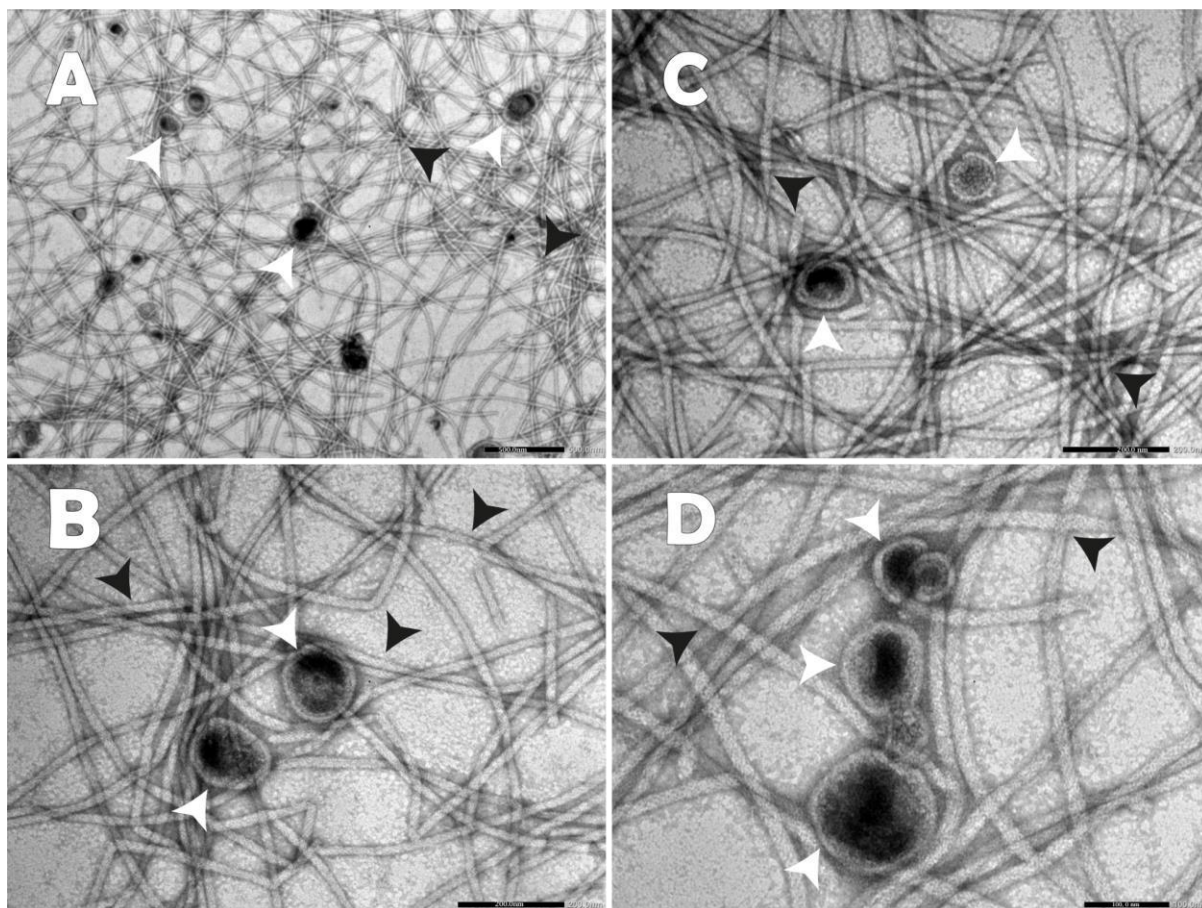
Após a extração, o tamanho e concentração das partículas extraídas da cepa foram obtidas (Figura 10). É possível observar que a maior concentração de partículas está na faixa de 255nm, onde sua média de tamanho compreende a faixa dos 252,8nm com desvio padrão de 99.2nm em uma concentração de  $2,8 \times 10^{13}$  partículas por mililitro.



**Figura 10:** Gráfico de concentração/tamanho de VEs extraídas da cepa de *Escherichia coli* ST683/CC155 - JP24 após extração. No gráfico acima a linha preta representa a média de tamanho e o destaque em vermelho representa o desvio padrão.

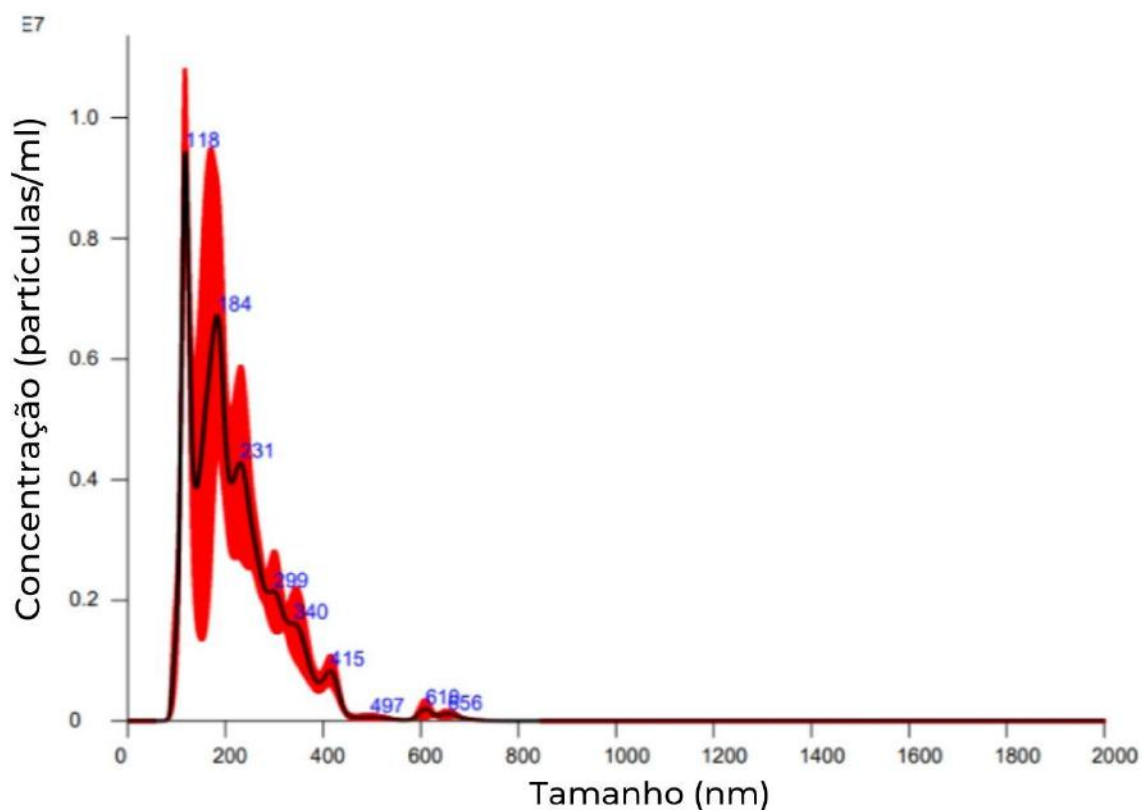
#### 5.1.4. *Citrobacter werkmanii* IncQ - LB887

Para essa cepa observaram-se as estruturas das VEs junto aos filamentos proteicos. As imagens (Figura 11) foram capturadas em magnificações de: 15.000 vezes (A), 50.000 vezes (B), 60.000 vezes (C) e 80.000 vezes (D). As VEs foram indicadas pelas setas brancas em meio ao aglomerado filamentososo sinalizado pelas setas pretas.



**Figura 11:** Microscopia eletrônica extraído de vesicular de *Citrobacter werkmanii* IncQ - LB887. Nas imagens A e B é possível observar estruturas de vesículas extracelulares (setas brancas) em meio ao conglomerado de filamentos proteicos (setas pretas). Nas imagens C e D pode-se observar de forma mais aproximada as estruturas de vesículas extracelulares, sendo possível avaliar a bicamada lipídica de suas respectivas membranas (setas brancas) em meio ao aglomerado de filamentos proteicos (setas pretas).

O perfil vesicular de mostrou maior concentração de partículas na faixa de 118nm, com média de tamanho 216nm e desvio padrão de 94,6nm, em concentração de  $1,9 \times 10^{11}$  partículas por mililitro.



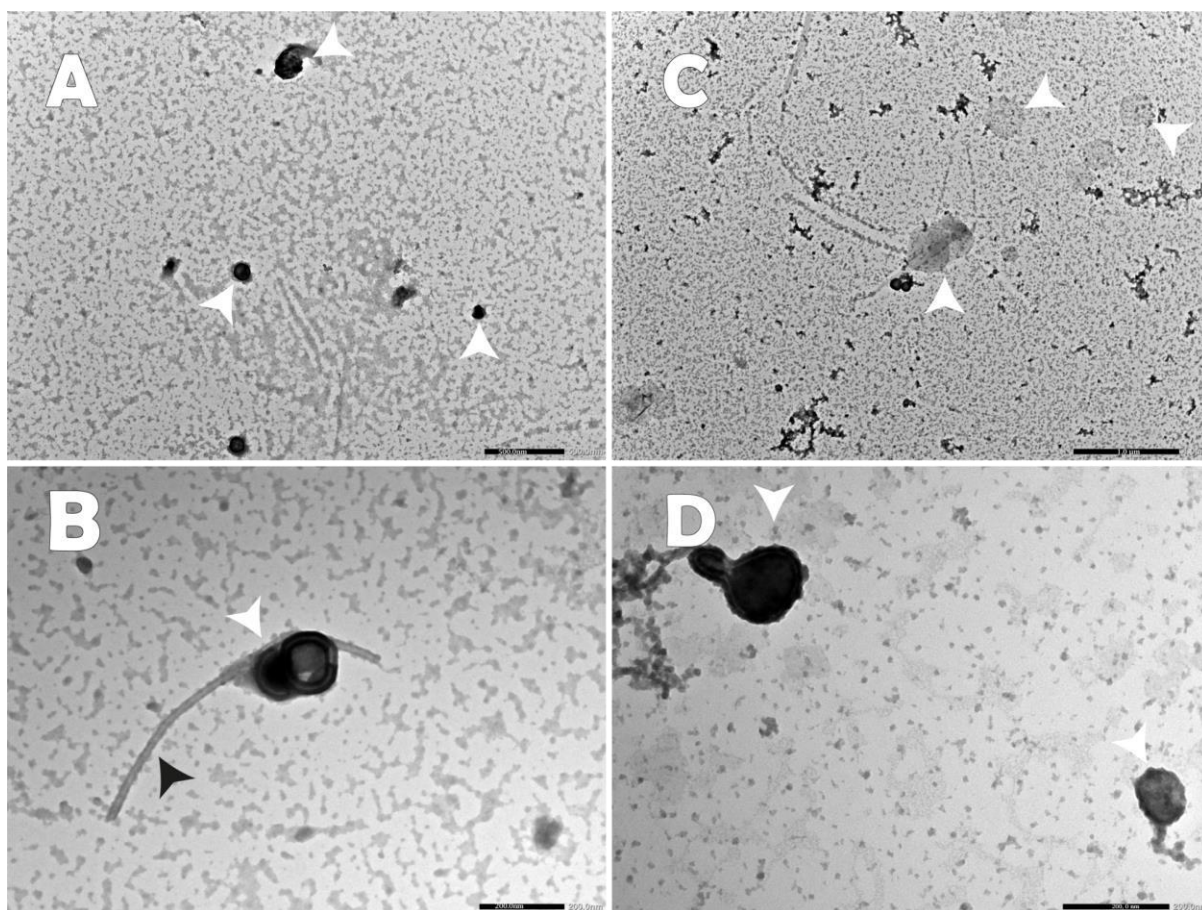
**Figura 12:** Gráfico de concentração/tamanho de VEs extraídas da cepa de *Citrobacter werkmanii* IncQ - LB887. No gráfico acima a linha preta representa a média de tamanho e o destaque em vermelho representa o desvio padrão.

## 5. 2. Remoção dos filamentos protéicos e bacteriófagos

A partir da observação das microscopias foi possível observar contaminação por filamentos proteicos nas amostras *Enterobacter kobei* FL23, *Klebsiella pneumoniae* ST11-FLC262 e *Citrobacter werkmanii* IncQ - LB887. Foram vistos também bacteriófagos na cepa de *Escherichia coli* ST683/CC155 - JP24. Tendo em vista a obtenção de amostras mais puras, dispúnhamos de duas metodologias possíveis para concretização do processo de purificação: o uso do colchão com iodixanol (60%), visando a separação dos contaminantes por meio da densidade diferencial e um tratamento enzimático utilizando uma proteinase, com o intuito de degradar os contaminantes de natureza proteica. Devido ao caráter exploratório deste estudo e a limitação de tempo para a realização dos experimentos no Instituto Carlos Chagas - Fiocruz Paraná, as cepas foram separadas em dois grupos, onde duas receberam tratamento com o colchão de iodixanol e outras duas com proteinase para avaliação e comparação da eficácia dos procedimentos de purificação das amostras.

### 5.2.1. *Enterobacter kobei* FL23 purificada com proteinase K

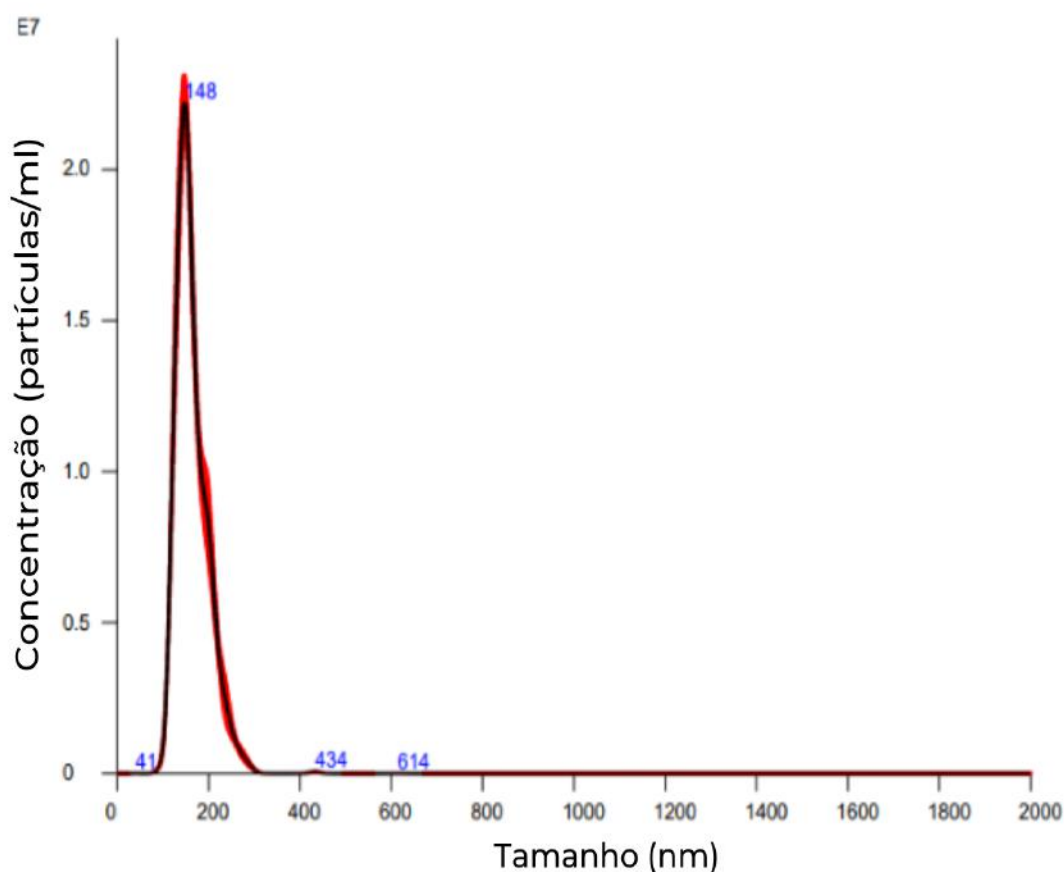
Após o tratamento da amostra com proteinase K com finalidade de ver uma amostra mais pura com a retirada dos filamentos, a microscopia eletrônica de transmissão mostrou a eficácia do procedimento, embora tenha-se observado um rendimento reduzido das VEs. As imagens (Figura 13) denominadas como A e B foram obtidas em magnificação de 15.000 e 40.000 vezes, respectivamente e as indicadas como C e D foram obtidas em magnificação de 10.000 e 50.000, também de forma respectiva, sendo possível observar a estrutura das VEs de forma detalhada.



**Figura 13:** Microscopia eletrônica de extraído vesicular de *Enterobacter kobei* FL23 após tratamento com proteinase K. Na imagem C a seta preta indica um filamento proteico.

A cepa apresentou tamanhos similares na etapa anterior descrita no item 5.1.1, porém com rendimento inferior após a etapa de purificação. Previamente ao tratamento, a maior recorrência de tamanho observada foi de cerca de 150 nm, onde a média de tamanhos foi aproximadamente 183 nm com desvio padrão de 51,7 nm, em uma concentração de  $4,5 \times 10^{11}$  partículas por

mililitro. Dessa forma é possível observar após a purificação, que o tamanho das amostras concentrou-se na faixa dos 148nm, onde sua média de tamanhos foi de 164.3nm, com desvio padrão de 36,8nm para uma amostra diluída 50 vezes, demonstrando redução em cerca de 10 vezes no rendimento da amostra após o tratamento que passou a possuir  $1.5 \times 10^{10}$  partículas por mililitro como concentração final. A partir disso, o resultado indica queda no rendimento das amostras após o tratamento, com redução da média de valores entre os extraídos vesiculares e desvio padrão menor, indicando que o tratamento foi eficaz para a aquisição de uma amostra mais pura e homogênea.



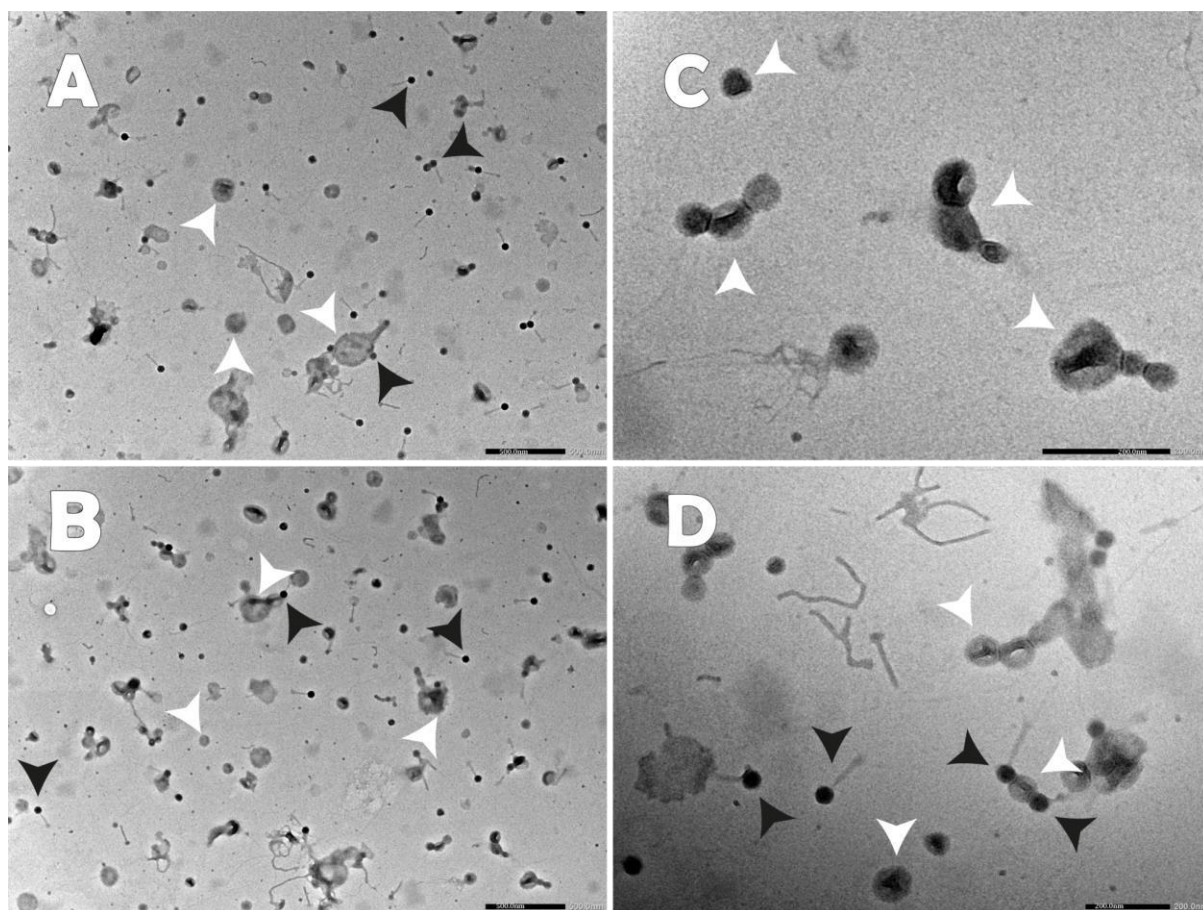
**Figura 14:** Gráfico de concentração/tamanho de VEs extraídas da cepa de *Enterobacter kobei* FL23 após o tratamento com a proteinase. No gráfico acima a linha preta representa a média de tamanho e o destaque em vermelho representa o desvio padrão.

### 5.2.2 *Klebsiella pneumoniae* ST11-FLC262 purificada com iodixanol

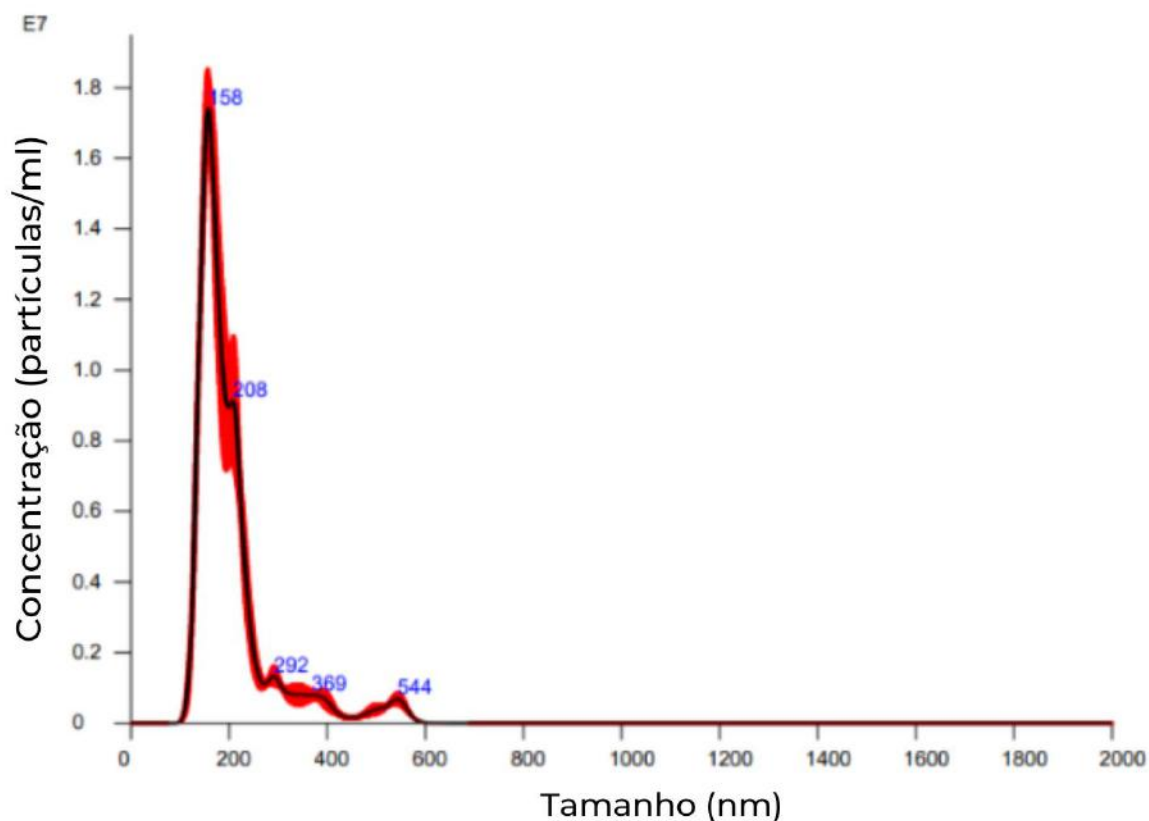
Como foi observado no item 5.1.2 filamentos proteicos junto às VEs na amostra extraída, foi adicionada a etapa de purificação com iodixanol. Dessa forma, foi possível observar a retirada dos filamentos evidenciando a presença de estruturas que assemelham a bacteriófagos como é possível observar na figura 15. As imagens A e B estão em uma magnificação de 15.000 vezes



e as imagens C e D se encontram em uma magnificação de 40.000 e 60.000 vezes, respectivamente.



**Figura 15:** Microscopia eletrônica de transmissão de extrato vesicular de *Klebsiella pneumoniae* ST11-FLC262 após a inclusão da etapa de purificação com o iodixanol. Nas imagens A e B é possível observar morfologias de bacteriófagos indicadas pelas setas pretas e estruturas vesiculares indicadas pelas setas brancas. Nas imagens C e D, em maior aumento, é possível observar conglomerados vesiculares indicados pelas setas brancas e estruturas de bacteriófagos também indicadas por setas pretas demonstrando interação com a fração vesicular.



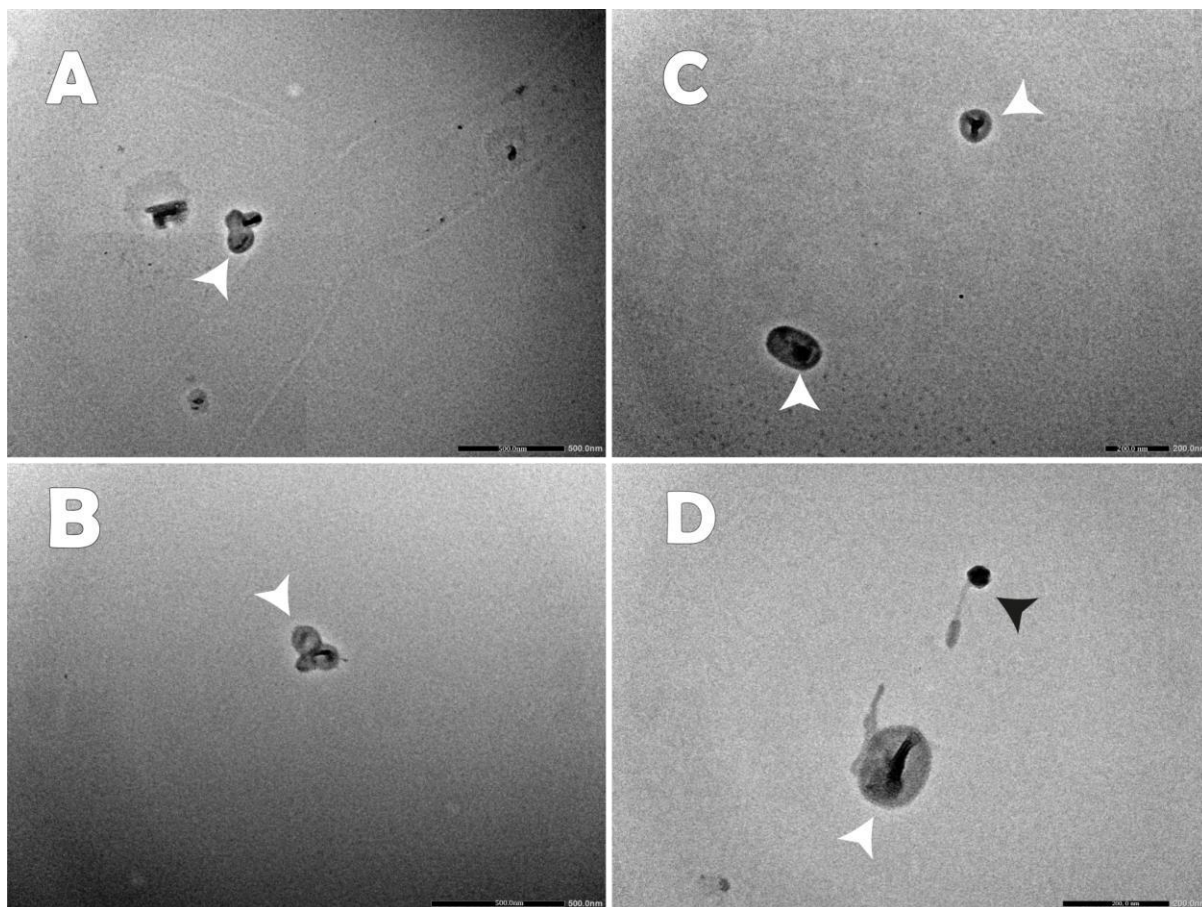
**Figura 16:** Gráfico de concentração/tamanho de VEs extraídas da cepa de *Klebsiella pneumoniae* ST11-FLC262 após o tratamento com iodixanol

Após a etapa de purificação, foi possível observar distinção na caracterização das amostras ao ser comparada com a etapa anterior descrita no item 5.1.2. Sua distinção notória está associada ao tamanho das VEs encontradas na amostra, cuja faixa de tamanho vista de forma mais recorrente encontra-se na faixa dos 158nm, com média de tamanho de aproximadamente 205nm e desvio padrão de 84,5nm em uma concentração de  $1,45 \times 10^{11}$  partículas por mililitro, demonstrando eficácia na retirada de partículas maiores promovendo uma amostra mais pura e homogênea, ao custo de um rendimento duas vezes menor que o da amostra extraída preliminarmente.

### 5.2.3 *Escherichia coli* ST683/CC155 - JP24 purificada com proteinase

Tendo em vista o resultado da microscopia eletrônica anterior (Figura 9) para a obtenção de uma amostra mais pura, o extraído vesicular também foi submetido ao tratamento com proteinase para a retirada de bacteriófagos. A obtenção de uma amostra mais pura, com retirada majoritária dos bacteriófagos e redução do rendimento das VEs pode ser observada na microscopia eletrônica posterior à etapa de tratamento (Figura 17). As imagens A e B

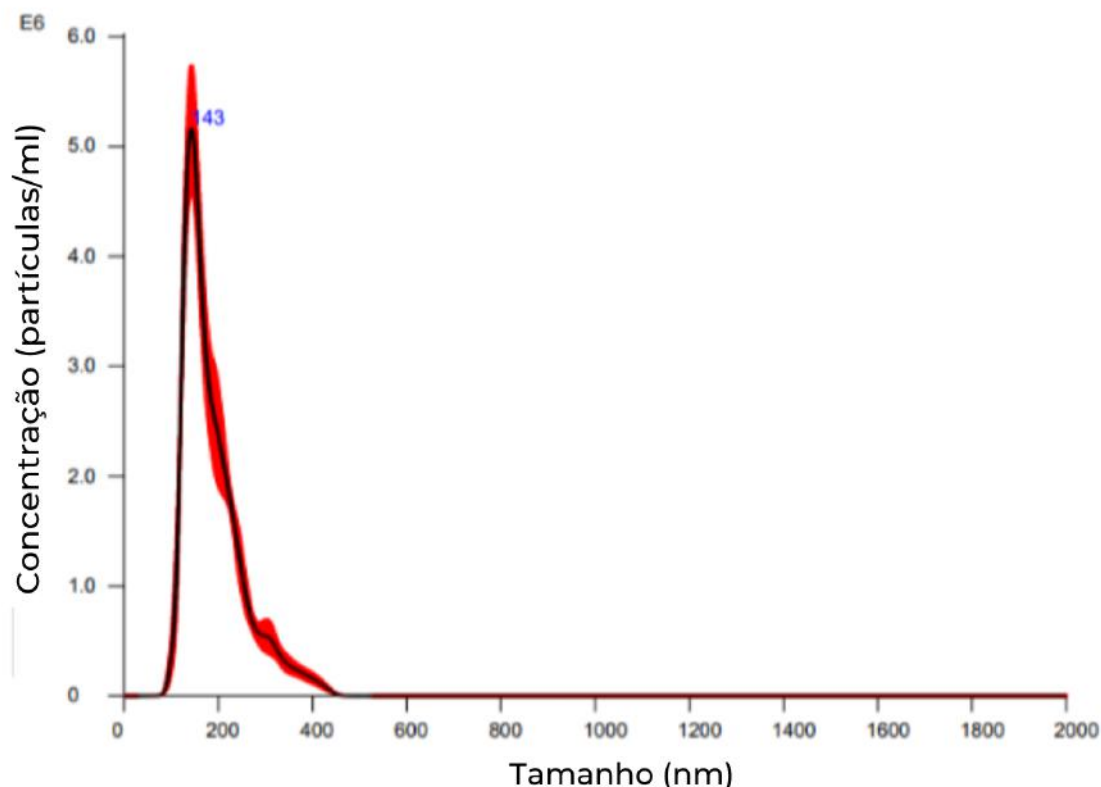
encontram-se em magnificação de 20.000 e 25.000 vezes, respectivamente e as imagens C e D encontram-se em magnificação de 30.000 e 50.000 vezes, também de forma respectiva.



**Figura 17:** Microscopia eletrônica de extraído vesicular de *Escherichia coli* ST683/CC155 - JP24 após tratamento com proteinase. Nas imagens A e B, as setas brancas indicam estruturas vesiculares dispersas na amostra purificada. Nas imagens C e D é possível ver a estrutura de VEs também indicadas por setas brancas em maior aumento, na figura C ainda é possível observar a estrutura de um bacteriófago próximo a vesícula, indicado pela seta preta.

A cepa apresentou tamanhos e concentrações distintas da amostra indicada nas análises preliminares. De acordo com o item 5.1.3, as VEs obtidas foram caracterizadas em uma média de tamanho de 252,8nm com desvio padrão de 99,2nm e em uma concentração de  $2,8 \times 10^{13}$  partículas por mililitro do extrato original. Em comparação ao resultado anterior, o perfil vesicular obtido em maior recorrência foi com 143nm, com média de tamanho de 188,6nm e desvio padrão de 63,9nm, com amostra diluída 10 vezes após a etapa de purificação, demonstrando redução no rendimento da amostra após o tratamento passando a possuir

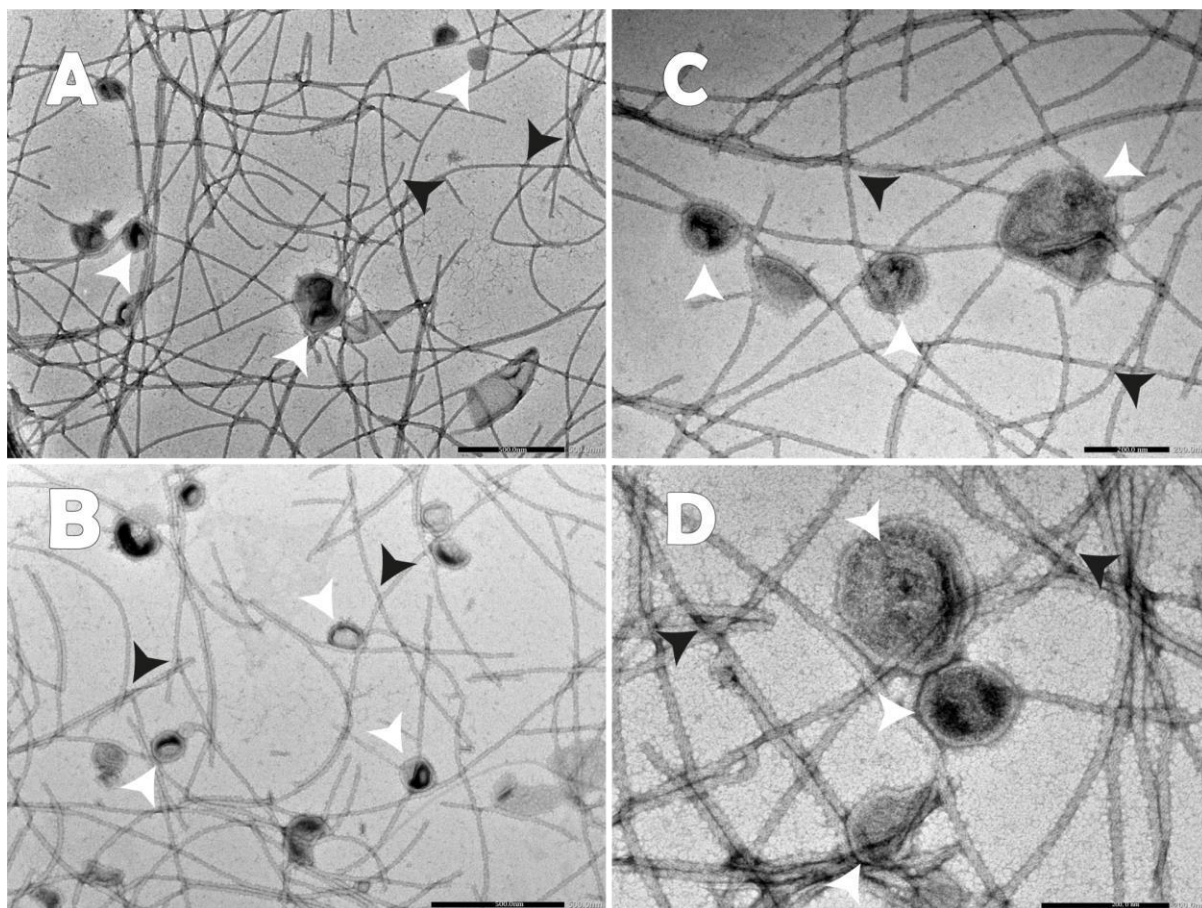
concentração de  $4,8 \times 10^9$  partículas por mililitro, indicando eficácia na purificação e uma amostra mais homogênea apesar da queda em seu rendimento.



**Figura 18:** Gráfico de concentração/tamanho de VEs extraídas da cepa de *Escherichia coli* ST683/CC155 - JP24 após o tratamento com a proteinase K. No gráfico acima a linha preta representa a média de tamanho e o destaque em vermelho representa o desvio padrão.

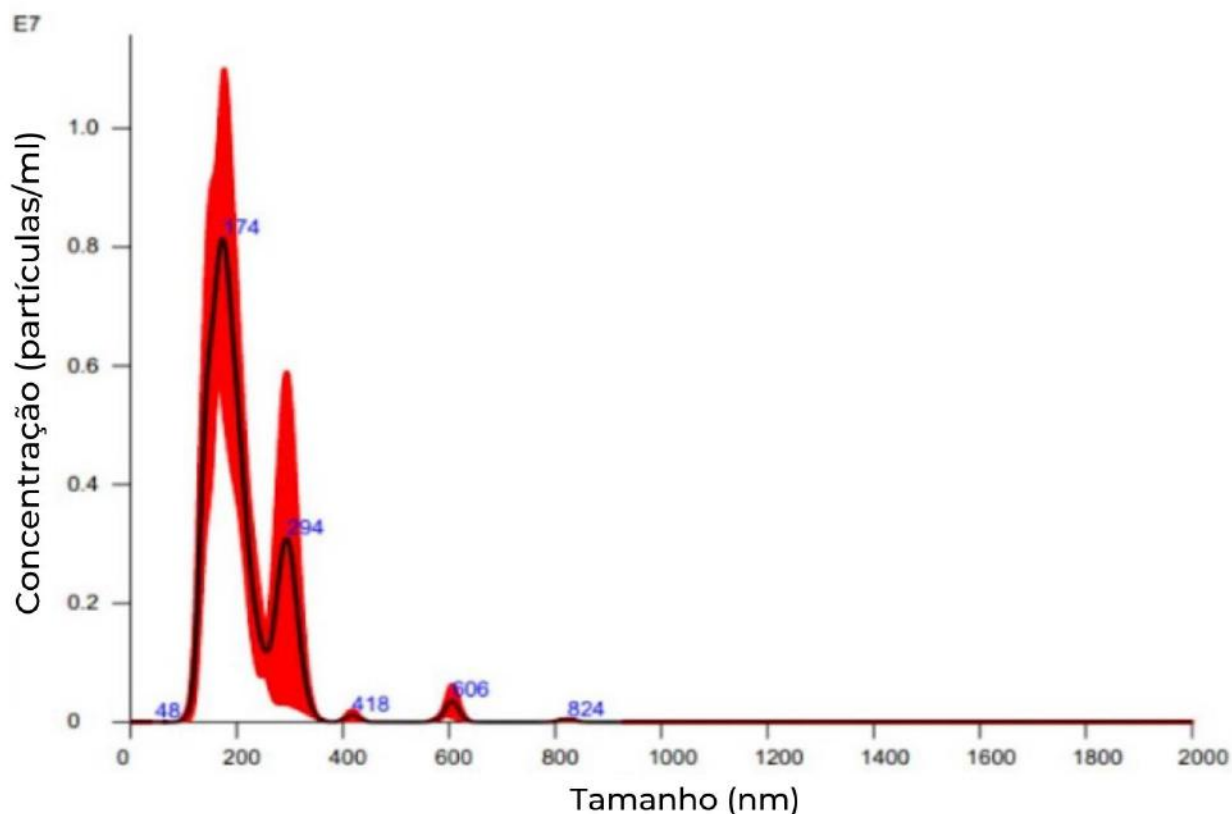
#### 5.2.4 *Citrobacter werkmanii* - LB887 purificada com iodixanol

Por também possuir filamentos proteicos junto às VEs na amostra preliminar extraída, a determinada cepa foi selecionada para receber a etapa de purificação com iodixanol. Dessa forma, foi possível observar redução dos dos filamentos sem sua retirada total (Figura 17). Nas imagens A e B é possível observar estruturas proteicas dispersas indicadas pelas setas pretas em uma magnificação de 20.000 e 25.000 vezes, respectivamente, suas estruturas vesiculares foram indicadas por setas brancas. Nas imagens C e D, em maior aumento, é possível observar de forma mais clara a estrutura vesicular em uma magnificação de 40.000 e 60.000 vezes também de forma respectiva, onde as bicamadas lipídicas que sinalizam a estrutura de VEs foram indicadas pelas setas brancas e a presença dos filamentos proteicos seguem representados pelas setas pretas.



**Figura 19:** Microscopia eletrônica de transmissão de extraído vesicular de *Citrobacter werkmanii* IncQ - LB887 após tratamento com iodixanol. Nas imagens A e B é possível observar morfologias de filamentos proteicos indicadas pelas setas pretas e estruturas vesiculares indicadas pelas setas brancas. Nas imagens C e D, em maior aumento, é possível observar estruturas vesiculares indicadas pelas setas brancas e estruturas de filamentos proteicos indicados por setas pretas.

Nesta última análise, a cepa apresentou tamanho de maior recorrência de aproximadamente 174nm, sua média de tamanho foi de 209,5nm com desvio padrão de 78,6nm seguindo uma concentração de  $8,2 \times 10^{11}$  partículas por mililitro. Dessa forma, observa-se que o rendimento vesicular permaneceu similar ao compararmos com a amostra do item 5.1.4, obtendo-se também uma amostra mais homogênea ao avaliarmos a divergência entre os desvios padrões antes e depois do tratamento de purificação da amostra, indicando eficácia parcial de purificação do procedimento, tendo em vista o prosseguimento da presença de filamentos descritos na microscopia eletrônica (Figura 19).



**Figura 20:** Gráfico de concentração/tamanho de VEs extraídas da cepa de *Citrobacter werkmanii* IncQ - LB887 após tratamento com iodixanol. No gráfico acima a linha preta representa a média de tamanho e o destaque em vermelho representa o desvio padrão.

### 5.3. Quantificação de proteínas e DNA

As amostras de VEs extraídas obtiveram os seguintes resultados em sua quantificação proteica na ausência do tratamento com a proteinase: *Citrobacter werkmanii* IncQ - LB887, 0,0079 pg; *Enterobacter kobei* FL23, 0,0226 pg; *Klebsiella pneumoniae* ST11-FLC262, 0,0487 pg e *Escherichia coli* ST683/CC155 - JP24, 0,0839 pg, resultados obtidos após o cálculo da equação de regressão linear com valor do  $R^2$  de 0,971. A quantificação após o tratamento com proteinase não foi realizada, considerando que a enzima utilizada refere-se ao kit de ensaio de proteína BCA Protein Assay, que realiza a quantificação através da redução conhecida de  $\text{Cu}^{2+}$  para  $\text{Cu}^{1+}$  por proteína em meio alcalino com detecção colorimétrica altamente sensível e seletiva do cátion cuproso ( $\text{Cu}^{1+}$ ) pelo ácido bicinconínico (BCA). A primeira etapa é a quelação do cobre com a proteína em um ambiente alcalino para formar um complexo azul claro. Nesta reação, conhecida como reação do biureto, peptídeos contendo três ou mais resíduos de aminoácidos formam um complexo quelato colorido com íons cúpricos em um ambiente alcalino contendo tartarato de sódio e potássio. Dessa forma, qualquer quantificação proteica após a realização do

ensaio sofreria interferência da própria enzima e dos oligopeptídeos presentes na amostra após a degradação, dificultando o estabelecimento de um parâmetro na análise quantitativa das proteínas do extraído vesicular.

**Tabela 2:** Tabela com quantificação proteica das VEs extraídas de suas respectivas cepas.

<b>Cepa bacteriana</b>	<b>Quantificação proteica (pg)</b>
<i>Enterobacter kobei</i> FL23	0,0226
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ST11-FLC262	0,0487
<i>Escherichia coli</i> ST683/CC155 - JP24	0,0839
<i>Citrobacter werkmanii</i> IncQ - LB887	0,0079

Em análise posterior, foi realizada a quantificação do DNA através do fluorômetro Qubit. O processo foi realizado antes e depois do tratamento com DNase. Essa etapa foi necessária devido a presença de bacteriófagos visualizados na amostra e para retirada da presença de DNA exógeno nos extraídos vesiculares para visando evitar interferência nos resultados posteriores da PCR (item 5.4)

**Tabela 3:** Tabela com quantificação DNA antes e após o tratamento com DNase.

<b>Cepas bacterianas</b>	<b>Quantificação de DNA no estrato tratado com proteinase (ng/<math>\mu</math>L)</b>	<b>Quantificação após tratamento com proteinase e DNase (ng/<math>\mu</math>L)</b>
<i>Escherichia coli</i> ST683/CC155 - JP24	0,0	0,0
<i>Citrobacter werkmanii</i> IncQ - LB887	4,58	0,0
<i>Enterobacter kobei</i> FL23	3,14	0,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ST11-FLC262	7,54	0,0

#### 5.4. Presença intravesicular de genes de resistência e grupos de incompatibilidade plasmidial

A procura pelos grupos de incompatibilidade plasmidial no interior das VEs se mostrou eficaz com a presença dos grupos IncX3, IncU, IncX4, IncQ1, IncA e IncR dispostos na tabela abaixo (Tabela 4).

**Tabela 4:** Tabela com grupos de incompatibilidade plasmidial contidos nas VEs extraídas de suas respectivas cepas.

<b>Cepa bacteriana</b>	<b>Grupos de incompatibilidade</b>	<b>Amplificação por PCR após DNase</b>
<i>Enterobacter kobei</i> FL23	IncX3	+
	IncU	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ST11- FLC262	IncA/C	-
<i>Escherichia coli</i> ST683/CC155 - JP24	IncX4	+
	IncI1	-
<i>Citrobacter werkmanii</i> IncQ - LB887	IncQ1, IncA e IncR	+

#### 5.5 Presença de *bla*KPC, *bla*NDM e *mcr*

A presença dos principais genes de resistência contidos nas cepas resistentes foram investigados. Os genes de resistência escolhidos para investigação foram descritos como os mais importantes agravadores de infecções ocasionadas pelas determinada cepas (Wilson, Török, 2018). Dessa forma, foi possível observar os resultados para a presença de *bla*NDM-1 e *mcr-1* como positivos quanto a sua presença e negativos para a presença de *bla*KPC-2 como disposto na tabela abaixo (Tabela 5).



**Tabela 5:** Tabela com os principais genes de resistência a serem identificados de acordo com as VEs extraídas e suas cepas resistentes de origem.

<b>Cepa bacteriana</b>	<b>Gene de resistência</b>	<b>Amplificação por PCR após os tratamentos</b>
<i>Enterobacter kobei</i> FL23	<i>bla<sub>KPC-2</sub></i>	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ST11-FLC262	<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	+
<i>Escherichia coli</i> ST683/CC155 - JP24	<i>mcr-1</i>	+
<i>Citrobacter werkmanii</i> IncQ - LB887	<i>bla<sub>KPC-2</sub></i>	-

## 6. Discussão

No presente estudo, foi possível avaliar e caracterizar a fração vesicular das cepas bacterianas *Enterobacter kobei* FL23 (Kraychete *et al*, 2022), *Klebsiella pneumoniae* ST11-FLC262 (Campana *et al*, 2017), *Escherichia coli* ST683/CC155 - JP24 (Cordeiro-Moura *et al*, 2022), *Citrobacter werkmanii* IncQ - LB887 (Campana *et al*, 2022). A presença das vesículas extracelulares pode ser confirmada a partir da análise morfológica. De acordo com estudos prévios, é possível caracterizar VEs a partir da visualização de seu envoltório com presença da bicamada lipídica (Toyofuku, Nomura e Eberl, 2019). Nas microscopias eletrônicas de transmissão, foi possível avaliar além das vesículas extracelulares filamentos proteicos (Figuras 5, 7, 11 e 19) e bacteriófagos (Figuras 9 e 15) provenientes da amostra plaqueada. Dessa forma, é pertinente ressaltar a interação dos bacteriófagos com as frações vesiculares observados de forma nítida nas micrografias do presente trabalho (Figuras 9 e 15). Tendo em vista a descrita interação, torna-se uma possibilidade dizer que através do contato os genes de resistência dos bacteriófagos passem para as vesículas tornando-as mecanismos de perpetuação de resistência aos antimicrobianos. Ademais, a quantificação de proteínas precisa ser investigada de maneira mais detalhada, visto que as amostras vesiculares sedimentaram com múltiplos filamentos proteicos, podendo alterar as métricas obtidas no processo.

Tendo isso em vista, a extração de VEs foi necessária para avaliar o carregamento dos genes de resistência nessa nova forma descrita de transferência horizontal de genes, a vesidação. A metodologia utilizada no estudo é adaptada e se mostrou eficaz. O processo utilizou como base

o estudo de extração vesicular de *Cryptococcus gatii* (CG Reis, S.Borges, J.Jozefowicz, 2019) em uma parceria com o Instituto Carlos Chagas, Fiocruz - Paraná. Na literatura, outros processos de extração foram descritos de forma laboriosa e com rendimento escasso (Coelho, Brown, Maryam, 2019). Dessa forma, se mostrou necessário a adaptação do processo de extração para aprimorar o rendimento quantitativo e futura caracterização das frações extraídas.

Foram escolhidas as cepas sabidamente resistentes, obtidas em estudos prévios do laboratório. A espécie nomeada por *Enterobacter kobei* FL23 (Kraychete *et al*, 2022), faz parte do gênero *Enterobacter* spp. O gênero é conhecido por habitar múltiplos ambientes, incluindo os corpos d'água, região de destaque nesta pesquisa (Davin-Regli, Lavigne e Pagès, 2019). Sua importância clínica está associada a infecções oportunistas. (Davin-Regli, Lavigne e Pagès, 2019). Com proveniência de fatores intrínsecos, estes microrganismos possuem naturalmente consideráveis níveis de resistência (Davin-Regli *et al.*, 2016). Em conjunto, ainda há a facilidade deste gênero em receber genes exógenos (Partridge *et al.*, 2018) tornando as cepas bacterianas ainda mais perigosas e com alta circulação de genes de resistência (Davin-Regli, Lavigne e Pagès, 2019). Em estudos relacionados ao seu genoma, foi encontrado o plasmídeo pEkFL23-IncX3 possuindo o gene *bla*<sub>KPC-2</sub> e o plasmídeo pEkFL23-IncU/P6, possuindo 2 plasmídeos com KPC. (R.G.G. Moreira, 2020).

Referente à cepa citada acima, após a etapa de extração foi possível observar um bom rendimento no rastreamento de nanopartículas cepa descrita no parágrafo anterior, tendo em vista que para uma boa quantificação no NTA a concentração de partículas encontra-se numa faixa de  $10^8$  por mililitro, a cepa em questão apresentou concentração de  $4,5 \times 10^{11}$  partículas por mililitro antes da etapa de purificação e  $1,5 \times 10^{10}$  após ao processo, demonstrando o rendimento como satisfatório. Sua purificação se mostrou eficaz de forma confirmatória nas microscopias eletrônicas, ao ser possível observar a presença de filamentos proteicos nas análises preliminares que ficaram majoritariamente ausentes após o tratamento indicando a eficácia do iodixanol na separação dos conglomerados presentes na amostra, mesmo que o processo em questão tenha ocasionado redução no rendimento. Na pesquisa dos genes de resistência presentes no conteúdo intravesicular, após o tratamento com DNase para descartar qualquer interferência exógena, foi possível verificar a presença dos grupos de incompatibilidade plasmidial IncU e IncX3 e a ausência do gene *bla*<sub>KPC-2</sub>, indicando que a etapa de PCR necessita ser melhor explorada em relação às condições de análise, padronização dos controles e análise da sensibilidade do procedimento para investigação do gene em específico, para investigar potenciais mecanismos de entrega de genes de resistência aos antimicrobianos experimentos de transformação seriam necessários. A possibilidade é reforçada quando na literatura, uma

espécie de mesmo gênero nominada como *Enterobacter cloacae* contendo o plasmídeo pLC291, teve suas VEs apontadas como perpetuadoras da resistência, comprovando-se como meio de troca de genes intra e interespecies (Tran e Boedicker, 2017).

A *Klebsiella pneumoniae* FL-C262, foi recuperada da Praia do Flamengo, Rio de Janeiro, Brasil, em dezembro de 2013. O estudo que caracterizou a cepa, permitiu por meio de testes de sensibilidade encontrar genes de resistência a cefalosporinas de amplo espectro, combinações de inibidores de beta-lactamases, carbapenêmicos, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, amicacina, gentamicina, trimetoprima/sulfametoxazol, cloranfenicol, fosfomicina, tetraciclina e tigeciclina, mas permaneceu suscetível à colistina (Campana *et al*, 2017). Dentro dos objetivos deste trabalho, a cepa de *Klebsiella pneumoniae* FL-C262 demonstrou rendimento bastante satisfatório nas etapas de quantificação antes e após o tratamento de purificação. A etapa de microscopia eletrônica de transmissão permitiu a visualização das VEs em meio ao aglutinado proteico na etapa de análise preliminar, demonstrando necessidade de tratamento posterior (Figura 7).

Nas análises posteriores de microscopia eletrônica, pode-se afirmar que o tratamento com iodixanol foi eficaz para a retirada dos filamentos proteicos, abandonando bacteriófagos que nesta etapa puderam ser visualizados em sua mais variada morfologia e com interação direta entre as estruturas de VEs. Partindo para a investigação da presença dos genes de resistência, a etapa de tratamento com DNase se mostrou eficaz ao indicar quantificação nula na amostra após o tratamento indicando que as VEs a serem investigadas estavam ausentes de DNA exógeno, porém a sensibilidade do kit deve ser levada em consideração para essa e demais amostras, visto que as mesmas contam com um quantidade reduzida de DNA, provavelmente intravesicular, sendo necessário o aumento da concentração das amostras para uma análise mais esclarecedora e consistente. Dessa forma, o grupo de incompatibilidade plasmidial IncA/C teve sua presença negativa, porém o gene de resistência *bla<sub>ndm-1</sub>* presente na cepa foi identificado de forma posterior na fração vesicular tornando possível o potencial perpetuador da resistência, tal fato pode ser explicado pela ocorrência do processo de empacotamento de material genético de forma aleatória em vesículas, portanto o gene pode estar presente mesmo sem a identificação completa do plasmídeo no lúmen vesicular, que por possuir tamanho reduzido pode agregar o plasmídeo de forma fragmentada ao ponto de não serem identificados pelos primers utilizados na PCR. Não se sabe ainda, se a aquisição do gene ocorreu de forma proveniente da cepa de origem ou por meio da interação com bacteriófagos contendo os genes de resistência circularizados, neste caso se faz necessária uma investigação aprofundada. De acordo com a

literatura, VEs de *Klebsiella pneumoniae* são uma força motriz comprovada para a transferência horizontal de genes *in vitro* (Dell'Annunziata *et al.*, 2021.). A interação de VEs de *Klebsiella pneumoniae* e bacteriófagos ainda não foi descrita.

*Escherichia coli* também é uma das espécies abordadas neste estudo. A determinada espécie é descrita como a responsável por uma das causas mais comuns de infecções extra intestinais em todo o mundo (Toval *et al.*, 2014). A cepa específica estudada é nomeada como uma *E. coli* ST683/CC155 - JP24 portadora do gene *mcr-1* presente nos replicons IncX4 (~33 kb) e Inc11/I $\gamma$  (~34 kb). Além disso, seu resistoma inclui genes que codificam para resistência às tetraciclina, trimetoprima, sulfonamida, aminoglicosídeos, cloranfenicol, macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B, (Cordeiro-Moura *et al.*, 2022). Nas análises deste estudo, a cepa *E. coli* ST683/CC155 - JP24 quanto ao seu rendimento da concentração de VEs se mostrou satisfatória e dentro dos parâmetros esperados para uma boa visualização nos determinados equipamentos. O rendimento após as etapas de purificação foi reduzido, porém foi capaz de demonstrar bons resultados. Suas microscopias eletrônicas, demonstraram interação e presença de diferentes morfologias de bacteriófagos e VEs. A visualização das determinadas estruturas foi nítida, mostrando de forma objetiva o conteúdo presente na amostra, onde bacteriófagos fazem comunicação direta com a estrutura das VEs. Após o tratamento com proteinase as estruturas fágicas se tornam escassas, indicando que o tratamento selecionado para a purificação da amostra foi eficaz. Relacionando estes dados com o tratamento com iodixanol escolhido para a cepa de *Klebsiella pneumoniae* FL-C262, é possível estipular uma metodologia que deve ser acompanhado de forma posterior com o tratamento enzimático para a purificação de amostras positivas para a presença de bacteriófagos, visto que o seu uso não seria suficiente para a obtenção de uma amostra com o máximo grau de purificação.

Seguindo para as etapas posteriores, a pesquisa da presença de genes intravesiculares ocorreu após as etapas de proteinase e DNase que se mostraram eficazes em seu papel de purificação. Dentro dos parâmetros avaliados, o grupo de incompatibilidade plasmidial IncX4 se mostrou positivo quanto a sua presença, diferentemente do Inc11 que possui resultado negativo. O gene de resistência *mcr-1* também esteve presente no interior vesicular da amostra investigada, confirmando o empacotamento do material genético proveniente da célula-mãe ou adquirida através de interação com bacteriófagos. Na literatura, uma pesquisa revelou que genes de virulência cromossômica associados a bacteriófagos foram detectados em vesículas de *Escherichia coli* O157:H7 (Kolling, G. L., & Matthews, K. R. 1999). Onde após o tratamento com DNase, o DNA foi protegido da digestão pela DNase, sugerindo que o DNA é empacotado dentro de vesículas (Kolling, G. L., & Matthews, K. R. 1999), mostrando que a aquisição dos

genes de resistência de VEs pode ser mediada pela relação VE-bacteriófago. A última cepa que obteve foco no estudo foi a *Citrobacter werkmanii* IncQ - LB887. Poucos estudos relacionam esta espécie a infecções humanas, porém alguns relatos descreveram-na como produtora de carbapenemases, portanto carregando os genes que as codificam. O seu resistoma inclui genes que codificam resistência a  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, cloranfenicol, fluoroquinolonas, macrolídeos, rifampicina e sulfonamida. Seus grupos de incompatibilidade plasmidial envolvem ColRNAI, IncA, IncC2, IncR, ColRNAI-like, IncQ1-like e IncQ2-like. (Campana *et al.*, 2022). Como visto anteriormente, as análises mostraram rendimento satisfatório na concentração de vesículas antes e após as etapas de purificação. Nas microscopias eletrônicas, foi perceptível a presença dos filamentos proteicos no extraído preliminar e no extraído vesicular posterior com pequena modificação na dispersão da estrutura dos filamentos pela amostra, o fato pode estar aliado a alta concentração do conteúdo proteico que necessitaria de mais uma etapa de purificação demonstrando eficácia parcial do procedimento realizado com o iodixanol. Nas etapas de PCR, posteriores aos tratamentos eficazes com proteinase e DNase, foi demonstrada a presença dos grupos de incompatibilidade plasmidial IncQ1, IncA e IncR, presentes na cepa, apesar da presença do gene *bla<sub>KPC-2</sub>* não ter sido identificada repetindo o padrão apresentado nas VEs da cepa de *Enterobacter kobei* FL23 onde a etapa de PCR necessita ser melhor explorada em relação às condições de análise, padronização dos controles e análise da sensibilidade do procedimento para investigação do gene em específico.

Na literatura, vesículas desta cepa em específico ainda não foram descritas, sendo necessário avaliar o seu papel no empacotamento e entrega do material genético encontrado. Na utilização do rastreamento de nanopartículas (NTA -Nanoparticle Tracking Analysis), dentro de uma concentração de  $10^8$  partículas por análise foi possível confirmar a dimensão majoritária das VEs extraídas de cada uma das cepas bacterianas pesquisadas no estudo. Segundo a literatura, o tamanho das VEs compreende entre 10nm e 400 nm (Toyofuku, Nomura e Eberl, 2019), no entanto, o equipamento utilizado passa a computar a contagem de partículas a partir de 20 nm (Filipe, V., Hawe, A. & Jiskoot, W., 2010), podendo então estar omitindo uma parcela das populações vesiculares investigadas, demonstrando necessidade de maior estudo das frações que não foram englobadas.

Considerando todos os resultados obtidos e o conhecimento da literatura acerca da problemática pode-se dizer que: uso de amostras isoladas de água do mar, sabidamente resistentes por estudos prévios do laboratório aponta a vesidução como um possível mecanismo negligenciado de propagação da resistência em meio aquático. É importante ressaltar que é possível que o mecanismo descrito como vesidução pode ainda, realizar a entrega dos

plasmídeos contendo os determinados genes de resistência encontrados, de forma protegida, direcionada, múltipla e descontrolada em um meio que abrange o cenário global. Ainda não existem estudos ou medidas profiláticas capazes de contornar este cenário de propagação da resistência apontando uma pauta de suma importância e preocupação para a população mundial de maneira generalizada.

## 7. Conclusão

- O protocolo de extração de vesículas adotado foi eficaz e com alto rendimento para as cepas de bacilos gram-negativos estudados
- A metodologia de extração de meio sólido apresentou filamentos proteicos como contaminantes da fração vesicular em três das quatro cepas estudadas.
- Os protocolos de purificação estudados mostraram-se eficazes, embora apenas parcialmente para as cepas C262 e LB887.
- Comprovou-se a presença dos grupos de incompatibilidade plasmidial e do gene *bla<sub>ndm-1</sub>* de resistência estudados inseridos nas VEs.
- Foi possível visualizar a interação entre bacteriófagos e vesículas extracelulares nas cepas JP24 e C262.

## 8. Referências bibliográficas

Aas, FE, Wolfgang, M., Frye, S., Dunham, S., Løvold, C. and Koomey, 2002, Competência para transformação natural em *Neisseria gonorrhoeae* : componentes de ligação e absorção de DNA ligados à expressão de pilus tipo IV. *Microbiologia Molecular*, 46: 749-760.

Akova, 2016. Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections. *Virulence* 7, 252 - 266.

]

Amarasiri, K. P. K. M., Sano, D., & Suzuki, S. (2020). Understanding human health risks caused by antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) in water environments: Current knowledge and questions to be answered. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 50(19), 2016-2059.

Ana Catarina Duarte, Sílvia Rodrigues, Andrea Afonso, António Nogueira, Paula Coutinho, 2022. Antibiotic Resistance in the Drinking Water: Old and New Strategies to Remove Antibiotics, Resistant Bacteria, and Resistance Genes, *Pharmaceuticals*, 10.3390/ph15040393, 15, 4, (393).

Andersson, D. I. 2003. Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 6(5), 452–456.

Andrade, S. S., Sader, H. S., Barth, A. L., Ribeiro, J., Zoccoli, C., Pignatari, A. C. C., & Gales, A. C. (2008). Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacilli isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2003-2008). *Brazilian Journal of Infectious Diseases*.

Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat Rev Microbiol*. (Figura 2), (Furuya EY, Lowy FD, 2006)

Ashbolt NJ, Amézquita A, Backhaus T, Borriello P, Brandt KK, Collignon P, Coors A, Finley R, Gaze WH, Heberer T, Lawrence JR, Larsson DG, McEwen SA, Ryan JJ, Schönfeld J, Silley P, Snape JR, Van den Eede C, Topp E. Human Health Risk Assessment (HHRA) for environmental development and transfer of antibiotic resistance. *Environ Health Perspect*. 2013 Sep;121(9):993-1001.

Barão S, editor. *Microbiologia Médica*. 4ª edição. Galveston (TX): Ramo Médico da Universidade do Texas em Galveston; 1996. Introdução à Bacteriologia.

Bbosa, G. *et al.* 2014. Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. *Health*, 6, 410-425.

Billler *et al.* 2014. Bacterial vesicles in marine ecosystems. *Science*. 10;343(6167):183-6.

Bachurski, D. *et al.*, 2019. Extracellular vesicle measurements with nanoparticle tracking analysis – An accuracy and repeatability comparison between NanoSight NS300 and ZetaView, *Journal of Extracellular Vesicles*, 8:1, 1596016.

Brown-Jaque M, Calero-Cáceres W, Muniesa M. Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements. *Plasmid*. 2015 May; 79:1-7.

Camussi G, Deregiibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int*. 2010 Nov;78(9):838-48.

Campana EH, Kraychete GB, Montezzi LF, Xavier DE, Picão RC. 2022 Description of a new non-Tn4401 element (NTEKPC-IIe) harboured on IncQ plasmid in *Citrobacter werkmanii* from recreational coastal water. *J Glob Antimicrob Resist*.

Campana EH, Montezzi LF, Paschoal RP, Picão RC. 2017. NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 goes to the beach. *Int J Antimicrob Agents*. 49(1):119-121.

Cavalcanti, Carmelita de Lima Bezerra, 2017 Tipagem molecular de genes de resistência e virulência associado à expressão gênica em isolados de *Acinetobacter baumannii* submetidos a antimicrobianos.

CDC, 2013. Antibiotic Resistance Threats in the United States, (AR Threats Report).

Chattopadhyay, M. K. *et al.*, 2015. Vesicles-mediated resistance to antibiotics in bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 6.

Chatterjee *et al.* 2017. *Acinetobacter baumannii* transfers the bla NDM-1 gene via outer membrane vesicles. *J Antimicrob Chemother* 1;72(8):2201-2207.

Ciofu, *et al.* 2000. Chromosomal beta-lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 45, 9–13.

Cordeiro-Moura JR, Kraychete GB, Longo LGA, Corrêa LL, da Silva NMV, Campana EH, Oliveira CJB, Picão RC, 2022. Description and comparative genomic analysis of a mcr-1-carrying *Escherichia coli* ST683/CC155 recovered from touristic coastal water in Northeastern Brazil. *Infect Genet Evol.*

Comunicações microbiota-hospedeiro: Vesículas extracelulares bacterianas como linguagem comum, (Figura 3), (Ñahui Palomino RA, Vanpouille C, Costantini PE, Margolis L, 2021)

Coutinho *et al.*, 2014. Antibiotic resistance is widespread in urban aquatic environments of Rio de Janeiro, Brazil. *Microb. Ecol.* 68, 441–452

Dadgostar P. , 2019 Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infect Drug Resist*;12:3903-3910

David M. Livermore, 2003, *Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology, and Impact*, *Clinical Infectious Diseases* , Volume 36, Issue Supplement\_1, Pages S11–S23

Deatherage BL, Cookson BT. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect Immun.* 2012 Jun;80(6):1948-57.

Deatherage BL, Lara JC, Bergsbaken T, Rassoulian Barrett SL, Lara S, Cookson BT. Biogenesis of bacterial membrane vesicles. *Mol Microbiol.* 2009 Jun;72(6):1395-407.

Dell'Annunziata, F.; Folliero, V.; Giugliano, R.; De Filippis, A.; Santarcangelo, C.; Izzo, V.; Daglia, M.; Galdiero, M.; Arciola, CR; Franci, G. 2021. Potencial de transferência de genes de vesículas de membrana externa de bactérias Gram-negativas. *Int. J. Mol. Sci.* 2021 , 22 , 5985

De Man *et al.*, 2000. An antibiotic policy to prevent emergence of resistant bacilli. *The Lancet* 355, 973 - 978.

Edwin *et al.*, 2012. Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles. *Pharmacological Reviews*, 64(3), 676–705.

Fernando DM, Tun HM, Poole J, Patidar R, Li R, Mi R, Amarawansa GEA, Fernando WGD, Khafipour E, Farenhorst A, Kumar A, 2016. Detection of Antibiotic Resistance Genes in Source and Drinking Water Samples from a First Nations Community in Canada. *Appl Environ Microbiol.* 2016 Jul 15;82(15):4767-4775.

Fistrol *et al.* 2015. Environmental and Sanitary Conditions of Guanabara Bay, Rio de Janeiro. *Front Microbiol* 20;6:1232.

Frederick F. Correia, Terry L. McKay, Mary F. Farrow, Burton Rosan, Joseph M. Dirienzo, 1996, Natural transformation of *Streptococcus crista*, *FEMS Microbiology Letters*, 13-18.

Furuya, E., Lowy, F. 2006 Bactérias resistentes a antimicrobianos no ambiente comunitário. *Nat Rev Microbiol* 4, 36–45.

ECDC, 2018. Annual Epidemiological Report for 2014 Antimicrobial resistance (EARS-Net).

Gabriela B. Kraychete, Larissa A.B. Botelho, Pedro V. Monteiro-Dias, Wydemberg J. de Araújo, Celso J.B. Oliveira, Ana Paula D. Carvalho-Assef, Rodolpho M. Albano, Renata C. Picão, Raquel R. Bonelli, 2022., qnrVC occurs in different genetic contexts in *Klebsiella* and *Enterobacter* strains isolated from Brazilian coastal waters, *Journal of Global Antimicrobial Resistance*

Griffith, F. (1928). O significado dos tipos pneumocócicos. *Journal of Hygiene*, 27 (2), 113-159.



- Gregoracci *et al.* 2012. Structuring of Bacterioplankton Diversity in a Large Tropical Bay.
- Guo *et al.*, 2016. Impacts of human activities on distributions of sulfate reducing prokaryotes and antibiotic resistance genes in marine coastal sediments. *FEMS Microbiology Ecology* 92 (9), fiw128.
- Guerrero-Mandujano A, Hernández-Cortez C, Ibarra JA, Castro-Escarpulli G. The outer membrane vesicles: Secretion system type zero. *Traffic*. 2017 Jul;18(7):425-432.
- Habboush Y, Guzman N. Antibiotic Resistance. 2022 Jun 23. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan.
- Hocquet, Muller & Bertrand 2016. What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. *Journal of Hospital Infection* 93(4), 395-402.
- Horstman, A.L. and Kuehn, M.J. 2000. Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles *J. Biol. Chem.*, 275, 12489-12496.
- J.A. Lepe, L. Martínez-Martínez, 2022. Mecanismos de resistencia en bacterias gramnegativas, *Medicina Intensiva*, Volume 46, Issue 7, 2022, 392-402.
- Jeannot, K., Bolard, A., & Plesiat, P. (2017). Resistência às polimixinas em organismos Gram-negativos. *Jornal internacional de agentes antimicrobianos* , 49 (5), 526-535.
- Jiang, Q., Feng, M., Ye, C., & Yu, X. (2022). Efeitos e mecanismos relevantes de fatores não antibióticos na transferência horizontal de genes de resistência a antibióticos em ambientes aquáticos: Uma revisão. *Ciência do Ambiente Total*, 806, 150568.
- Johnston, C., Martin, B., Ficant, G., Polard P, Claverys JP., 2014 Transformação bacteriana: distribuição, mecanismos compartilhados e controle divergente. *Nat Rev Microbiol* 12, 181-196.
- Karkman A, Do TT, Walsh F, Virta MPJ. Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water. *Trends Microbiol.* 2018 Mar;26(3):220-228.
- Keerthi S. Guruge, Yukino A. Tamamura, Prasun Goswami, Rumi Tanoue, K.B.S.N. Jinadasa, Kei Nomiyama, Takeshi Ohura, Tatsuya Kunisue, Shinsuke Tanabe, Masato Akiba, 2021. The association between antimicrobials and the antimicrobial-resistant phenotypes and resistance genes of *Escherichia coli* isolated from hospital wastewaters and adjacent surface waters in Sri Lanka, *Chemosphere*, 2021.
- Kesty, N. C., & Kuehn, M. J. 2003. Incorporation of Heterologous Outer Membrane and Periplasmic Proteins into *Escherichia coli* Outer Membrane Vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 279(3), 2069–2076. doi:10.1074/jbc.m307628200
- Khalid *et al.*, 2016. The public health problem of OTC antibiotics in developing nations. *Research in Social and Administrative Pharmacy* 12, 801-802.
- Kim, J. Y., Jung, H. I., An, Y. J., Lee, J. H., Kim, S. J., Jeong, S. H., ... & Cha, S. S. (2006). Structural basis for the extended substrate spectrum of CMY-10, a plasmid-encoded class C  $\beta$ -lactamase. *Molecular microbiology*, 60(4), 907-916.
- Kolling, G.L. and Matthews, K.R. (1999) Export of virulence genes and shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 1843-1848.
- Kuo & Jia, 2017. Extracellular Vesicles: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*, vol. 1660.
- Kunin, C. M. *et al.* 1990. Report of a Symposium on Use and Abuse of Antibiotics Worldwide. *Clinical Infectious Diseases*, 12(1), 12–19.
- Kulp A, Kuehn MJ. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu Rev Microbiol.* 2010;64:163-84.

Kulkarni, H. M., Swamy, C. V., & Jagannadham, M. V. (2014). Molecular characterization and functional analysis of outer membrane vesicles from the antarctic bacterium *Pseudomonas syringae* suggest a possible response to environmental conditions. *Journal of proteome research*, 13(3), 1345-1358.

Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara GL, Gould IM, Goossens H, Greko C, So AD, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta AQ, Qamar FN, Mir F, Kariuki S, Bhutta ZA, Coates A, Bergstrom R, Wright GD, Brown ED, Cars O. Antibiotic resistance- the need for global solutions. *Lancet Infect Dis*. 2013 Dec;13(12):1057-98.

Liu, G., Thomsen, L. E., & Olsen, J. E. (2021). Antimicrobial-induced horizontal transfer of antimicrobial resistance genes in bacteria: a mini-review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 77(3), 556-567.

Lotvall *et al.*, 2014. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the international society for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*

Makkaew P, Kongprajug A, Chyerochana N, Sresung M, Precha N, Mongkolsuk S, Sirikanchana K. Persisting, 2021. Antibiotic resistance gene pollution and its association with human sewage sources in tropical marine beach waters. *Int J Hyg Environ Health*. 2021 Sep;238:113859.

Martinez 2009. The Role of Natural Environments in the Evolution of Resistance Traits in Pathogenic Bacteria. *Proc. R. Soc. London, Ser. B*, 276 (1667), 2521–2530.

McMahon, H. T., & Boucrot, E. (2015). Membrane curvature at a glance. *Journal of cell science*, 128(6), 1065-1070.

Moon, D. C., Choi, C. H., Lee, J. H., Choi, C. W., Kim, H. Y., Park, J. S., ... & Lee, J. C. (2012). *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A modulates the biogenesis of outer membrane vesicles. *The Journal of Microbiology*, 50(1), 155-160.

Nasarabadi, A., Berleman, JE, Auer, M. (2019). Vesículas de membrana externa de bactérias: estrutura, biogênese e função. In: Geiger, O. (eds) *Biogênese de ácidos graxos, lipídios e membranas. Manual de Microbiologia de Hidrocarbonetos e Lipídios*. Springer, Cham.

Ola Johnsborg, Vegard Eldholm, Leiv Sigve Håvarstein, 2007, Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function, *Research in Microbiology*, 767-778.

Prasert Makkaew, Akechai Kongprajug, Natcha Chyerochana, Montakarn Sresung, Nopadol Precha, Skorn Mongkolsuk, Kwanrawee Sirikanchana, 2021. Persisting antibiotic resistance gene pollution and its association with human sewage sources in tropical marine beach waters, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, Volume 238, 113859.

Paschoal *et al.* 2017. Concentration and Variety of Carbapenemase Producers in Recreational Coastal Waters Showing Distinct Levels of Pollution. *Antimicrob Agents Chemother*. 22;61(12).

Pencer & Hallett (2003). Effects of Vesicle Size and Shape on Static and Dynamic Light Scattering Measurements.

Pepper IL, Brooks JP, Gerba CP. Antibiotic Resistant Bacteria in Municipal Wastes: Is There Reason for Concern? *Environ Sci Technol*. 2018 Apr 3;52(7):3949-3959.

Pérez-Cruz C, Delgado L, López-Iglesias C, Mercade E (2015) Outer-Inner Membrane Vesicles Naturally Secreted by Gram-Negative Pathogenic Bacterias. *PLoS ONE* 10(1): e0116896.

Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog Glob Health*. 2015;109(7):309-18.

Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules*. (Figura 1), (Breijyeh Z, Jubeh B, Karaman R., 2020)

Rumbo, C., Fernández-Moreira, E., Merino, M., Poza, M., Mendez, JA, Soares, NC, ... & Bou, G. (2011). Transferência horizontal do gene OXA-24 carbapenemase via vesículas da membrana externa: um novo

mecanismo de disseminação de genes de resistência a carbapenem em *Acinetobacter baumannii*. *Agentes antimicrobianos e quimioterapia*, 55 (7), 3084-3090.

Sara Domingues, Kaare M Nielsen, 2017 Membrane vesicles and horizontal gene transfer in prokaryotes, *Current Opinion in Microbiology*, Volume 38, 2017, 16-21.

Schaar *et al* 2011. *Moraxella catarrhalis* outer Membrane vesicles carry  $\beta$ -lactamase and promote survival of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by inactivating amoxicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 3845–3853.

Schwechheimer C, Rodriguez DL, Kuehn MJ. NlpI-mediated modulation of outer membrane vesicle production through peptidoglycan dynamics in *Escherichia coli*. *Microbiologyopen*. 2015 Jun;4(3):375-89.

Sun, D. (2018). Pull in and push out: mechanisms of horizontal gene transfer in bacteria. *Frontiers in microbiology*, 2154.

Suzuki, S., Pruden, A., Virta, M. P. J., & Zhang, T. (Eds.) (2017). Antibiotic resistance in aquatic systems. (Frontiers Research Topics). Frontiers Media SA.

Sørensen, S. J., Bailey, M., Hansen, L. H., Kroer, N., & Wuertz, S. (2005). Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 700-710.

Spellberg B. The Maturing Antibiotic Mantra: "Shorter Is Still Better". *J Hosp Med*. 2018 May 1;13(5):361.362

Stokes & Gillings 2011. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* 35(5):790-819.

Strathdee, Steffanie A., Sally C. Davies e Jasmine R. Marcelin. “Enfrentando a resistência antimicrobiana além da pandemia de COVID-19 e das eleições de 2020 nos EUA”. *The Lancet* 396.10257 (2020): 1050-1053.

Takashi Azuma, Kana Otomo, Mari Kunitou, Mai Shimizu, Kaori Hosomaru, Shiori Mikata, Mao Ishida, Kanae Hisamatsu, Ayami Yunoki, Yoshiki Mino, Tetsuya Hayashi, Environmental fate of pharmaceutical compounds and antimicrobial-resistant bacteria in hospital effluents, and contributions to pollutant loads in the surface waters in Japan, *Science of The Total Environment*, 476-484.

Tarr, Phillip I. 1995. “*Escherichia Coli* O157:H7: Clinical, Diagnostic, and Epidemiological Aspects of Human Infection.” *Clinical Infectious Diseases* 20, no. 1–8.

Toyofuku, M., Tashiro, Y., Hasegawa, Y., Kurosawa, M., & Nomura, N. (2015). Bacterial membrane vesicles, an overlooked environmental colloid: biology, environmental perspectives and applications. *Advances in colloid and interface science*, 226, 65-77

Tran, F., Boedicker, J.Q, 2017. Genetic cargo and bacterial species set the rate of vesicle-mediated horizontal gene transfer. *Sci Rep* 7, 8813.

Understanding human health risks caused by antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) in water environments: Current knowledge and questions to be answered, (Figura 4), (Mohan Amarasiri, Daisuke Sano & Satoru Suzuki, 2019)

US Department of Health and Human Services. "Antibiotic resistance threats in the United States, 2013." *Centers for disease control and prevention* (2013): 1-113.

Van Boeckel, TP, Pires, J., Silvester, R., Zhao, C., Song, J., Criscuolo, NG, ... & Laxminarayan, R. (2019). Tendências globais da resistência antimicrobiana em animais em países de baixa e média renda. *Science*, 365 (6459), eaaw1944.

Vieira *et al.*, 2008. Relationships between bacterial diversity and environmental variables in a tropical marine environment, Rio de Janeiro. *Environ. Microbiol.*

von Wintersdorff CJ, Penders J, van Niekerk JM, Mills ND, Majumder S, van Alphen LB, Savelkoul PH, Wolffs PF. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front Microbiol.* 2016 Feb 19;7:173.

Warish Ahmed, Qian Zhang, Aldo Lobos, Jacob Senkbeil, Michael J. Sadowsky, Valerie J. Harwood, Nazanin Saeidi, Oswald Marinoni, Satoshi Ishii, 2018. Precipitation influences pathogenic bacteria and antibiotic resistance gene abundance in storm drain outfalls in coastal sub-tropical waters, *Environment International*, Volume 116, 2018, 308-318.

WHO 2017a. Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including *Mycobacterium tuberculosis*.

WHO 2017b. Antibiotic-resistant priority pathogens list.

Wozniak RA, Waldor MK. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Aug;8(8):552-63.1