




## Microvesículas bacterianas secretadas y su potencial uso en el desarrollo de vacunas

María Cristina González-Vázquez<sup>1</sup> , Álvaro Asaf Guerra-Martínez<sup>2</sup> , Betsabé Escobedo-Herrera<sup>2</sup> ,  
Alejandro Carabarin Lima<sup>2,3\*</sup> 

<sup>1</sup>Herbario y Jardín Botánico Universitario, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Ciudad Universitaria, San Manuel, Puebla, México. C. P. 72570. <sup>2</sup>Licenciatura en Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Ciudad Universitaria, San Manuel, Puebla, México. C. P. 72570. <sup>3</sup>Instituto de Ciencias, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Ciudad Universitaria, San Manuel, Puebla, México. C. P. 72570.

\*Email autor para correspondencia: [alejandro.carabarin@correo.buap.mx](mailto:alejandro.carabarin@correo.buap.mx)

**Recibido:** 14 julio 2022. **Aceptado:** 20 octubre 2022

### RESUMEN

Las microvesículas de membrana externa secretadas por bacterias, son estructuras microscópicas, conformadas por parte de la membrana y pared bacteriana, contienen diferentes componentes como proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos y otros metabolitos. En el género bacteriano, se describieron inicialmente en bacterias Gram-negativas, sin embargo, de manera reciente se han identificado en las bacterias Gram-positivas. Al principio no se conocía cuál era la composición de estas microvesículas secretadas, sin embargo, debido a los avances en proteómica y genómica han permitido identificar en estas estructuras una amplia variedad de proteínas involucradas en diversas funciones celulares, como la inmunomodulación. También se han identificado ácidos nucleicos como ADN y ARN portando genes codificantes para diferentes factores de adherencia y virulencia. Por esta razón, las microvesículas se han asociado a diversos procesos de patogenicidad, donde algunas proteínas identificadas promueven los procesos de migración, e invasión de bacterias hacia las células del huésped y de esta manera estimulan los procesos de interacción microorganismo-hospedero. Debido a la importante función que tienen estas microvesículas, se ha propuesto utilizarlas como posibles componentes vacunales en contra de bacterias patógenas. Por lo tanto, en esta revisión se analizan temas importantes como la biogénesis, el contenido intracelular y extracelular asociado a las microvesículas, así como el cargo asociado y su potencial uso para el desarrollo de vacunas a base de microvesículas secretadas.

**Palabras clave:** Bacterias; cargo; microvesículas; vacunas.

## ABSTRACT

The outer membrane microvesicles secreted by bacteria are microscopic structures and are constituted by part of the membrane and bacterial wall, it contains different components such as proteins, carbohydrates, lipids, nucleic acids, and other metabolites. In the bacterial genus, they were initially described in Gram-negative bacteria, however, it has recently been identified in Gram-positive bacteria. At first, the composition of these secreted microvesicles was unknown, however, due to advances in proteomics and genomics, a wide variety of proteins involved in various cellular functions, such as immunomodulation, have been identified in these structures. Nucleic acids such as DNA and RNA carrying genes encoding different adhesion and virulence factors have also been identified. For this reason, microvesicles have been associated with several pathogenicity processes, where some identified proteins promote the processes of migration and invasion of bacteria towards host cells and thus stimulate the processes of microorganism-host interaction.

Due to the important function of these microvesicles, it has been proposed to use them as possible vaccine components against pathogenic bacteria. Therefore, important issues such as biogenesis, intracellular and extracellular content associated with microvesicles, as well as associated cargo and its potential use for the development of secreted microvesicle-based vaccines are discussed in this review.

**Keywords:** Bacteria; cargo; microvesicles; vaccines.

## METODOLOGÍA

Para esta revisión, todos los estudios elegibles sobre vesículas de membrana externa (OMVs, por sus siglas en inglés) secretadas por bacterias causantes de enfermedades infecciosas en humanos, publicados desde 1995 hasta 2021 se buscaron sistemáticamente en bases de datos electrónicas como; Google Scholar, PubMed, Scopus y Science direct, se utilizaron palabras clave en inglés de la siguiente manera: biogenesis AND OMVs, immune response AND OMVs, Gram-negative bacteria AND OMVs, Gram-positive bacteria AND OMVs, Vaccines AND OMVs, infectious disease AND OMVs, biotechnology AND OMVs. Se

consideraron los estudios publicados en idioma inglés, que presentaran un texto completo. Además, para identificar artículos pertinentes adicionales mediante referencias de estudios recuperados, se realizó una búsqueda manual. Los estudios no considerados fueron aquellos sobre OMVs de organismos eucariotas, estudios relacionados con enfermedades de origen no bacteriano y artículos del tipo editoriales, cartas al editor, comentarios, resúmenes de conferencias, artículos duplicados o en otro lenguaje diferente al inglés. Inicialmente se descargaron 350 artículos los cuales fueron revisados, descartándose los que no pudieron ser considerados para este estudio, posteriormente

se revisaron 230 artículos descartándose los estudios con información preliminar de los mismos grupos de trabajo y seleccionando los más actuales, finalmente para la escritura de esta revisión se consideraron 87 artículos.

## INTRODUCCIÓN

La estrecha comunicación entre las células es esencial para la supervivencia de cualquier sistema vivo, este proceso puede estar mediado por factores solubles, moléculas de adhesión y moléculas presentes en la superficie celular [1]. En 2006 Rataczak J *et al.*, proponen una nueva forma de comunicación intracelular la cual podría ser mediada por Microvesículas (MVs) [2]. Anteriormente, las MVs fueron consideradas como restos celulares inertes sin ninguna función, lo que podría ser la consecuencia de algún daño a las células, o podrían ser el resultado de un intercambio transmembranal que causaría la secreción de MVs [3].

Sin embargo, en 1996 Raboso *et al.*, observaron cambios en los linfocitos B debido a la presencia de MVs secretados por el virus Epstein-Barr [4]. A partir de ese momento, las MVs comenzaron a tener importancia médica, debido a que las MVs secretadas por algunos patógenos podían modificar la estructura celular en las células del hospedero para invadir y diseminarse a otros tejidos [5].

En un trabajo realizado por Kadurugamuwa y Beveridge en 1995, se demostró que la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* secretaba MVs, las cuales contenían en su interior a las proteínas:

fosfolipasa C, fosfatasa alcalina y hemolisina; por lo tanto, este grupo propuso que las MVs pudieran servir como una reserva de factores de virulencia, las cuales permitirían a las bacterias llevar a cabo su patogénesis en el huésped [6].

En un trabajo realizado por Beveridge en 1996, observó que la secreción de vesículas, podrían mantener a las colonias bacterianas íntegras ante varias condiciones adversas, como la presencia de antibióticos o condiciones de estrés físico o químico [7]. Al realizar estudios de proteómica en las MVs, se encontraron una variedad de proteínas involucradas en procesos de patogénesis como el lipopolisacárido (LPS), el cual es característico de las bacterias Gram-negativas y otra proteína encontrada llamada HUMY la cual se une al grupo hemo. Estas proteínas permiten la unión de la bacteria a las células del hospedero, para posteriormente activar una serie de vías de señalización, y permitir el proceso de invasión [8].

A partir de 1995 hasta 2013 ha habido un incremento significativo en el estudio de estas MVs, en bacterias patógenas, lo cual permitió conocer los mecanismos de invasión de estas bacterias al hospedero [9]. Se han utilizado diferentes términos para referirse a las MVs en bacterias, como exosomas, vesículas, microvesículas, ectosomas o macropartículas [10]. Sin embargo, el término más utilizado para referirse a las MVs de origen bacteriano tanto bacterias Gram-negativas como en Gram-positivas, es el de vesículas de membrana externa (OMVs, por sus siglas en inglés) [9].

## Funcionalidad de las OMVs

Las OMVs tienen diversas funciones fisiológicas y patológicas para la supervivencia de bacterias, teniendo una función multifacética y que influye en la ecología bacteriana [11]. Entre su participación prominente, se encuentra su uso como vehículos de toxinas bacterianas a células eucariotas, y es que una posibilidad es que las OMVs de origen natural funcionan como un sistema de suministro a larga distancia de componentes específicos. Además de ser reconocidas por su papel en la adquisición de nutrientes, respuestas al estrés y liberación de toxinas, así como tener factores de adhesión y virulencia para evadir el sistema de defensa del hospedero asociado a su liberación natural [12]. Las OMVs permiten que las enzimas alcancen objetivos distantes de forma concentrada, protegida y dirigida [13]. Siendo una de sus funciones, la degradación de biomoléculas complejas en el medio de cultivo con la finalidad de que los nutrientes estén disponibles [14]. Por lo tanto, estas microvesículas desempeñan un papel relevante en la transferencia de nutrientes entre especies. Además de que pueden aliviar el estrés causado por los antibióticos peptídicos dirigidos a la membrana, como la polimixina B, actuando como dianas señuelo y transportando estas moléculas fuera de la célula [11]. Si bien los microorganismos se encuentran en competencia continuamente en el medio ambiente, las OMVs producidas por una bacteria pueden inducir la muerte de otros microorganismos, incluso entre bacterias

Gram-negativas y Gram-positivas [14]. Las microvesículas de algunas bacterias tienen enzimas bacteriolíticas capaces de distinguir entre células propias y no propias, alcanzando o no a las bacterias que las rodean. En las microvesículas, las hidrolasas de peptidoglicano presentes son las mismas que las de otra cepa, la capa de peptidoglicano no puede ser escindida por la enzima. Sin embargo, si las OMVs se fusionan con células de una cepa que no es propia, entonces la enzima puede degradar la pared celular e inducir la muerte bacteriana [14].

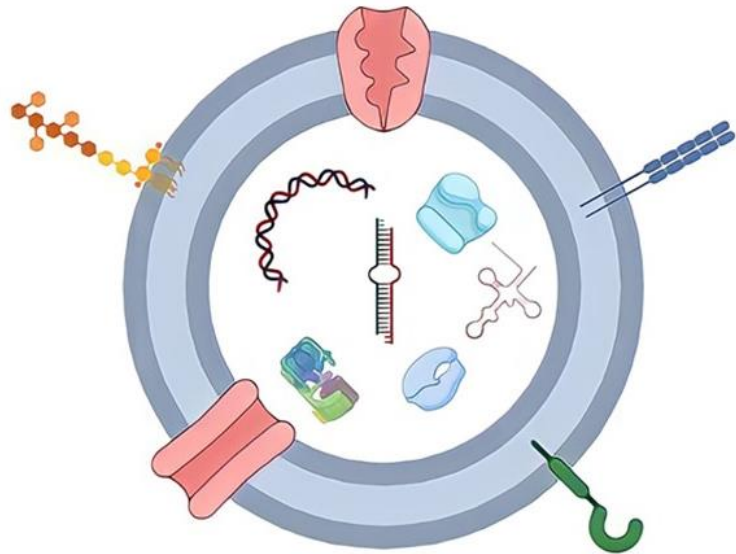
Un mecanismo importante de destacar es la secreción de OMVs para diseminar factores de virulencia que permiten el establecimiento de las bacterias y como resultado causar una infección bacteriana [15]. Las bacterias pueden regular y modular el sistema inmunológico innato del hospedero para establecer una infección. Por lo tanto, las OMVs pueden generar mecanismos defensivos como ofensivos durante la infección (Figura 1). A la defensiva, son usadas para secuestrar antibióticos, bacteriófagos y anticuerpos; unir o degradar péptidos antimicrobianos; y cebo de antígenos al activar a los receptores denominados PAMP's (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos) con la finalidad de distraer al sistema inmunológico. El potencial de las microvesículas como armas ofensivas es la capacidad de administrar auto lisinas y factores de virulencia o citotoxinas que afectan a las células del hospedero [11].

**Funciones defensivas de las OMVs:**

1. Supresión de la respuesta inmunológica
2. Envío de factores de resistencia
3. Promoción de la formación de Biopelícula
4. Disminuir condiciones de estrés
5. Obtención de nutrientes
6. Activación y modulación de Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP's)

**Funciones ofensivas de las OMVs:**

1. Inducción de muerte a bacterias competidoras
2. Envío de factores de virulencia
3. Activación de una respuesta inflamatoria
4. Alteración del tejido del hospedero



**Aplicaciones biotecnológicas de las OMVs:**

1. Entrega de Fármacos
2. Función de adyuvante
3. Desarrollo de vacunas
4. Bionanofábrica

**Figura 1.** Representación esquemática de una OMV. En la Figura se ilustra una OMV con las proteínas y receptores asociados a membrana, así como el contenido intra microvesícula que comprende ácidos nucleicos y proteínas (toxinas, factores de virulencia, enzimas). También se muestran las funciones ofensivas y defensivas de las OMVs utilizadas en las interacciones bacteria-bacteria y bacteria-huésped; así como sus posibles aplicaciones biotecnológicas. Creado con BioRender.com.

**Composición de OMV**

El estudio y el análisis de las microvesículas ha revelado sus constituyentes principales, como proteínas y lípidos, los cuales varían según la entidad de origen. Con los grandes avances de la tecnología a lo largo del tiempo se han realizado perfiles proteómicos basados en la espectrometría de masas, gracias a esto se han identificado miles de proteínas presentes en las microvesículas, proporcionado información para revelar la biogénesis y las funciones fisiopatológicas de las OMVs bacterianas Gram-negativas [16]. Diferentes análisis han demostrado una gran abundancia de proteínas

de membrana externa (Omp) en las OMV como OmpA, OmpC y OmpF, proteínas periplásmicas (AcrA y fosfatasa alcalina) y varios factores de virulencia implicados en la invasión y adhesión a los tejidos del hospedero [12]. Los datos sugieren que la localización de las proteínas, en las células de origen, influye en gran medida su inclusión en las OMVs, como se observa en *Serratia marcescens* y *Helicobacter pylori* donde las proteínas periplasmáticas asociadas con la parte interna de la membrana externa, presentan una mayor incorporación dentro de las OMVs, en comparación con las proteínas que están unidas

a la membrana interna [17,18]. En palabras más sencillas, el contenido proteico de las OMVs se encuentra influenciado por el contenido de proteínas de la membrana exterior celular de las que provienen, esto significa que mantienen las características específicas de la cepa de origen. En contraste con las proteínas celulares, las contenidas en OMVs son proteínas relacionadas con la región extracelular, la membrana externa, el periplasma, y la membrana interna [16]. Además, se encuentran enriquecidas con proteínas asociadas a patogénesis, plegamiento de proteínas, ensamblaje de la membrana externa y transporte de sideróforos. Estos hallazgos ponen el camino para comprender la biogénesis y mecanismos fisiopatológicos de las OMVs.

### **Inmunomodulación en el hospedero**

Como se ha descrito a lo largo del texto, las funciones biológicas de las microvesículas son diversas, pueden funcionar como medios de transporte para moléculas señalizadoras y activadoras de la formación de biopelícula, hasta como entidades encargadas de la adhesión, crioprotección [19]. Entre las respuestas de adaptación de las bacterias a los cambios ambientales, se sabe que las de la membrana y pared celular son las más significativas. Por lo tanto, se han observado varios mecanismos con los cuales, las bacterias cambian tanto su membrana como el medio extracelular en presencia de diferentes factores ambientales que causan estrés en el microorganismo. Entre estos mecanismos, la

liberación de OMVs en bacterias Gram-negativas ha despertado interés, debido a su participación en procesos de patogenicidad. Las OMVs se han asociado con la capacidad de incrementar la virulencia de la bacteria, principalmente en el patógeno *Pseudomonas aeruginosa*, el cual, libera factores de virulencia por medio de las OMVs para adherirse al epitelio del pulmón humano; desde el descubrimiento de este fenómeno, se han encontrado mecanismos similares en muchas otras bacterias Gram-negativas [6]. De esta manera, se ha determinado que las microvesículas realizan una función inmunomoduladora, regulando la entrega de diferentes constituyentes a las células receptoras, permitiendo el mantenimiento de la virulencia y la colonización por parte de las bacterias en diferentes hospederos [20]. Las OMVs se relacionan con el aumento de la adhesión de las bacterias a los tejidos del huésped, lo que les ayuda a resistir su eliminación física por parte del hospedero, así como con PAMP's como lipopolisacáridos y porinas, los cuales provocan una fuerte respuesta inmune en células endoteliales, induciendo la expresión de citocinas y otro tipo de moléculas que participan en la respuesta inmune innata, de tal manera que la respuesta por parte del hospedero es exacerbada, ocasionando daños en células, tejidos y órganos. Por otro lado, se han encontrado en OMVs, lo que parecen ser super antígenos, como leucotoxinas, LPS y ClyA, los cuales tienen la característica principal de ser más potentes que sus formas solubles [21]. La

secreción de estas moléculas, como toxinas y factores de virulencia, ayudan a las bacterias a invadir al hospedero de manera más eficiente, así como a secuestrar su maquinaria de señalización y evadir el sistema inmune, modulándolo, lo cual es fundamental para su supervivencia.

### OMVs en bacterias Gram-negativas

El inicio en el estudio de las OMVs de este género bacteriano comenzó a partir de 1960 mediante el uso de microscopía electrónica [22]. Sin embargo, debido a la aparición de diferentes técnicas moleculares y proteómicas; como la electroforesis de primera y segunda dimensión; así como el uso de técnicas de análisis de espectrometría de masas como MALDI-TOF, han permitido conocer los componentes de OMVs en varias bacterias Gram-negativas e incluso ha sido posible dilucidar las condiciones en las que hay un aumento significativo en la secreción de estas OMVs. En la bacteria *E. coli*, se observó que la variación en la temperatura aumenta la secreción de OMVs, debido al aumento en la fluidez en la doble membrana [23].

### Biogénesis de OMVs en bacterias Gram-negativas

La biogénesis se describe como el fenómeno de formación y brote de las OMVs al exterior de la célula de origen. Sin embargo, hasta ahora no se conoce con exactitud cómo se inicia este proceso en las células, recientemente se ha descrito un posible mecanismo, el cual de

manera general explicaría cómo se lleva a cabo en las bacterias Gram-negativas. Se cree que la acumulación de ciertos componentes en el espacio periplásmico, podrían inducir en el interior de la célula una serie de rutas de señalización la cuales activarían los procesos de secreción de las OMVs [24].

La membrana de las bacterias Gram-negativas está formada por una membrana externa, una membrana interna y un espacio periplásmico. En la membrana externa hay una doble capa de fosfolípidos, en ella encontramos ancladas varias proteínas como las porinas OmpA y OmpC, así como un lipopolisacárido llamado LPS, el cual es característico de este género. Inmediatamente en el espacio periplásmico se encuentra una capa de péptido glucano, en el que se encuentra la lipoproteína (Lpp), que permite la unión con la membrana externa. En la membrana interna encontramos las proteínas TolQ, TolR y la proteína integral TolA que cruza el espacio periplásmico y se une con el complejo Tol-Pal, el cual hace contacto directo con la membrana externa. La baja concentración de la proteína Lpp, en algunas zonas de la membrana podría inducir la acumulación de ciertas proteínas en la membrana lo cual podría inducir la secreción de las OMVs [23].

En *P. aeruginosa*, se ha descrito la participación de la proteína señal de quinolona (PQS), la cual podría desestabilizar una región rica en pentasacáridos del LPS, causando una curvatura en la membrana y la posterior expulsión de las OMVs [6]. Sin embargo, esta proteína no se ha encontrado en el resto de las

bacterias Gram-negativas, por esta razón se cree que otras proteínas como OmpA, encontradas en *E. coli*, podrían estar regulando este proceso [24].

### **Cargo de las OMVs en bacterias Gram-negativas**

Los OMVs se han definido como portadores naturales de una amplia variedad de biomoléculas. Se han encontrado proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, los cuales constituyen el llamado cargo de las OMVs.

Desde 2007, con el uso de técnicas como las de ultra centrifugación y biología molecular, así como las ciencias ómicas mencionadas anteriormente, han permitido identificar una gran cantidad de biomoléculas, las cuales son importantes en la patogénesis.

Mediante el uso de técnicas de proteómica como la electroforesis de proteínas (SDS-page), secuenciación, MALDI-TOF y western-blot, ha sido posible identificar una gran cantidad de proteínas presentes en las OMVs. Las proteínas identificadas en OMVs se han clasificado en tres grupos.

En la primera categoría, se encuentran las proteínas de membrana como porinas, proteínas de transporte, adhesinas, fosfolipasas, proteasas y proteínas como la flagelina y pilina [24]. Las porinas identificadas hasta ahora en la membrana externa de las OMVs son OmpA, OmpC, OmpE y OmpF las cuales tienen un peso molecular aproximado de 40 kDa. La función de estas proteínas es permitir la entrada de moléculas como carbohidratos, iones,

aminoácidos o antibióticos como la fluoroquinolona en la bacteria [25]. Otra proteína identificada en las OMVs es la proteína de unión a la transglicosilasa de 30 kDa: MltA, la cual interactúa con otras como la proteína OmpV [26].

En la segunda categoría se encuentran las proteínas con función tóxica como la citolisina, las proteasas y las ureasas [24]. En las OMVs secretadas por *Salmonella*, se han encontrado proteínas involucradas como factores de virulencia, tal es el caso del regulón PhoP / PhoQ, el cual regula la expresión de al menos el 1% de los genes en la bacteria Gram-negativa e incluso se han encontrado factores transcripcionales como PagC o PagK1 / K2 y PagJ, los cuales participan en el sistema de secreción [27]. Las OMVs secretadas por la bacteria *Legionella pneumophila* presentan a las proteínas ácido fosfatasa (Mapa), proteasa (Msp) y quitinasa (ChiA), las cuales se encuentran involucradas en el sistema de secreción tipo IV, debido a su capacidad de adherirse a las células del epitelio del huésped [28]. Hasta ahora, se han descrito siete sistemas de secreción en bacterias Gram-negativas; los cuales le permiten adherirse a las proteínas de las células del hospedero e invadir, por lo anterior, se ha propuesto que la secreción de OMV sea considerada como un nuevo sistema de secreción tipo cero, debido a la gran cantidad de proteínas secretadas e involucradas en los procesos de invasión al hospedero [29].

En la tercera categoría se encuentran las proteínas con funciones diversas, pero directamente involucradas en la invasión de



bacterias Gram-negativas al hospedero. En esta categoría encontramos el factor de alargamiento (EF-Tu), proteínas GADPH, chaperonas, proteínas de choque térmico y enzimas enolasas. Esta última proteína cataliza la transformación de 2-fosfoglicerato en 2-fosfoenolpiruvato durante la glucólisis, es decir se encuentra involucrada en el metabolismo de la bacteria. Sin embargo, la enolasa se ha clasificado recientemente en un grupo de proteínas llamadas multifuncionales (moonlighting) [30]. Este grupo de proteínas se caracteriza por presentar diferentes funciones, por lo cual se cree que la enolasa no solo tiene la función de unión a plasminógeno, además podría tener otra función como adhesina la cual establecería la unión del patógeno con el hospedero [31].

Otra proteína localizada en las OMVs, es la proteína con una función de chaperona de 60 kDa llamada GroEL, esta proteína heptamérica es importante durante el proceso de plegamiento de proteínas [32]. En *Shigella flexneri*, en sus OMVs se identificaron las proteínas IpaB, IpaC e IpaD que tienen la función de invadir las células diana [33].

Otra biomolécula importante en las OMVs son los lípidos, los cuales son componentes importantes en la membrana de las bacterias Gram-negativas, debido a que mantienen la estructura y la rigidez de la célula bacteriana.

La composición de fosfolípidos de la membrana de las OMVs es similar a los lípidos ubicados en la doble bicapa lipídica de las bacterias Gram-negativas. En las OMVs secretadas por

*E. coli*, se logró identificar una gran cantidad de lípidos, como fosfogliceroles, fosfoidiletanolamidas, fosfoatidil glicerol y cardiolipinas, componentes esenciales en la membrana de este género [34].

*Helicobacter pylori* es una de las pocas bacterias que presenta colesterol en su membrana, por este motivo este lípido también se ha encontrado en la membrana de las OMVs secretadas por esta bacteria [18,24].

Las OMVs presentan en su interior material genético, el cual podría incorporarse en la célula huésped, aunque esta hipótesis aún no se ha confirmado [12]. Sin embargo, se sabe que el material genético localizado en el interior de las OMVs son ADN plasmídico, ADN de fago, ADN cromosómico [35] y ARN [12,36]. Este último ha adquirido importancia debido a la capacidad de inhibir la expresión de ciertos ARN mensajeros del hospedero. Tal es el caso del ARN pequeño no codificante (sARNs) denominado MicF el cual fue encontrado en las OMVs secretadas por la bacteria *E. coli*, en los cuales se observó que este sARNs tenía la capacidad de sobreexpresar la porina OmpF localizada en la membrana de las OMVs [37]. Otro tipo de ARN también se ha identificado en el interior de las OMVs como los micro ARNs (msARN), los cuales son similares a los miARN localizados en las MVs de las células eucariotas. Los msARN tiene la capacidad de suprimir la expresión de algunas citocinas como IL-5, IL-13 y IL-15 [38]. E inclusive en las OMVs secretadas por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, se ha purificado un conjunto de aproximadamente 4 sARN

denominados ASdes, Aspks, AS1726 y AS1890. El sARN Asdes, se ha detectado en el plasma de pacientes con tuberculosis, este mecanismo es similar a los miARN de las células eucariotas los cuales han servido como biomarcadores de diagnóstico de etapas tempranas en procesos cancerígenos. Por lo cual, en un futuro se podrían utilizar los ARN de las OMVs en el diagnóstico de bacterias patógenas [38].

### Funciones de las OMVs

Las OMVs secretadas por bacterias patógenas tienen la capacidad de transferir una gran cantidad de biomoléculas, como proteínas, ADN o ARN [12], para establecer una comunicación con la célula diana y poder invadir. Por lo anterior las OMVs presentan una gran variedad de funciones involucradas en mecanismos de defensa del patógeno, así como procesos de evasión de la respuesta inmune.

Las OMVs secretadas por las bacterias Gram-negativas patógenas presentan proteínas involucradas en los mecanismos de supervivencia / defensa del patógeno, estas proteínas tienen la capacidad de suprimir la respuesta inmune del huésped e inducir mecanismos de defensa del patógeno. Uno de esos mecanismos de defensa es la formación de biopelículas [39]. La biopelícula es una estructura formada por la agregación conjunta de bacterias, que permite proteger la bacteria de varios agentes adversos, como los antibióticos. Durante la formación de esta estructura, bacterias como *P. aeruginosa* secretan OMVs,

las cuales liberan un exopolisacárido al medio, para mantener unidas a las bacterias y formar un conglomerado bacteriano [40]. Otras proteínas identificadas en las OMVs involucradas en los mecanismos de defensa de los patógenos, son aquellas proteínas involucradas en los mecanismos del estrés oxidativo, como la proteína superóxido dismutasa (SOD), encontrada en las OMVs secretadas por la bacteria *Acinetobacter baumannii*, esta proteína inhibe los agentes oxidativos como peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y al ión superóxido ( $O_2^-$ ) secretados por las células inflamatorias de los macrófagos [12,41].

En los últimos años, la resistencia a los antibióticos en bacterias Gram-negativas ha aumentado considerablemente en todo el mundo. Uno de los múltiples mecanismos de resistencia a los antibióticos podría ser la secreción de OMV, las cuales sirven como vehículos para los genes involucrados en la resistencia a antibióticos [42]. Las OMVs secretadas por *P. aeruginosa* presentan un gen el cual codifica para una  $\beta$ -lactamasa, la cual inhibe la entrada de los antibióticos de la familia de los betalactámicos [43]. Otros genes encontrados en las OMVs del patógeno hospitalario *Streptomonas maltophilia* son los que codifica para las enzimas L1 metalo  $\beta$ -lactamasa y L2 serin  $\beta$ -lactamasa [44].

Las OMVs secretadas por el patógeno entérico *Salmonella typhimurium* causante de la salmonelosis en la población, sus OMVs secretan una  $\beta$ -lactamasa, la cual es capaz de degradar los antibióticos de tercera generación

como las cefalosporinas [45]. Los carbapenémicos son los antibióticos de elección para eliminar a *Acinetobacter baumannii*, sin embargo, las OMVs secretadas por esta bacteria tienen un plásmido en el cual se presenta una blaOXA-24, un gen codificante para una  $\beta$ -lactamasa, esta proteína degrada antibióticos  $\beta$ -lactámicos y de manera reciente se ha identificado a las OMVs como responsables de eventos de transferencia horizontal de genes relacionados con la resistencia a estos antibióticos, en estos estudios se utilizaron OMVs purificadas de aislados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a  $\beta$ -lactámicos y las cuales fueron usadas para interactuar con una cepa de *K. pneumoniae* no resistente, se demostró la eficiencia de transformación de las OMVs purificadas así como la transferencia del plásmido llevando el gen responsable de la resistencia en esta cepa no resistente. Mas aún, este experimento de transformación de OMVs se realizó con distintas bacterias como *E. coli*, *S. enterica*, *P. aeruginosa*, demostrándose la adquisición del gen de resistencia para antibióticos  $\beta$ -lactámicos, estos resultados indican que la transferencia de genes a través de plásmidos mediante OMVs se puede realizar de manera intraespecífica e interespecífica [46,47]. Debido a lo anterior, la secreción de OMVs por diversas bacterias patógenas, podría ser la causa de encontrar cepas multidrogosresistente a diferentes antibióticos de primera y segunda generación, de manera reciente en hospitales [48].

### OMVs en bacterias Gram-positivas

A partir de 2009, comenzaron a publicarse trabajos relacionados con la purificación de OMVs en bacterias Gram-positivas. Para 2013, estos estudios representaron solo el 3% de todo el trabajo relacionado con las OMVs. Las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* fueron en las que inicialmente se purificaron las OMVs pertenecientes a dicho género, estas OMVs tenían características particulares, como la presencia de una estructura membranosa más simple en comparación con las Gram-negativas e incluso el tamaño, de estas oscilan entre 20-100 nm [9].

Debido a los avances de la microscopia ha sido posible identificar las OMVs secretadas por las bacterias *Streptococcus mutans*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Propionibacterium acnes*, *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium ulcerans* y *Streptomyces Lividans* [49].

Al igual que las OMVs secretadas por las bacterias Gram-negativas, las OMVs de las bacterias Gram-positivas también sirven para evadir y modular la respuesta inmune del hospedero, lo cual permite la infección e invasión de las bacterias. Además de favorecer la sobrevivencia de patógenos ante la presencia de antibióticos [49].

La gran cantidad de factores de virulencia presentes en las OMVs de las bacterias Gram-positivas podría causar daños graves al hospedero. Las proteínas como las coagulasas, las hemolisinas, la inmunoglobulina del tipo IgG y la proteína N-acetilmuramoil-L-alanina-amidasa, presentes en las OMVs de la bacteria *Staphylococcus aureus* [50-52], estas pueden inducir un proceso de inflamación severo en las vías respiratorias [53]. En 2011, Hong SW y col. informaron por primera vez la relación de las OMVs de *S. aureus* con la presencia de la dermatitis atópica [54]. Sin embargo, no fue sino hasta 2014 donde se encontró en las OMVs, la proteína alfa hemolisina, la cual induce de manera significativa la respuesta inflamatoria en el hospedero [55]. No todas las OMVs secretadas por bacterias Gram-positivas presentan proteínas con algún efecto negativo en el hospedero, las OMVs secretadas por bacterias como *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum*, son capaces de inducir en el organismo una respuesta favorable, por tal motivo se han usado como probióticos en los alimentos de consumo diario para humanos [49].

### **Las OMVs utilizadas con fines de vacunación**

El principio básico para el desarrollo de una vacuna es aislar, inactivar e inmunizar [56]. Sin embargo, debido a los avances en la ciencia, esto ha permitido el desarrollo de métodos más efectivos para la selección de una vacuna, la

cual sea eficiente y segura.

Las OMVs son vehículos no replicativos, compuestos por una gran cantidad de proteínas, las cuales permiten la comunicación de las bacterias con otras células de su propio origen o bien con las células diana, esta comunicación le permite modificar el entorno en el que se encuentran para permitir la sobrevivencia de la bacteria. Las OMVs contienen proteínas con funciones inmunomoduladoras que les permiten inducir una respuesta adaptativa en el hospedero e incluso activar una respuesta humoral y una respuesta celular [57].

### **Interacción de las OMVs con las células diana y la respuesta inmune**

La entrada de las OMVs a las células diana puede ser por diversos mecanismos como la macropinocitosis o bien por procesos de endocitosis [58].

El LPS localizado en las OMVs, ingresa a las células diana mediante un proceso de endocitosis provocando el aumento de la concentración de una proteína llamada caspasa 11, la cual podría inducir la secreción de citocinas proinflamatorias [59]. Las OMVs secretadas por *H. pylori* presentan en su superficie un complejo de proteínas las cuales son reconocidas por el hospedero como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS), las cuales se unen a los receptores tipo Toll (TLRs) de las células diana, principalmente el TLR-4 el cual interacciona con otras proteínas además del LPS [60]. Una vez que se lleva a cabo la interacción, esta es

capaz de activar la respuesta inmune del hospedero provocando un incremento considerable de células inflamatorias como neutrófilos y macrófagos, así como de células dendríticas. Las OMVs son capaces de inducir en los neutrófilos una variedad de citocinas proinflamatorias como interleucina 1- $\beta$ , IL-8, factor tumoral de necrosis  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), e inclusive algunas pueden activar la secreción del factor necrotizante citotóxico (CNF-1) [58]. Los macrófagos también secretan citocinas ante la presencia de las OMVs debido a que algunas proteínas presentes son capaces de unirse a los receptores TLR2/4 de la célula inflamatoria e inducir la activación de factores de transcripción los cuales permitirán la secreción de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, e inclusive óxido nítrico [61,62]. Se ha

observado que las OMVs secretadas por *Shigella boydii* son capaces de polarizar una respuesta inmune tipo T cooperadora del tipo Th1 en los macrófagos vírgenes (Tipo 0 o naïve) a nivel peritoneo en ratones [63]. Por tal motivo se podría pensar que la respuesta inmune activada por las OMVs podría ser capaz de eliminar al patógeno [58]. Otras células importantes en la respuesta inmune son las células dendríticas, las cuales al unirse las OMVs a sus receptores, éstas secretan citocinas como IL-6 e IL-1 $\beta$ , las cuales son secretadas por la activación de factores transcripcionales como NF $\kappa$ B [64]. Diversos estudios realizados *in vitro* con diferentes células han demostrado el papel de las OMVs como causantes de procesos inflamatorios (Tabla 1).

**Tabla 1.** Estudios *in vitro* evaluando los efectos de las OMVs en líneas celulares.

Origen de OMVs/Línea celular	Resultados del estudio	Referencias
<i>Odoribacter splanchnicus</i> / células HT-29	Las OMVs provocaron una disminución significativa en la producción de IL-8 con respecto al control LPS de <i>E. coli</i> . Se plantea el efecto antiinflamatorio de las OMVs en el epitelio intestinal	[65]
<i>Escherichia coli</i> / células endoteliales microvasculares (HMVECs)	Las OMV aumentaron la expresión de la molécula de adhesión intercelular endotelial 1 (ICAM-1), la selectina E y la molécula de adhesión de células vasculares 1. La participación de las OMVs es importante en los procesos inflamatorios independientes de la presencia de la bacteria.	[66]
<i>Salmonella typhimurium</i> / Macrófagos J774 y células dendríticas	Se estimuló a macrófagos para producir óxido nítrico (NO) y TNF- $\alpha$ . En células dendríticas, se favoreció su maduración y secreción de IL-12 y TNF- $\alpha$ .	[67]
<i>Francisella tularensis</i> / macrófagos derivados de medula ósea	Las OMVs activan a los macrófagos y favorecen la liberación de citocinas proinflamatorias como IL4, IL10, IL TNF- $\alpha$ .	[68]
<i>Bordetella pertussis</i> / células epiteliales pulmonares A549	Las OMVs se adhieren fuertemente a las células epiteliales, pero el suero anti-OMV inhibe la adhesión de la bacteria a las células pulmonares.	[69]
<i>Neisseria lactamica</i> expresando el antígeno SmTSP-2 de <i>Schistosoma mansoni</i> / células de bazo	Las OMVs inducen en las células de bazo la diferenciación de una gran cantidad de linfocitos T CD4+ y CD8+ que expresan IFN - $\gamma$ , IL-4 e IL-2.	[70]

### OMV como posibles vacunas

A partir de la comprensión de las OMVs y sus beneficios para las bacterias, se han desarrollado vacunas con base en las OMVs secretadas. En *Klebsiella pneumoniae* se han realizado estudios de vacunación con OMVs secretadas de la misma bacteria, en estos resultados se demostró la inducción de una respuesta inmune humoral mediada por IgG dosis dependiente de OMVs, e inmune celular mediada por Linfocitos CD4+ productores de IFN- $\alpha$  la cual resultó favorable para la sobrevivencia del modelo murino cuando se inmunizó con OMVs y posteriormente fueron experimentalmente infectados con una dosis letal de *K. pneumoniae*, demostrándose una sobrevivencia del 100 % comparado con los animales no inmunizados [71].

Otro desarrollo de vacuna con base de OMVs secretadas, es en el caso de la vacuna en contra de la bacteria *Neisseria meningitidis*. Las OMVs secretadas por *N. meningitidis* tienen la capacidad de inducir una respuesta inmune humoral a largo plazo en el hospedero. Esto se demostró en un trabajo previo en el cual se usaron las OMVs secretadas por dicha bacteria para inmunizar ratones, estos animales desarrollaron una respuesta inmune de memoria mediada por linfocitos B y T. Los ratones generaron un perfil de isotipos de anticuerpos IgA, IgM e IgG (IgG2a, IgG2b, IgG3) [72], e inclusive las OMVs estimularon a los neutrófilos para la secreción de IL-1 $\beta$ , así como de las quimiocinas CXCL8, CCL3 y CCL4 [73]. También las OMVs secretadas por

*Legionella pneumophila* pueden inducir la secreción de citocinas proinflamatorias [74].

Recientemente las OMVs secretadas por *E. coli* se han utilizado como posibles vacunas: al utilizar las OMVs para inmunizar ratones se incrementó una respuesta inmune tipo Th1 y Th17, en este modelo murino, posteriormente los ratones inmunizados fueron infectados con una dosis letal de la bacteria y la respuesta inmune permitió la supervivencia del 80 y 100% de los ratones previamente inmunizados por las OMVs a concentraciones de 0.5 y 1  $\mu$ g, respectivamente. En el caso de los animales control a los que solamente se les administró PBS, posterior a la infección experimental demostraron una sobrevivencia del 20%. Estos resultados indican la efectividad de las OMVs como vacuna en *E.coli* [38,66,75].

Actualmente ha habido una demanda creciente de vacunas contra patógenos multidrogosresistentes en los hospitales, debido a las implicaciones económicas de hospitalización de los pacientes, así como el uso de otros antibióticos de otra generación, lo cual implica un gasto elevado a la sociedad [76]. Una de las bacterias causantes de las enfermedades nosocomiales resistentes a múltiples fármacos es *Acinetobacter baumannii*. Por tal motivo se han usado las OMVs secretadas por *A. baumannii* para inmunizar ratones, los cuales mostraron un alto porcentaje de supervivencia posterior a la infección experimental con la bacteria, observando también una respuesta inflamatoria discreta. Inicialmente en este estudio se identificó la dosis letal de UFC/ratón la cual fue de  $5.5 \times 10^5$ ,

posteriormente se infectaron los animales previamente inmunizados con las OMVs/adyuvante y el grupo control al cual solamente se le administro PBS en presencia del adyuvante aluminio, los resultados demostraron una sobrevivencia del 73.3 % en los animales a los cuales se les inmunizó con las OMVs y un 7.14% en el grupo control, estos resultados indican una buena respuesta inmune específica por parte de las OMVs en el modelo murino, y esta respuesta es capaz de favorecer la eliminación de *A. baumannii* [77,78]. Se han publicado trabajos similares de las OMVs secretadas por otra bacteria resistente a múltiples fármacos como *Staphylococcus aureus*, sus OMVs pueden inducir una fuerte respuesta mediada por linfocitos B, sin embargo, esto no permitió la supervivencia de los animales debido a la respuesta celular nula, la cual es esencial para eliminar a esta bacteria [79]. Diversos estudios ya se han realizado de manera *in vivo*, utilizando diferentes modelos animales a los cuales se les ha inmunizado con OMVs y se ha evaluado el papel inmune que tienen, demostrándose las respuestas inmunes innata y celular que genera la inmunización de las OMVs (Figura 2), así como su potencial uso para el desarrollo de vacunas patógeno-específicas (Tabla 2). Finalmente, los estudios realizados con OMVs han permitido que ya se encuentre disponible una vacuna, en la cual parte de sus componentes son OMVs de *Neisseria meningitidis* del grupo B adsorbidas en hidróxido de aluminio, esta vacuna tiene el nombre comercial de Bexsero y es producida por Glaxosmithkline, ya fue aprobada para su

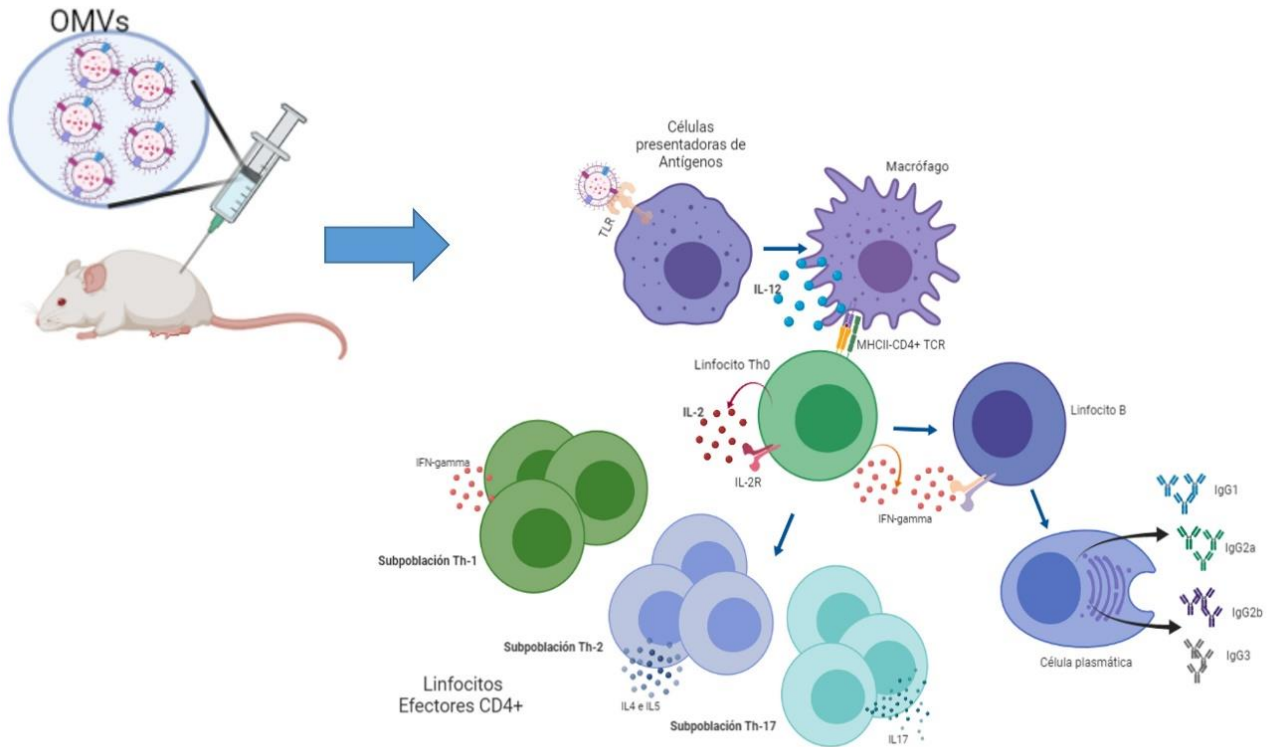
uso por la FDA y se encuentra disponible para inmunización de lactantes a partir de los 2 meses de edad y hasta personas adultas menores de 50 años y su finalidad es prevenir la meningococcal meningitis [80-84].

## CONCLUSIONES

El análisis de microvesículas derivadas de microorganismos patógenos actualmente cubre un amplio campo de estudio, debido al alto contenido de biomoléculas involucradas en la patogénesis de las bacterias, esto permitirá comprender cómo se favorece el mecanismo de interacción huésped-microorganismo en bacterias. Por lo tanto, las OMVs se han considerado para la preparación de vacunas principalmente contra bacterias patógenas, debido a su capacidad de generar una respuesta inmune en modelos previamente inmunizados con OMV. El desafío en los próximos años será comprender la funcionalidad de las OMVs y modificar adecuadamente estas microvesículas a través de ingeniería genética o diferentes estrategias (Figura 3) con la finalidad de generar vacunas efectivas contra bacterias de interés clínico, esto favorecerá una reducción considerable en la incidencia de infecciones graves por bacterias patógenas multidrogorresistentes, disminuyendo la morbilidad y mortandad en poblaciones susceptibles. De igual manera se requerirán más estudios con la finalidad de evaluar si las estrategias de modificación de las OMVs o los enfoques de ingeniería genética podrían alterar las características originales de estas

microvesículas o si se tuvieran que realizar modificaciones adicionales para reducir inmunogenicidad o toxicidad antes de su

evaluación como vacunas en los diferentes modelos usados.

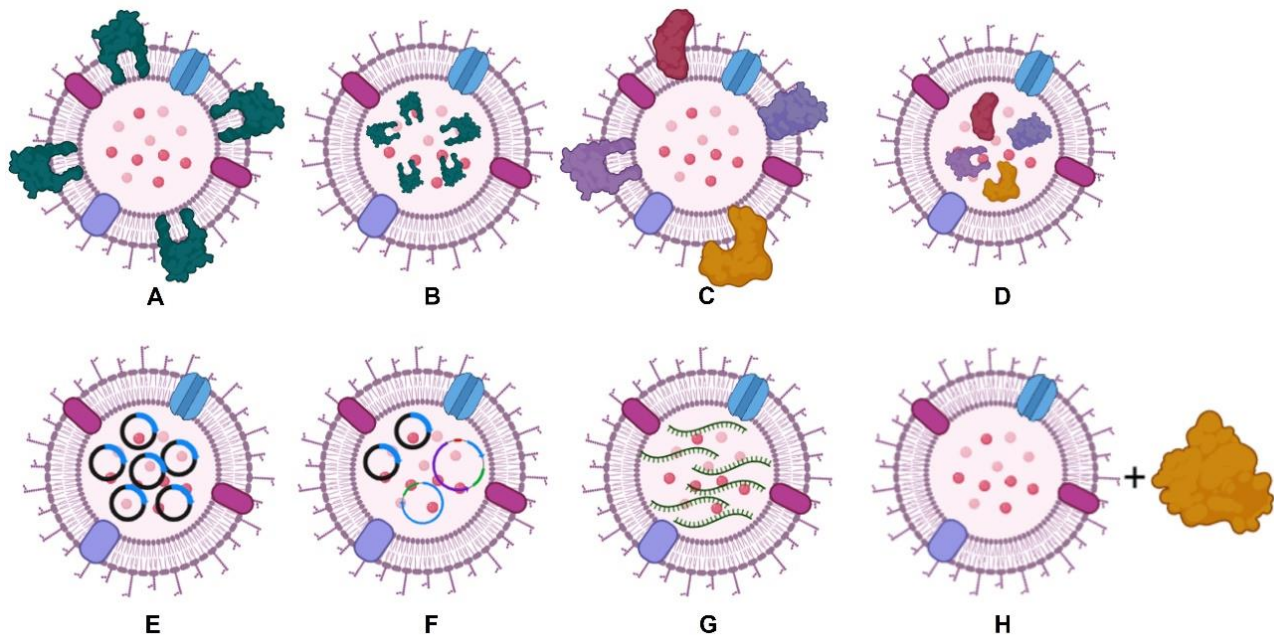


**Figura 2.** Mecanismo de respuesta inmune generado por las OMVs. El mecanismo propuesto y con base en diferentes estudios (ver texto y tablas 2-3), indican que al inmunizar a un modelo animal con las OMVs purificadas, los componentes asociados a la superficie de estas serán reconocidos por los receptores tipo-Toll presentes en la membrana de células presentadoras de antígenos, las cuales pueden ser las células dendríticas o los macrófagos. La interacción con otros receptores específicos como el complejo principal de histocompatibilidad tipo II (MHC-II), el receptor de células T (TCR) y citocinas, activarán la diferenciación de Linfocitos T naïve o Th0 a las subpoblaciones de Linfocitos T, los cuales serán capaces de responder de manera efectiva ante ciertos patógenos, entre estas poblaciones se han encontrado a los Th1, Th2 y Th17. Estas poblaciones diferenciadas se caracterizan por secretar citocinas en particular y a su vez poder activar a los linfocitos B para que se activen, proliferen y diferencien en células plasmáticas hiperproductoras de anticuerpos o inmunoglobulinas (IgGs). Permitiendo la activación de las respuestas inmunes innata y adaptativa, las cuales permite eliminar a los microorganismos patógenos. Creado con BioRender.com.



**Tabla 2.** Estudios *in vivo* evaluando la inmunogenicidad de diferentes OMVs contra patógenos causantes de enfermedades infecciosas.

Origen de OMVs/modelo animal utilizado	Resultados de la inmunización	Referencias
<i>Escherichia coli</i> /ratón	La inmunización con las OMVs favorece la inducción de ICAM-1, así como la adhesión de leucocitos <i>in vitro</i> , y la expresión de ICAM-1 y el secuestro de neutrófilos en los pulmones <i>in vivo</i>	[66]
<i>Bordetella bronchiseptica</i> /ratón hembra BALB/c	Linfocitos obtenidos de bazo de ratones previamente inmunizados con las OMVs, demostraron una mayor proporción de células T CD4+/CD8+ y células B CD19+ e indujeron niveles significativamente altos de citocinas Th1/Th2/Th17.	[85]
<i>Haemophilus parasuis</i> /cerdo	Los animales inmunizados con las OMVs demostraron una sobrevivencia del 100 % posterior a la infección experimental a diferencia de los animales no inmunizados los cuales solamente sobrevivieron en un 25%. Además, se determinaron la presencia de citocinas TNF- $\alpha$ , IL6, IL8, IL10. Por lo tanto, las OMVs inducen una respuesta específica en contra de <i>H. parasuis</i> .	[86]
<i>Acinetobacter baumannii</i> / ratón hembra ICR	La inmunización intramuscular de las OMVs generó un incremento en anticuerpos específicos IgG e IgA. En la infección experimental los ratones demostraron protección en el modelo de sepsis	[77]
<i>Salmonella typhimurium</i> decoradas con el dominio RBD de la proteína spike del SARS-CoV-2/ Hamster	Los animales inmunizados con las OMVs decoradas, demostraron un incremento de las inmunoglobulinas IgG, además los animales inmunizados presentaron menor pérdida de peso comparados con los animales control. Estos resultados indican el potencial uso de las OMVs decoradas con una proteína en particular en contra del SARS-CoV-2	[87]



**Figura 3.** Estrategias biotecnológicas para el desarrollo de vacunas a base de OMVs. Algunas de las estrategias ya se están realizando en el ámbito biotecnológico y otros son propuestas para un futuro desarrollo. A. La unión de proteínas específicas a la superficie de las microvesículas, esta se ha realizado a través de ingeniería genética, en la cual se ha modificado a las bacterias para que al formar sus OMVs, estas incorporen las proteínas de interés a su membrana. B. Dependiendo de las características químicas de las proteínas que se evalúen, si son de carácter hidrofílico podrían acumularse en el interior de la OMV. C. Incorporar diferentes proteínas de diversos microorganismos y generar OMVs multivalentes, las cuales pueden ser proteínas hidrofóbicas que se pueden incorporar en la superficie de la OMV. D. La incorporación de proteínas hidrofílicas las cuales pueden quedarse en el interior de la OMV. E. Recientemente se ha propuesto incorporar plásmidos los cuales lleven un gen codificante para una proteína en específico dentro de la OMV a través de procesos como electroporación o transfección mediada por virus. F. Inclusive se pueden incorporar diferentes plásmidos llevando genes codificantes para diferentes proteínas. G. Otra incursión es la incorporación de ARN mensajero en el interior de la OMV, actualmente existen vacunas contra el SARS-CoV-2 donde se incorpora mRNA en el interior de arbovirus, los cuales funcionan como acarreadores. H. Finalmente las OMVs purificadas pueden ser utilizadas como adyuvante, las OMVs secretadas por las bacterias Gram Negativas presentan LPS la cual es un componente de membrana inmunogénico, este componente puede ser capaz de activar una respuesta proinflamatoria permitiendo el arribo de células del sistema inmune que reconocerán a la OMVs y al antígeno purificado, generándose así una adecuada respuesta inmune. Creado con BioRender.com.

### CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido parcialmente financiado por la Vicerrectoría de Investigación

y de estudios de Posgrado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (VIEP-BUAP) proyecto 100522577-VIEP2019.

## REFERENCIAS

- [1]. Schorey JS, Cheng Y, Singh PP, Smith VL. Exosomes and other extracellular vesicles in host–pathogen interactions. *EMBO Rep* [Internet]. 2015 Jan 1;16(1):24–43. Available from: <https://doi.org/10.15252/embr.201439363>
- [2]. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, *et al.* Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* [Internet]. 2006;20(5):847–56. Available from: <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404132>
- [3]. Silverman JM, Reiner NE. Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. *Cell Microbiol* [Internet]. 2011 Jan 1;13(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01537.x>
- [4]. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding C V, Melief CJ, *et al.* B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* [Internet]. 1996 Mar 1;183(3):1161–72. Available from: <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161>
- [5]. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet]. 2014 Oct 6;30(1):255–89. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>
- [6]. Kadurugamuwa JL, Beveridge TJ. Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J Bacteriol* [Internet]. 1995 Jul 1;177(14):3998–4008. Available from: <https://doi.org/10.1128/jb.177.14.3998-4008.1995>
- [7]. Kadurugamuwa JL, Beveridge TJ. Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics. *J Bacteriol* [Internet]. 1996 May 1;178(10):2767–74. Available from: <https://doi.org/10.1128/jb.178.10.2767-2774.1996>
- [8]. Mashburn LM, Whiteley M. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature* [Internet]. 2005;437(7057):422–5. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature03925>
- [9]. Kim JH, Lee J, Park J, Ghoo YS. Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2015;40:97–104. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952115000336>
- [10]. Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2015;25(6):364–72. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096289241500015X>

[11]. Furuyama N, Sircili MP. Outer Membrane Vesicles (OMVs) Produced by Gram-Negative Bacteria: Structure, Functions, Biogenesis, and Vaccine Application. Gebre AK, editor. Biomed Res Int [Internet]. 2021;2021:1490732. Available from: <https://doi.org/10.1155/2021/1490732>

[12]. Jan AT. Outer Membrane Vesicles (OMVs) of Gram-negative Bacteria: A Perspective Update [Internet]. Vol. 8, Frontiers in Microbiology. 2017. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01053>

[13]. Kulp A, Kuehn MJ. Biological Functions and Biogenesis of Secreted Bacterial Outer Membrane Vesicles. Annu Rev Microbiol [Internet]. 2010 Sep 29;64(1):163–84. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073413>

[14]. Kulkarni HM, Jagannadham M V. Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria. Microbiology [Internet]. 2014;160(10):2109–21. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.079400-0>

[15]. Manning AJ, Kuehn MJ. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. BMC Microbiol [Internet]. 2011;11(1):258. Available from: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-258>

[16]. Lee J, Kim OY, Gho YS. Proteomic

profiling of Gram-negative bacterial outer membrane vesicles: Current perspectives. PROTEOMICS – Clin Appl [Internet]. 2016 Oct 1;10(9–10):897–909. Available from: <https://doi.org/10.1002/prca.201600032>

[17]. McMahon KJ, Castelli ME, García Vescovi E, Feldman MF. Biogenesis of Outer Membrane Vesicles in *Serratia marcescens* Is Thermoregulated and Can Be Induced by Activation of the Rcs Phosphorelay System. J Bacteriol [Internet]. 2012 Jun 15;194(12):3241–9. Available from: <https://doi.org/10.1128/JB.00016-12>

[18]. Olofsson A, Vallström A, Petzold K, Tegtmeyer N, Schleucher J, Carlsson S, *et al.* Biochemical and functional characterization of *Helicobacter pylori* vesicles. Mol Microbiol [Internet]. 2010 Sep 1;77(6):1539–55. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07307.x>

[19]. Zlatkov N, Nadeem A, Uhlin BE, Wai SN. Eco-evolutionary feedbacks mediated by bacterial membrane vesicles. FEMS Microbiol Rev [Internet]. 2021 Mar 1;45(2):fuua047. Available from: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuua047>

[20]. Corrado C, Raimondo S, Chiesi A, Ciccia F, De Leo G, Alessandro R. Exosomes as Intercellular Signaling Organelles Involved in Health and Disease: Basic Science and Clinical Applications. Vol. 14, International Journal of Molecular Sciences. 2013. p. 5338–66.

[21]. Wai SN, Lindmark B, Söderblom T, Takade A, Westermark M, Oscarsson J, *et al.* Vesicle-Mediated Export and Assembly of

Pore-Forming Oligomers of the Enterobacterial ClyA Cytotoxin. Cell [Internet]. 2003;115(1):25–35. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867403007542>

[22]. Bladen HA, Waters JF. Electron Microscopic Study of Some Strains of Bacteroides. J Bacteriol [Internet]. 1963 Dec 1;86(6):1339–44. Available from: <https://doi.org/10.1128/jb.86.6.1339-1344.1963>

[23]. Schwechheimer C, Kuehn MJ. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2015;13(10):605–19. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3525>

[24]. van der Pol L, Stork M, van der Ley P. Outer membrane vesicles as platform vaccine technology. Biotechnol J [Internet]. 2015 Sep 1;10(11):1689–706. Available from: <https://doi.org/10.1002/biot.201400395>

[25]. Klebba PE. The Porinologist. J Bacteriol [Internet]. 2005 Dec 15;187(24):8232–6. Available from: <https://doi.org/10.1128/JB.187.24.8232-8236.2005>

[26]. Goffin C, Ghuysen J-M. Multimodular Penicillin-Binding Proteins: An Enigmatic Family of Orthologs and Paralogs. Microbiol Mol Biol Rev [Internet]. 1998 Dec 1;62(4):1079–93. Available from: <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.4.1079-1093.1998>

[27]. Fernandez-Moreira E, Helbig JH,

Swanson MS. Membrane Vesicles Shed by Legionella pneumophila Inhibit Fusion of Phagosomes with Lysosomes. Infect Immun [Internet]. 2006 Jun 1;74(6):3285–95. Available from: <https://doi.org/10.1128/IAI.01382-05>

[28]. Galka F, Wai SN, Kusch H, Engelmann S, Hecker M, Schmeck B, *et al.* Proteomic Characterization of the Whole Secretome of Legionella pneumophila and Functional Analysis of Outer Membrane Vesicles. Infect Immun [Internet]. 2008 May 1;76(5):1825–36. Available from: <https://doi.org/10.1128/IAI.01396-07>

[29]. Guerrero-Mandujano A, Hernández-Cortez C, Ibarra JA, Castro-Escarpulli G. The outer membrane vesicles: Secretion system type zero. Traffic [Internet]. 2017 Jul 1;18(7):425–32. Available from: <https://doi.org/10.1111/tra.12488>

[30]. Henderson B, Martin A. Bacterial Virulence in the Moonlight: Multitasking Bacterial Moonlighting Proteins Are Virulence Determinants in Infectious Disease. Infect Immun [Internet]. 2011 Sep 1;79(9):3476–91. Available from: <https://doi.org/10.1128/IAI.00179-11>

[31]. Kainulainen V, Korhonen TK. Dancing to Another Tune—Adhesive Moonlighting Proteins in Bacteria. Vol. 3, Biology. 2014. p. 178–204.

[32]. Skjærven L, Cuellar J, Martinez A, Valpuesta JM. Dynamics, flexibility, and allostery in molecular chaperonins. FEBS Lett [Internet]. 2015 Sep 14;589(19PartA):2522–32.

- Available from:  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.06.019>
- [33]. Kuehn MJ, Kesty NC. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev* [Internet]. 2005;19(22):2645–55. Available from: <http://genesdev.cshlp.org/content/19/22/2645.1ong#>
- [34]. Horstman AL, Kuehn MJ. Enterotoxigenic *Escherichia coli* Secretes Active Heat-labile Enterotoxin via Outer Membrane Vesicles\*. *J Biol Chem* [Internet]. 2000;275(17):12489–96. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925819833483>
- [35]. Lee E-Y, Choi D-S, Kim K-P, Gho YS. Proteomics in gram-negative bacterial outer membrane vesicles. *Mass Spectrom Rev* [Internet]. 2008 Nov 1;27(6):535–55. Available from: <https://doi.org/10.1002/mas.20175>
- [36]. Dorward DW, Garon CF, Judd RC. Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* [Internet]. 1989 May 1;171(5):2499–505. Available from: <https://doi.org/10.1128/jb.171.5.2499-2505.1989>
- [37]. Mizuno T, Chou MY, Inouye M. A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1984 Apr 1;81(7):1966–70. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.81.7.1966>
- [38]. Wang S, Gao J, Wang Z. Outer membrane vesicles for vaccination and targeted drug delivery. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* [Internet]. 2019 Mar 1;11(2):e1523. Available from: <https://doi.org/10.1002/wnan.1523>
- [39]. Klimentová J, Stulík J. Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria. *Microbiol Res* [Internet]. 2015;170:1–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501314001153>
- [40]. Schooling SR, Beveridge TJ. Membrane Vesicles: an Overlooked Component of the Matrices of Biofilms. *J Bacteriol* [Internet]. 2006 Aug 15;188(16):5945–57. Available from: <https://doi.org/10.1128/JB.00257-06>
- [41]. Mendez JA, Soares NC, Mateos J, Gayoso C, Rumbo C, Aranda J, *et al.* Extracellular Proteome of a Highly Invasive Multidrug-resistant Clinical Strain of *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res* [Internet]. 2012 Dec 7;11(12):5678–94. Available from: <https://doi.org/10.1021/pr300496c>
- [42]. Lin J, Nishino K, Roberts MC, Tolmasky M, Aminov RI, Zhang L. Mechanisms of antibiotic resistance [Internet]. Vol. 6, *Frontiers in Microbiology*. 2015. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00034>
- [43]. Ciofu O, Beveridge TJ, Kadurugamuwa J, Walther-Rasmussen J, Høiby N. Chromosomal  $\beta$ -lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*

[Internet]. 2000 Jan 1;45(1):9–13. Available from: <https://doi.org/10.1093/jac/45.1.9>

[44]. Devos S, Van Oudenhove L, Stremersch S, Van Putte W, De Rycke R, Van Driessche G, *et al.* The effect of imipenem and diffusible signaling factors on the secretion of outer membrane vesicles and associated Ax21 proteins in *Stenotrophomonas maltophilia* [Internet]. Vol. 6, *Frontiers in Microbiology*. 2015. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00298>

[45]. Stentz R, Horn N, Cross K, Salt L, Brearley C, Livermore DM, *et al.* Cephalosporinases associated with outer membrane vesicles released by *Bacteroides* spp. protect gut pathogens and commensals against  $\beta$ -lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2015 Mar 1;70(3):701–9. Available from: <https://doi.org/10.1093/jac/dku466>

[46]. Dell'Annunziata F, Dell'Aversana C, Doti N, Donadio G, Dal Piaz F, Izzo V, *et al.* Outer Membrane Vesicles Derived from *Klebsiella pneumoniae* Are a Driving Force for Horizontal Gene Transfer. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. 2021.

[47]. Wang Z, Wen Z, Jiang M, Xia F, Wang M, Zhuge X, *et al.* Dissemination of virulence and resistance genes among *Klebsiella pneumoniae* via outer membrane vesicle: An important plasmid transfer mechanism to promote the emergence of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Transbound Emerg Dis* [Internet]. 2022 Sep

1;69(5):e2661–76. Available from: <https://doi.org/10.1111/tbed.14615>

[48]. Rumbo C, Fernández-Moreira E, Merino M, Poza M, Mendez JA, Soares NC, *et al.* Horizontal Transfer of the OXA-24 Carbapenemase Gene via Outer Membrane Vesicles: a New Mechanism of Dissemination of Carbapenem Resistance Genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2011 Jul 1;55(7):3084–90. Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC.00929-10>

[49]. Liu Y, Defourny KAY, Smid EJ, Abee T. Gram-Positive Bacterial Extracellular Vesicles and Their Impact on Health and Disease [Internet]. Vol. 9, *Frontiers in Microbiology*. 2018. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01502>

[50]. Lee E-Y, Choi D-Y, Kim D-K, Kim J-W, Park JO, Kim S, *et al.* Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: Proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. *Proteomics* [Internet]. 2009 Dec 1;9(24):5425–36. Available from: <https://doi.org/10.1002/pmic.200900338>

[51]. Rivera J, Cordero RJB, Nakouzi AS, Frases S, Nicola A, Casadevall A. *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2010 Nov 2;107(44):19002–7. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.1008843107>

[52]. Olaya-Abril A, Prados-Rosales R,

McConnell MJ, Martín-Peña R, González-Reyes JA, Jiménez-Munguía I, *et al.* Characterization of protective extracellular membrane-derived vesicles produced by *Streptococcus pneumoniae*. J Proteomics [Internet]. 2014;106:46–60. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391914001997>

[53]. Kim M-R, Hong S-W, Choi E-B, Lee W-H, Kim Y-S, Jeon SG, *et al.* *Staphylococcus aureus*-derived extracellular vesicles induce neutrophilic pulmonary inflammation via both Th1 and Th17 cell responses. Allergy [Internet]. 2012 Oct 1;67(10):1271–81. Available from: <https://doi.org/10.1111/all.12001>

[54]. Hong S-W, Kim M-R, Lee E-Y, Kim JH, Kim Y-S, Jeon SG, *et al.* Extracellular vesicles derived from *Staphylococcus aureus* induce atopic dermatitis-like skin inflammation. Allergy [Internet]. 2011 Mar 1;66(3):351–9. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2010.02483.x>

[55]. Hong S-W, Choi E-B, Min T-K, Kim J-H, Kim M-H, Jeon SG, *et al.* An Important Role of  $\alpha$ -Hemolysin in Extracellular Vesicles on the Development of Atopic Dermatitis Induced by *Staphylococcus aureus*. PLoS One [Internet]. 2014 Jul 3;9(7):e100499. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100499>

[56]. Rappuoli R. From Pasteur to genomics: progress and challenges in infectious diseases. Nat Med [Internet]. 2004;10(11):1177–85. Available from: <https://doi.org/10.1038/nm1129>

[57]. Bitto NJ, Kaparakis-Liaskos M. The Therapeutic Benefit of Bacterial Membrane Vesicles. Vol. 18, International Journal of Molecular Sciences. 2017.

[58]. Cai W, Kesavan DK, Wan J, Abdelaziz MH, Su Z, Xu H. Bacterial outer membrane vesicles, a potential vaccine candidate in interactions with host cells based. Diagn Pathol [Internet]. 2018;13(1):95. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13000-018-0768-y>

[59]. Vanaja SK, Russo AJ, Behl B, Banerjee I, Yankova M, Deshmukh SD, *et al.* Bacterial Outer Membrane Vesicles Mediate Cytosolic Localization of LPS and Caspase-11 Activation. Cell [Internet]. 2016;165(5):1106–19. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867416304068>

[60]. Gu L, Meng R, Tang Y, Zhao K, Liang F, Zhang R, *et al.* Toll-Like Receptor 4 Signaling Licenses the Cytosolic Transport of Lipopolysaccharide From Bacterial Outer Membrane Vesicles. Shock [Internet]. 2019;51(2). Available from: [https://journals.lww.com/shockjournal/Fulltext/2019/02000/Toll\\_Like\\_Receptor\\_4\\_Signaling\\_Licenses\\_the.16.aspx](https://journals.lww.com/shockjournal/Fulltext/2019/02000/Toll_Like_Receptor_4_Signaling_Licenses_the.16.aspx)

[61]. Cecil JD, O'Brien-Simpson NM, Lenzo JC, Holden JA, Singleton W, Perez-Gonzalez A, *et al.* Outer Membrane Vesicles Prime and Activate Macrophage Inflammasomes and Cytokine Secretion In Vitro and In Vivo [Internet]. Vol. 8, Frontiers in Immunology. 2017. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fi>



[mmu.2017.01017](https://doi.org/10.3389/fmmu.2017.01017)

[62]. Fleetwood AJ, Lee MKS, Singleton W, Achuthan A, Lee M-C, O'Brien-Simpson NM, *et al.* Metabolic Remodeling, Inflammasome Activation, and Pyroptosis in Macrophages Stimulated by *Porphyromonas gingivalis* and Its Outer Membrane Vesicles [Internet]. Vol. 7, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2017. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2017.00351>

[63]. Mitra S, Sinha R, Mitobe J, Koley H. Development of a cost-effective vaccine candidate with outer membrane vesicles of a tolA-disrupted *Shigella boydii* strain. Vaccine [Internet]. 2016;34(15):1839–46. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X16001602>

[64]. Ko SH, Rho DJ, Jeon JI, Kim Y-J, Woo HA, Kim N, *et al.* Crude Preparations of *Helicobacter pylori* Outer Membrane Vesicles Induce Upregulation of Heme Oxygenase-1 via Activating Akt-Nrf2 and mTOR–I $\kappa$ B Kinase–NF- $\kappa$ B Pathways in Dendritic Cells. Infect Immun [Internet]. 2016 Jul 21;84(8):2162–74. Available from: <https://doi.org/10.1128/IAI.00190-16>

[65]. Hiippala K, Barreto G, Burrello C, Diaz-Basabe A, Suutarinen M, Kainulainen V, *et al.* Novel *Odoribacter splanchnicus* Strain and Its Outer Membrane Vesicles Exert Immunoregulatory Effects in vitro [Internet]. Vol. 11, Frontiers in Microbiology. 2020. Available from:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.575455>

[66]. Kim JH, Yoon YJ, Lee J, Choi E-J, Yi N, Park K-S, *et al.* Outer Membrane Vesicles Derived from *Escherichia coli* Up-Regulate Expression of Endothelial Cell Adhesion Molecules In Vitro and In Vivo. PLoS One [Internet]. 2013 Mar 14;8(3):e59276. Available from:

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059276>

[67]. Alaniz RC, Deatherage BL, Lara JC, Cookson BT. Membrane Vesicles Are Immunogenic Facsimiles of *Salmonella typhimurium* That Potently Activate Dendritic Cells, Prime B and T Cell Responses, and Stimulate Protective Immunity *In Vivo*. J Immunol [Internet]. 2007 Dec 1;179(11):7692–701. Available from: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.11.7692>

[68]. Pavkova I, Klimentova J, Bavlovic J, Horcickova L, Kubelkova K, Vlcak E, *et al.* *Francisella tularensis* Outer Membrane Vesicles Participate in the Early Phase of Interaction With Macrophages [Internet]. Vol. 12, Frontiers in Microbiology. 2021. Available from:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.748706>

[69]. Gasperini G, Biagini M, Arato V, Gianfaldoni C, Vadi A, Norais N, *et al.* Outer Membrane Vesicles (OMV)-based and Proteomics-driven Antigen Selection Identifies Novel Factors Contributing to *Bordetella pertussis* Adhesion to Epithelial Cells\*. Mol Cell Proteomics [Internet]. 2018;17(2):205–15.

Available from:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1535947620322659>

[70]. Barbosa MMF, Kanno AI, Barazzone GC, Rodriguez D, Pancakova V, Trentini M, *et al.* Robust immune response induced by *Schistosoma mansoni* TSP-2 antigen coupled to bacterial outer membrane vesicles. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2021;16(September):7153–68. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8548026/>

[71]. Lee W-H, Choi H-I, Hong S-W, Kim K, Gho YS, Jeon SG. Vaccination with *Klebsiella pneumoniae*-derived extracellular vesicles protects against bacteria-induced lethality via both humoral and cellular immunity. *Exp Mol Med* [Internet]. 2015;47(9):e183–e183. Available from: <https://doi.org/10.1038/emm.2015.59>

[72]. Romeu B, Lastre M, García L, Cedré B, Mandariote A, Fariñas M, *et al.* Combined meningococcal serogroup A and W135 outer-membrane vesicles activate cell-mediated immunity and long-term memory responses against non-covalent capsular polysaccharide A. *Immunol Res* [Internet]. 2014;58(1):75–85. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12026-013-8427-6>

[73]. Lapinet JA, Scapini P, Calzetti F, Pérez O, Cassatella MA. Gene Expression and Production of Tumor Necrosis Factor Alpha, Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-8, Macrophage Inflammatory Protein 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), MIP-1 $\beta$ , and Gamma Interferon-Inducible Protein 10 by

Human Neutrophils Stimulated with Group B Meningococcal Outer Me. *Infect Immun* [Internet]. 2000 Dec 1;68(12):6917–23. Available from: <https://doi.org/10.1128/IAI.68.12.6917-6923.2000>

[74]. Jäger J, Marwitz S, Tiefenau J, Rasch J, Shevchuk O, Kugler C, *et al.* Human Lung Tissue Explants Reveal Novel Interactions during *Legionella pneumophila* Infections. *Infect Immun* [Internet]. 2014 Jan 1;82(1):275–85. Available from: <https://doi.org/10.1128/IAI.00703-13>

[75]. Kim OY, Hong BS, Park K-S, Yoon YJ, Choi SJ, Lee WH, *et al.* Immunization with *Escherichia coli* Outer Membrane Vesicles Protects Bacteria-Induced Lethality via Th1 and Th17 Cell Responses. *J Immunol* [Internet]. 2013 Apr 15;190(8):4092–102. Available from: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200742>

[76]. Sandiumenge A, Lisboa T, Gomez F, Hernandez P, Canadell L, Rello J. Effect of Antibiotic Diversity on Ventilator-Associated Pneumonia Caused by ESKAPE Organisms. *Chest* [Internet]. 2011;140(3):643–51. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012369211604698>

[77]. Huang W, Yao Y, Long Q, Yang X, Sun W, Liu C, *et al.* Immunization against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Effectively Protects Mice in both Pneumonia and Sepsis Models. *PLoS One* [Internet]. 2014 Jun 23;9(6):e100727. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100727>

[78]. McConnell MJ, Rumbo C, Bou G, Pachón J. Outer membrane vesicles as an acellular vaccine against *Acinetobacter baumannii*. *Vaccine* [Internet]. 2011;29(34):5705–10. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X11008619>

[79]. Choi SJ, Kim M-H, Jeon J, Kim OY, Choi Y, Seo J, *et al.* Active Immunization with Extracellular Vesicles Derived from *Staphylococcus aureus* Effectively Protects against Staphylococcal Lung Infections, Mainly via Th1 Cell-Mediated Immunity. *PLoS One* [Internet]. 2015 Sep 2;10(9):e0136021. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136021>

[80]. Gasparini R, Amicizia D, Domnich A, Lai PL, Panatto D. *Neisseria meningitidis* B vaccines: recent advances and possible immunization policies. *Expert Rev Vaccines* [Internet]. 2014 Mar 1;13(3):345–64. Available from: <https://doi.org/10.1586/14760584.2014.880341>

[81]. Hall GC, Douglas I, Heath PT, Prabhakar P, Rosillon D, Khan J, *et al.* Post-licensure observational safety study after meningococcal B vaccine 4CMenB (Bexsero) vaccination within the routine UK immunisation program. *Vaccine* [Internet]. 2021;39(24):3296–303. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X21002565>

[82]. Leo S, Lazarevic V, Girard M, Getaz-Jimenez Velasco GC, Gaia N, Renzi G, *et al.*

Strain coverage of Bexsero vaccine assessed by whole-genome sequencing over a cohort of invasive meningococci of serogroups B and W isolated in Switzerland. *Vaccine* [Internet]. 2020;38(33):5324–31. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X2030726X>

[83]. Mukherjee A, Mukherjee D, Rajai A, Senthil S, Edi-osagie N. MenB (Bexsero) immunisation side effects in extremely premature infants (28 weeks). *Arch Dis Child - Fetal Neonatal Ed* [Internet]. 2018 Jan 1;103(1):F85 LP-F85. Available from: <http://fn.bmj.com/content/103/1/F85.2.abstract>

[84]. Lakos A, Torzsa P, Ferenci T. Bexsero, egy új, meningococcus elleni vakcina. *Orvosi Hetil OH* [Internet]. 2016;157(7):242–6. Available from: <https://akjournals.com/view/journals/650/157/7/article-p242.xml>

[85]. Huang Y, Nan L, Xiao C, Dong J, Li K, Cheng J, *et al.* Outer Membrane Vesicles Coating Nano-Glycyrrhizic Acid Confers Protection Against *Borderella bronchiseptica* Through Th1/Th2/ Th17 Responses. *Int J Nanomedicine*. 2022;17(January):647–63.

[86]. McCaig WD, Loving CL, Hughes HR, Brockmeier SL. Characterization and Vaccine Potential of Outer Membrane Vesicles Produced by *Haemophilus parasuis*. *PLoS One* [Internet]. 2016 Mar 1;11(3):e0149132. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149132>

[87]. Jiang L, Driedonks TAP, Jong WSP, Dhakal S, Bart van den Berg van Saparoea H,

Sitaras I, *et al.* A bacterial extracellular vesicle-based intranasal vaccine against SARS-CoV-2 protects against disease and elicits neutralizing antibodies to wild-type and Delta variants. J

Extracell Vesicles [Internet]. 2022 Mar 1;11(3):e12192. Available from: <https://doi.org/10.1002/jev2.12192>