

DINA JOANA MOURÃO VIEIRA RIBEIRO FERREIRA

***STATE OF THE ART* RELATIVO AO PAPEL DO SISTEMA DO
PLASMINOGÉNIO NA QUEBRA DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA
POR *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* E OUTROS MICRORGANISMOS**

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA – FACULDADE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Porto – 2012

DINA JOANA MOURÃO VIEIRA RIBEIRO FERREIRA

***STATE OF THE ART* RELATIVO AO PAPEL DO SISTEMA DO
PLASMINOGÉNIO NA QUEBRA DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA
POR *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* E OUTROS MICRORGANISMOS**

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA – FACULDADE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Porto – 2012

DINA JOANA MOURÃO VIEIRA RIBEIRO FERREIRA

***STATE OF THE ART* RELATIVO AO PAPEL DO SISTEMA DO
PLASMINOGÉNIO NA QUEBRA DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA
POR *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* E OUTROS MICRORGANISMOS**

Trabalho apresentado à Universidade Fernando
Pessoa como parte dos requisitos para obtenção
do grau Mestrado em Ciências Farmacêuticas

Orientadora:

Professora Doutora Vanessa Magalhães

Sumário

Alguns agentes patogênicos bacterianos têm a capacidade de quebrar a barreira hematoencefálica e invadir o sistema nervoso central. A compreensão dos mecanismos de penetração bacteriana através da barreira hematoencefálica pode ajudar a desenvolver novas abordagens para prevenir a meningite bacteriana. O *Streptococcus agalactiae*, também designado por estreptococo do grupo B (GBS), é considerado o principal agente causador de meningite em recém-nascidos. Estudos efetuados ao longo de décadas têm demonstrado que diversos microrganismos têm aumentado as suas capacidades invasivas ao usar componentes do sistema do plasminogénio do hospedeiro. De facto, uma ampla gama de bactérias, parasitas, fungos e vírus interagem com o sistema do plasminogénio do hospedeiro, afetando a sua regulação, de forma a obter uma atividade proteolítica superficial adquirindo uma vantagem de sobrevivência na medida em que se encontram mais aptos para disseminar dentro do hospedeiro. A capacidade de aquisição de uma atividade proteolítica “plasmin-like” na superfície dos agentes patogênicos, como é o caso das bactérias *Streptococcus agalactiae*, *Borrelia burgdorferi* e *Yersinia pestis*, foi descrita como um importante mecanismo de virulência, ajudando na passagem destes microrganismos através das matrizes extracelulares e na sua disseminação pelo organismo do hospedeiro. A interação com o sistema do plasminogénio pode estar envolvido na passagem da barreira hematoencefálica por vários patogênicos, por exemplo o *Streptococcus agalactiae*, contribuindo assim para a infeção do sistema nervoso central. Neste trabalho foi descrita e analisada a interação de vários microrganismos e o sistema do plasminogénio do hospedeiro relativamente à sua relevância no desenvolvimento de infeções invasivas bem como possíveis estratégias terapêuticas alternativas baseadas neste mecanismo de virulência.

Summary

Some bacterial pathogens have the ability to break the blood brain barrier and invade the central nervous system. The understanding of the mechanisms of bacterial penetration through the blood brain barrier may help to develop new approaches to prevent bacterial meningitis. *Streptococcus agalactiae*, also designated group B streptococcus (GBS), is considered the main causative agent of meningitis in newborns. Studies conducted over decades, have shown that many microorganisms have increased their survival capacity by using the components of the host plasminogen system. In fact, a wide range of bacteria, parasites, fungi and viruses interact with the host plasminogen system and affect its regulation to obtain a surface proteolytic activity and acquiring a survival advantage due to its enhancement dissemination capacity. Actually, the ability to acquire a proteolytic plasmin-like activity on the surface of several pathogens, such as bacteria *Streptococcus agalactiae*, *Borrelia burgdorferi* and *Yersinia pestis* has been described as an important virulence mechanism, assisting in the passage of microorganisms through the extracellular matrices and their dissemination in the body of the host. The plasminogen system may be involved also in the crossing of the blood brain barrier, contributing to the development of the infection of the central nervous system. In this work it is described the interaction between several pathogens and the plasminogen system and analyzed concerning its significance in the development of invasive infections as well as alternative therapeutic strategies based in this virulence mechanism.

Dedicatórias

Aos meus pais, Elisabete Ferreira e António Ferreira, por todo o amor, carinho e apoio que me deram durante toda a minha vida.

Agradecimentos

Quero desde já agradecer a toda a minha família pelo apoio incondicional que sempre me deram, sendo de destacar algumas pessoas: os meus pais Elisabete e António; os meus avós Augusto e Joaquina; as minhas irmãs Elisabete e Teresa; o meu cunhado Martinho; os meus padrinhos Arnaldina e Leonidio; os meus primos Catarina, Bruno, Tiago, Diogo, Nido, o meu pequeno André, Teresa e Miguel.

Tenho de fazer um muito especial agradecimento à Andreia pois foi a pessoa que mais me incentivou, mais carinho e força me deu, mais acreditou em mim e mais me apoiou na elaboração deste trabalho. A ela, o meu muito obrigado.

Quero agradecer também a todos aqueles que fizeram parte do meu percurso académico destacando principalmente os meus amigos: Alexandre, Joana, Diogo, Carolina, Tânia, Rita e Renato.

Por fim, o meu muito obrigado à minha orientadora e professora Vanessa Magalhães por ter sido incansável durante todo o tempo de realização deste trabalho, por todo o seu apoio e sabedoria, e principalmente por toda a motivação que me foi dando.

Índice

Introdução.....	1
Lista de abreviaturas.....	3
Glossário.....	4
I. Introdução ao tema.....	6
1. Sistema do plasminogénio.....	8
2. Interação entre o sistema do plasminogénio e as bactérias.....	12
II. Barreira hematoencefálica.....	17
1. Mecanismos de invasão na BHE.....	19
1.1 Invasão da BHE por alguns agentes patogénicos.....	21
III. <i>Streptococcus agalactiae</i> e outros microrganismos.....	23
1. <i>Streptococcus agalactiae</i>	23
2. <i>Borrelia burgdorferi</i>	29
3. <i>Escherichia coli</i>	31
4. <i>Yersinia pestis</i>	33
5. <i>Helicobacter pylori</i>	35
IV. Conclusão.....	38
Bibliografia.....	40

Índice de figuras

Figura 1 – Estrutura da molécula de plasminogénio humano.	8
Figura 2 – Esquema do sistema fibrinolítico: produtos de degradação de fibrina.	9
Figura 3 – Estrutura de domínios de t-PA, u-PA e plasminogénio	10
Figura 4 – Sequência SK, reações do plasminogénio humano e da plasmina.....	11
Figura 5 – Visão esquemática do sistema do plasminogénio e sua regulação.	13
Figura 6 – Visão geral do sistema do plasminogénio dos mamíferos, seu controlo e modo de interação das bactérias patogénicas com este sistema.	14
Figura 7 – BHE e seus constituintes.....	18
Figura 8 – Mecanismos de passagem dos patogénios pela BHE.....	20
Figura 9 – Variação da incidência precoce e tardia da doença invasiva por <i>S. agalactiae</i> , entre 1990 e 2008 (por implementação de estratégias preventivas).....	25
Figura 10 – Mecanismos de adesão e invasão de <i>S. agalactiae</i>	27
Figura 11 – Esquema da atividade proteolítica de <i>Yersinia pestis</i>	34
Figura 12 – Esquema da atividade proteolítica de <i>Helicobacter pylori</i>	36

Índice de tabelas

Tabela 1 – Agentes patogénicos que causam infeções no SNC humano.	20
--	----

Introdução

O presente trabalho de dissertação de Mestrado proposto pela coordenação de Ciências Farmacêuticas é fundamentado pela revisão da literatura no que diz respeito à descrição do estado da arte relativo ao papel do sistema do plasminogénio na quebra da barreira hematoencefálica pelo *Streptococcus agalactiae* e outros microrganismos. Este tema é de elevado interesse e importância, pois as infeções do SNC continuam a ser uma das maiores causas de mortalidade em recém-nascidos. A invasão microbiana através da barreira hematoencefálica é um pré-requisito para infeções do sistema nervoso central (SNC). Um entendimento mais profundo sobre a interação microbiana com o hospedeiro que está envolvido na quebra da barreira hematoencefálica deve contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias para prevenir infeções do SNC.

No início deste trabalho, é apresentado um glossário de forma a se obter uma melhor compreensão sobre a nomenclatura relativa ao sistema do plasminogénio. É também apresentada uma lista de abreviaturas. O primeiro capítulo incide na apresentação do sistema do plasminogénio, descrevendo como este funciona e atua no organismo humano, quais os seus constituintes, qual a sua importância e regulação. Ainda neste primeiro capítulo são descritas algumas interações entre vários microrganismos e o sistema do plasminogénio e a forma como estas aumentam a sua capacidade de invasão no organismo.

O segundo capítulo faz uma descrição da barreira hematoencefálica revelando assim toda a sua constituição, importância e funcionamento; e descreve como os patogénios neuro invasivos podem penetrar esta barreira e invadir o SNC causando assim manifestações neurológicas.

No terceiro capítulo são apresentados alguns microrganismos que podem atravessar a barreira hematoencefálica e causar patologias como o *Streptococcus agalactiae* e a *Borrelia burgdorferi*. São também apresentadas outras bactérias que apesar de não serem neuro invasivas, há imensa documentação relativamente à sua interação com o sistema do plasminogénio como a *Yersinia pestis* e o *Helicobacter pylori*. A bactéria mais salientada é o *Streptococcus agalactiae*, uma bactéria Gram-

positiva que pertence à família dos estreptococos do grupo B. Esta bactéria apresenta uma variedade de moléculas à superfície consideradas fatores de virulência visto que suportam vários processos da interação com o hospedeiro, relacionados com a adesão e invasão.

Por fim, a última parte deste trabalho consiste numa breve conclusão, onde são relacionados os aspetos mais relevantes da interação dos microrganismos com o sistema do plasminogénio e a sua influência sobre a passagem da barreira hematoencefálica.

Lista de abreviaturas

- **α 2-AP** – α 2-antiplasmina
- **BHE** – barreira hematoencefálica
- **BMEC** – “brain microvascular endothelial cell”, célula endotelial microvascular do cérebro
- **GAS** – “Group A streptococcus”, estreptococo do grupo A
- **GBS** – “Group B streptococcus”, estreptococo do grupo B
- **GAPDH** – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- **Glu** – glutamato
- **EOD** – “early onset disease”, doença de início precoce
- **HBMEC** – “human brain microvascular endothelial cell”, célula endotelial microvascular cerebral humana
- **IL-8** – interleucina 8
- **LOD** – “late onset disease”, doença de início tardio
- **Lys** – lisina
- **MB** – membrana basal
- **MEC** – matriz extracelular
- **MMP** – metaloprotease da matriz
- **PAI** – “plasminogen activator inhibitor”, inibidor do ativador do plasminogénio
- **PA** – “plasminogen activator”, ativador do plasminogénio
- **SK** – streptocinase
- **SNC** – sistema nervoso central
- **t-PA** – “tissue-type plasminogen activator”, ativador do plasminogénio do tipo tecidual
- **u-PA** – “urokinase”, ativador do plasminogénio do tipo urocinase

Glossário

Plasminogénio: é uma glicoproteína secretada pelo fígado (sob a forma de um precursor inativo), contendo 791 aminoácidos e 2% de hidratos de carbono, sendo a sua massa molecular cerca de 92.000 Dalton. Esta glicoproteína é convertida em plasmina (molécula ativa) através dos seus ativadores específicos que são o t-PA e o u-PA.

Plasmina: é uma importante enzima que está presente no sangue, produzida a partir de uma proenzima inativa (plasminogénio) e cuja função principal é degradar a fibrina (fibrinólise) para além de outras, como por exemplo ativar metaloproteinases da matriz extracelular.

Domínios de Kringle: domínios proteicos unidos por ligações dissulfureto que têm um papel fundamental na ligação a membranas e proteínas. Estes domínios estão presentes nas proteínas fibrinolíticas, estão relacionados com a coagulação e têm a capacidade de fazer com que o plasminogénio adote conformações diferentes.

Glu-plasminogénio: forma da molécula de plasminogénio que possui um resíduo de ácido glutâmico na posição N-terminal (forma do plasminogénio mais comum, fisiologicamente).

Lys-plasminogénio: outra forma de plasminogénio gerado por clivagem proteolítica contendo em resíduo de lisina na posição N-terminal.

Ativador do plasminogénio do tipo tecidual (t-PA): é um ativador endógeno de plasminogénio; é uma serino-protéase secretada pelas células endoteliais. Converte o plasminogénio em plasmina.

Ativador do plasminogénio do tipo urocinase (u-PA): é um ativador endógeno de plasminogénio que aparece no sangue e em outros fluidos corporais. Tal como o t-PA, converte o plasminogénio em plasmina.

Streptocinase: é um ativador exógeno do plasminogénio que forma um complexo equimétrico 1:1 com o plasminogénio humano. É derivado de várias espécies de *Streptococcus*.

α_2 - anti-plasmina (α_2 -AP): é uma glicoproteína de cadeia simples sintetizada pelo fígado e que funciona como uma serina protéase inibidora. É uma enzima que inativa a plasmina. A sua ação é um processo fundamental na regulação da fibrinólise.

α_2 -macroglubina (α_2 -M): é uma anti protéase que inibe a plasmina e cuja principal função é neutralizar as enzimas proteolíticas. Apesar de esta ter uma concentração mais elevada do que a α_2 -anti-plasmina, é menos eficaz no processo de inativação da plasmina.

Inibidores dos ativadores do plasminogénio: são serina protéases que inibem a ação dos ativadores do plasminogénio, (t-PA, u-PA e streptocinase). Os principais inibidores dos ativadores do plasminogénio são os PAI-1, PAI-2, PAI-3 e PAI-4, sendo de destacar o PAI-1 que inibe tanto o t-PA como o u-PA e é o inibidor predominante no plasma; o PAI-2 inibe principalmente o u-PA.

Matriz extracelular: permite a migração de células durante todo o desenvolvimento embrionário e é também um fator de coesão e flexibilidade do corpo dos animais. Esta matriz é constituída por colagénio, glicoproteínas, proteoglicanos e elastina.

I. Introdução ao tema

Diversas espécies de bactérias patogénicas intervêm com o sistema proteolítico plasminogénio dos mamíferos (Lahteenmaki et al., 2005). Todas elas apresentam uma diversidade de moléculas na sua superfície, estando muitas delas envolvidas numa variedade de processos de interação com o hospedeiro sendo consideradas fatores de virulência. Para além das bactérias, estão descritos outros microrganismos, como fungos e parasitas que interagem com o sistema do plasminogénio do hospedeiro (Lahteenmaki et al., 2005). Algumas, afetam a regulação deste sistema, como por exemplo degradando os inibidores de plasmina circulante e influenciando os níveis de ativadores de plasminogénio (Lahteenmaki et al., 2005). O mecanismo conceptual consiste no fato desta interação lhes permitir adquirir uma actividade proteolítica superficial “plasmin-like” que lhes confere uma vantagem de sobrevivência por aumento da sua capacidade de invasão (Lahteenmaki et al., 2005).

O *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) é uma bactéria do grupo B dos estreptococos (GBS) que é o principal causador de doenças neonatais em humanos, por exemplo, a meningite. Esta bactéria consegue aderir e invadir as células microvasculares endoteliais do cérebro e em seguida passar através da barreira hematoencefálica (BHE) (Tettelin et al., 2005). Recentemente, num ensaio de Transwell que mimetiza a penetração do *S. agalactiae* no cérebro, verificou-se *in vitro* que a sua interação com o plasminogénio aumenta a migração (Magalhães, 2012). Adicionalmente, também se mostrou *in vivo*, num modelo animal de suscetibilidade à infeção, que o pré-tratamento do *S. agalactiae* com plasminogénio aumenta a colonização no cérebro (Magalhães, 2012).

Tal como referido anteriormente, não só a bactéria *S. agalactiae* tem a capacidade de interagir com o sistema do plasminogénio; existem outras variedades de bactérias, parasitas, fungos e vírus que também tem a capacidade de aquisição de uma atividade proteolítica superficial que até já foi documentada como um importante mecanismo de virulência: estreptococos do grupo A (GAS), *Borrelia burgdorferi* (*B. burgdorferi*) e *Yersinia pestis* (*Y. pestis*); ajudando na passagem destes microrganismos através das

State of the art relativo ao papel do sistema do plasminogénio na quebra da barreira hematoencefálica por *Streptococcus agalactiae* e outros microrganismos

matrizes extracelulares e na sua disseminação pelo organismo do hospedeiro (Lahteenmaki et al., 2005).

Este estudo, tem então como principal objetivo descrever a interação do sistema do plasminogénio com *S. agalactiae* e outros microrganismos e demonstrar a relevância desta interação nas infeções invasivas.

1. Sistema do plasminogénio

O plasminogénio é uma glicoproteína secretada pelo fígado sob a forma de um precursor inativo. Após a sua ativação proteolítica, é convertido em plasmina, uma serina protéase potente que está envolvida na dissolução de coágulos sanguíneos de fibrina. Estes são normalmente associados a condições hiperfibrinolíticas ou até mesmo trombóticas (Axelsson, 1995). Além do seu importante papel no sistema hemostático, o sistema do plasminogénio tem também outras numerosas funções em outros processos, incluindo remodelação da matriz extracelular (MEC), crescimento e disseminação tumoral, cicatrização de feridas e infeção (Franco, 2001).

O plasminogénio humano é constituído por uma glicoproteína de cadeia única, contendo 791 aminoácidos e 2% de hidratos de carbono, sendo a sua massa molecular estimada em cerca de 92.000 Dalton. A molécula de plasminogénio contém um total de seis domínios estruturais onde cada um destes tem diferentes propriedades (Henkin et al., 1991). A porção N-terminal da molécula tem 5 domínios Kringle com a capacidade de se ligar à fibrina (Figura 1). Estes domínios têm a capacidade de fazer com que o plasminogénio adote conformações diferentes. O domínio protéase de serina assemelha-se ao de outras protéases de serina e contém o sítio ativo His, Asp e Ser. Esta região contém também Ala que parece ser essencial para a função normal do plasminogénio (Axelsson, 1995).

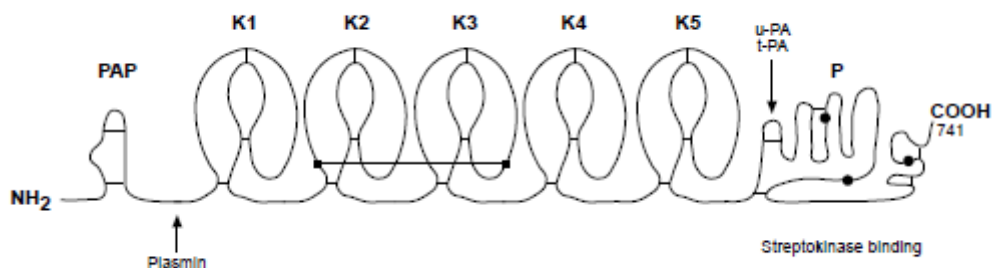


Figura 1 – Estrutura da molécula de plasminogénio humano (Axelsson, 1995).

Existem várias formas de plasminogénio no plasma humano podendo ser separadas por cromatografia de afinidade. A forma principal do plasminogénio tem um resíduo de ácido glutâmico no N-terminal sendo este denominado de Glu-plasminogénio. Existem também outras formas de plasminogénio geradas pela clivagem proteolítica, contendo a maior parte da lisina na posição N-terminal, sendo assim denominadas Lys-plasminogénio (Dobrovolsky and Titaeva, 2002).

1.1. Constituintes do sistema do plasminogénio

i. Plasmina

A plasmina é uma enzima ativa, produzida a partir de uma proenzima inativa (plasminogénio), que tem por função degradar a fibrina e ativar metaloproteinases da MEC (Collen, 1999). Através dos seus ativadores naturais, ativador de plasminogénio tecidual (t-PA) e ativador do tipo urocinase (u-PA), a ativação do plasminogénio ocorre através de clivagem proteolítica. A plasmina formada pode degradar a fibrina resultando assim em produtos de degradação da fibrina ou fragmentos (Figura 2). A plasmina pode não só degradar a fibrina mas também muitas outras proteínas do plasma, por exemplo, na coagulação, os fatores V, VIII, e vonWillebrand são os alvos da plasmina. Esta forma um complexo estável desprovido de atividade proteolítica através da inibição da sua atividade que é conseguida com os seus inibidores $\alpha 2$ -AP ou $\alpha 2$ -M (Axelsson, 1995).

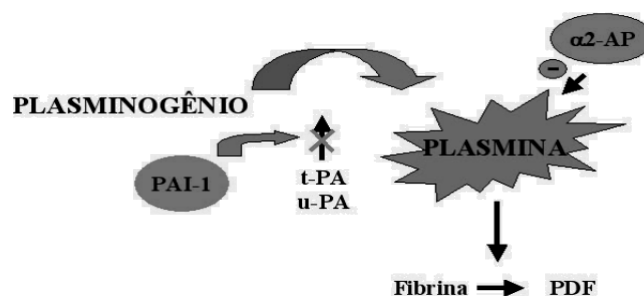


Figura 2 – Esquema do sistema fibrinolítico: produtos de degradação de fibrina (Franco, 2001).

ii. Ativadores do plasminogénio

Os ativadores do plasminogénio podem ser divididos em dois grupos: ativadores endógenos (t-PA e u-PA), circulando no sangue e em outros fluídos corporais e ativadores exógenos (secretados por bactérias). Os ativadores do plasminogénio são usados clinicamente para dissolver os coágulos e também para o tratamento de hipertensão, embolia pulmonar e enfarte agudo do miocárdio (Axelsson, 1995).

O ativador t-PA é uma proteína que é secretada por células endoteliais sendo composta por 5 domínios e é o principal ativador de plasminogénio na fibrinólise. O t-PA é estruturalmente diferente do u-PA apesar das suas funções serem semelhantes. O ativador t-PA foi inicialmente identificado como um produto de células de melanoma (Loscalzo and Braunwald, 1988). O u-PA é uma protéase que foi isolada a partir da urina e que tem a capacidade de ativar o plasminogénio. Esta pode apresentar-se em duas formas, uma de cadeia simples e outra contendo duas cadeias polipeptídicas unidas por uma ligação de dissulfureto (Figura 3) (Maksimenco, 1995). Este ativador está associado a processos como a remodelação de tecidos, a inflamação e a cicatrização, entre outros (Fazioli and Blasi, 1994).

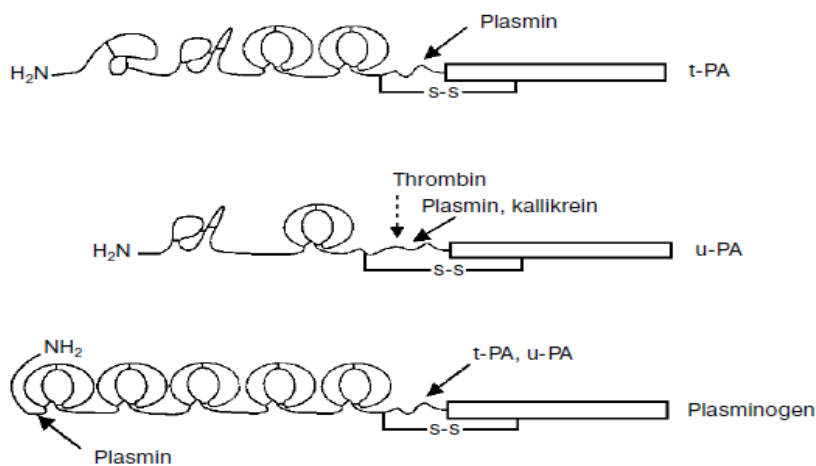


Figura 3 – Estrutura de domínios de t-PA, u-PA e plasminogénio (Dobrovolsky and Titaeva, 2002).

Streptocinase

A streptocinase (SK) é uma proteína secretada por várias espécies de bactérias que pode ligar e ativar o plasminogénio. É portanto um ativador exógeno do plasminogénio. Este ativador forma um complexo esquiométrico 1:1 com o plasminogénio humano sendo a formação deste complexo acompanhada por uma mudança conformacional que modifica a molécula de plasminogénio. Especificamente, ocorre a exposição do sítio ativo para ativar uma segunda molécula de plasminogénio, seguido pela conversão do complexo SK-plasminogénio num complexo SK-plasmina. Ambos os complexos formados são ativadores eficientes de plasminogénio (Figura 4) (Axelsson, 1995).



Figura 4 – Sequência SK, reações do plasminogénio humano e da plasmina (Axelsson, 1995).

iii. Inibidores dos ativadores do plasminogénio e outros inibidores

Existem quatro proteínas diferentes, que pertencem à família das proteases de serina que foram identificadas como inibidores dos ativadores do plasminogénio. Os ativadores endógenos t-PA e u-PA no sangue são inibidos por uma glicoproteína, sintetizada pelo endotélio, chamado inibidor do ativador do plasminogénio tipo-1 (PAI-1). Existe também o PAI-2 que é sintetizado pela placenta, monócitos e macrófagos e que no sangue normal não é detetado podendo aparecer em várias doenças. Ainda foram descritos os inibidores PAI-3 e PAI-4 cuja função é serem inibidores da proteína C (Krishnamurti and Alving, 1992). Existe ainda α 2-antiplasmina (α 2-AP) que é um inibidor de plasmina primário no plasma. Vários estudos mostraram que a ligação do plasminogénio/plasmina a vários substratos ocorre via locais de ligação a resíduos de lisina (*lysine binding-sites*) nas moléculas de plasminogénio/plasmina. Este facto,

justifica a observação seguinte: estando *lysine binding-sites* ocupados (por exemplo com o ácido ϵ -aminocapróico, um análogo de lisina), a inibição por α 2-AP é notoriamente reduzida (Coleman and Benach, 1999).

O principal alvo do sistema fibrinolítico são os coágulos de fibrina que são depositados no sistema intravascular. No entanto, devido ao facto da plasmina ter um largo espectro de ação, está implicada na degradação de uma grande quantidade de substratos (Coleman and Benach, 1999). Para além de poder danificar diretamente a membrana basal (MB) das células por degradação direta da laminina e fibronectina, também as danifica indiretamente, através da ativação de metaloproteases de matriz (MMP), pois estas têm a capacidade de degradar todos os componentes das MEC, assim como modular a imunidade microbiana e a inflamação (DeClerck and Laug, 1996).

2. Interação entre o sistema do plasminogénio e as bactérias

Como já referi, o sistema do plasminogénio dos mamíferos tem um papel fundamental na fibrinólise e na degradação da MEC, pois este está também envolvido na migração das células eucarióticas (Lahteenmaki et al., 2001). Por outro lado, existem imensas espécies patogénicas que intervêm com o sistema do plasminogénio, o que leva a pensar que estas usam o plasminogénio para adquirirem uma capacidade proteolítica superficial que lhes permite, em primeira instância a obtenção de nutrientes e também a migração facilitada através de barreiras teciduais (Lahteenmaki et al., 2001).

O plasminogénio é uma enzima que circula no plasma com uma concentração elevada (cerca de 180 μ g/ml) e, após ativação é convertido em plasmina. Como já referi, o plasminogénio é geralmente ativado por t-PA e u-PA e convertido em plasmina. A plasmina degrada não só coágulos de fibrina (fibrinólise) mas também vários componentes da MEC e ativa as pró-MMPs. Estas pró-MMPs, na sua forma ativa, degradam várias proteínas da MEC e da MB (Parks et al., 2004). Esta ativação é controlada pela produção dos ativadores t-PA e u-PA juntamente com o PAI-1 e em seguida, a ação da plasmina é regulada por α 2-AP e α 2-M que são os seus inibidores (Lijnen and Collen, 1995). A existência de inibidores dos ativadores do plasminogénio

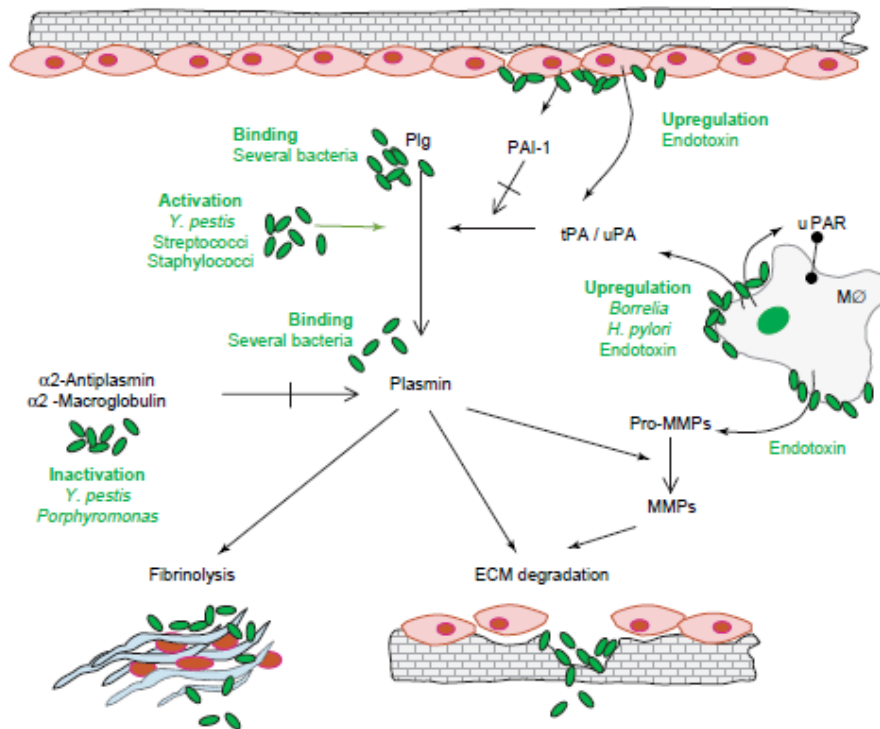


Figura 6 – Visão geral do sistema do plasminogénio dos mamíferos, seu controlo e como as bactérias patogénicas interatuam com este sistema (Lahteenmaki et al., 2005).

A interação das bactérias com o plasminogénio pode ser feita através da imobilização do plasminogénio ou da plasmina à superfície dos patogénios, aumentando assim a capacidade ativação do plasminogénio pelo t-PA e protegendo a plasmina da ação da $\alpha 2$ -AP (Boyle and Lottenberg, 1997, Lahteenmaki et al., 2005).

De facto, foram já identificados vários recetores de plasminogénio à superfície de várias bactérias e curiosamente muitos deles são proteínas *housekeepig*, como por exemplo, enzimas glicolíticas (Lahteenmaki et al., 2005, Magalhães, 2012). Estas proteínas são usualmente designadas por *moonlighting* visto terem várias funções. A produção de ativadores de plasminogénio (PAs) é limitada a poucas espécies de bactérias patogénicas (por exemplo, o *Streptococcus pyogenes* produz a streptocinase, o *Staphylococcus aureus* produz estafilocinase, a *Y. pestis* produz Pla, ambos ativadores exógenos); no entanto, várias bactérias estimulam a secreção dos ativadores endógenos de plasminogénio e outras inibem a secreção de inibidores dos ativadores de plasminogénio (Boyle and Lottenberg, 1997).

A ligação de plasminogénio ao recetor superficial bacteriano (Figura 6) permite que as bactérias se transformem em organismos proteolíticos utilizando o sistema do plasminogénio do hospedeiro para disseminar dentro do hospedeiro. Há ainda bactérias patogénicas, como por exemplo a *Y. pestis* e *Porphyromonas gingivalis*, que podem aumentar a proteólise do hospedeiro inibindo a ação dos inibidores de plasmina α 2-AP e α 2-M (Travis et al., 1995).

Foi descrito que a SK de Streptococcus e a estafilocinase de *S. aureus* são proteínas secretadas que formam complexos 1:1 com o plasminogénio levando à alteração da sua conformação e especificidade (Lahteenmaki et al., 2005). A SK é secretada pelos grupos A, C e G de estreptococos mas o seu papel na virulência bacteriana tem vindo a ser estudado principalmente no GAS. Estes são patogénios invasivos que podem causar doenças de pele e de faringe como outras doenças que poderão até mesmo ser fatais (Lahteenmaki et al., 2005).

Foram descritos dois recetores de plasminogénio nos grupos A, B e C de Streptococcus: a proteína M estreptocócica do grupo A e as enzimas glicolíticas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e α -enolase. A GAPDH foi descrita como sendo uma proteína superficial no fungo *Candida albicans* e, para além de ligar ao plasminogénio, também se liga a outras proteínas da MEC como a laminina e a fibronectina, estando esta ligação relacionada com a capacidade de adesão deste fungo e portanto com a sua patogenicidade (Gozalbo et al., 1998). A α -enolase e a GAPDH são enzimas centrais para o crescimento das bactérias sendo por isso designadas *housekeeping*, como já referi. Na análise da sua presença à superfície bacteriana é plausível afirmar que são importantes para que as bactérias patogénicas explorem o sistema do plasminogénio em seu benefício, ou seja, para um aumento da sua virulência (Lahteenmaki et al., 2005).

As interações das bactérias com o sistema do plasminogénio ainda são bastante complexas, pois ainda não é possível entender completamente tanto as suas funções como os mecanismos patogénicos. No entanto, sabe-se que uma enorme lista de agentes patogénicos mostra reatividade com os componentes do sistema do plasminogénio *in vitro* (Lahteenmaki et al., 2001). Curiosamente, a maioria dos recetores identificados do plasminogénio bacteriano têm funções essenciais, tais como, adesão, movimento e função metabólica (Lahteenmaki et al., 2005).

State of the art relativo ao papel do sistema do plasminogénio na quebra da barreira hematoencefálica por *Streptococcus agalactiae* e outros microrganismos

Em suma, pensa-se que o objetivo dos microrganismos ao interagir com o sistema do plasminogénio é adquirirem uma atividade proteolítica superficial aumentando o seu poder de invasão e a sua patogenicidade (Coleman and Benach, 1999).

II. Barreira hematoencefálica

A BHE isola o meio interno do SNC em relação à circulação sanguínea, sendo desta forma uma interface reguladora entre a circulação periférica e o SNC (Kim, 2008). Esta mesma barreira desempenha um papel muito importante na proteção do cérebro, um papel vital, pois impede não só a passagem e a troca de iões e moléculas orgânicas entre o plasma sanguíneo e o tecido nervoso, como também a entrada de diversos microrganismos (DeBoer and Dodd, 2007).

A BHE (Figura7), uma barreira estrutural e funcional, é formada por células microvasculares endoteliais do cérebro, astrócitos, pericitos e ainda por micróglia (Kim, 2008).

Os astrócitos são células cerebrais em forma de estrela, aderem à superfície externa do endotélio e da MB da BHE e ligam os neurónios aos capilares sanguíneos. Estas células são excitáveis e desempenham um papel importantíssimo na modulação da atividade neuronal e no processamento de informações. São também células muito importantes no controlo do tónus vascular e é neste sentido que o papel dos astrócitos, na manutenção das células endoteliais da microvasculatura cerebral tem sido estudado. Estas células podem ainda, influenciar a atividade e a sobrevivência dos neurónios, pois têm a capacidade de controlar os constituintes do meio extracelular, absorvendo excessos localizados de neurotransmissores e sintetizando moléculas neuro ativas (Kim, 2008).

Os pericitos são células cerebrais contráteis que regulam o fluxo sanguíneo capilar através da contração e relaxamento. Estas células desempenham um papel muito importante na manutenção da BHE, como a autorregulação da homeostase cerebral (Thanabalasundaram et al., 2010). De facto, a interação dos pericitos com o endotélio é essencial para a formação, maturação e manutenção da BHE. Estas células são de tamanha importância, que estudos efetuados *in vitro* revelam, que os pericitos ao terem um fator de crescimento endotelial vascular, têm a capacidade de regular a integridade da BHE (Thanabalasundaram et al., 2010).

Quanto à micróglia, as principais células imunes do cérebro, são aproximadamente 12% do conteúdo celular total, dependendo da região do cérebro, saúde ou patologia. No cérebro, a micróglia tem uma importante função de "vigilância imunológica" do sistema nervoso (Aloisi, 2001). São todos estes componentes que mantêm o microambiente neuronal através da regulação da passagem de moléculas para dentro e para fora do cérebro, e são também estes, que protegem o cérebro de toxinas e microrganismos que circulam no sangue (Kim, 2008). Todos esses componentes são chamados de "unidade neurovascular" que constitui um conceito importante para compreender a fisiologia da BHE (Kim, 2008).

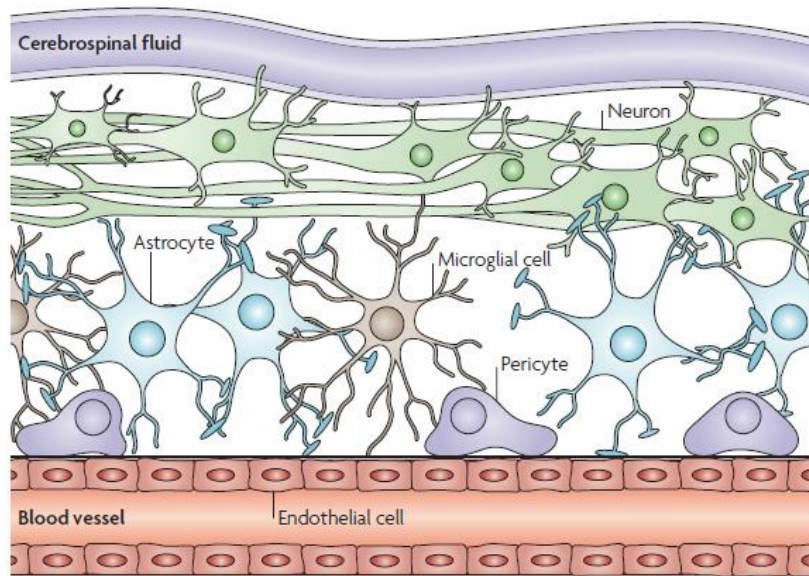


Figura 7 – BHE e seus constituintes (Kim, 2008).

A BHE é ainda formada por uma MEC, matriz esta que representa aproximadamente 20% do volume total do cérebro. A MEC é altamente organizada e está localizada na interface entre os vasos sanguíneos e as células de glia (neuróglia). A MEC serve como “âncora” com o endotélio através das interações de proteínas da MEC com os recetores endoteliais. A quebra desta matriz pode levar a alterações no citoesqueleto das células endoteliais da vasculatura cerebral, o que vai afetar a integridade da barreira, com o aumento da permeabilidade desta em estados patológicos (Thanabalasundaram et al., 2010).

A BHE tem ainda outras funções, destacando-se a comunicação entre o SNC e os tecidos periféricos. A impermeabilidade da BHE é o resultado de uma série de características únicas, que dificulta a penetração de muitas moléculas. Ao ter estas características, a BHE torna-se altamente restritiva, impedindo a passagem quer de toxinas quer de agentes terapêuticos da corrente sanguínea para o cérebro. Além das funções de permeabilidade seletiva, a BHE possui aspetos importantes, como funções neuro-imunes, incluindo a secreção de citocinas, prostaglandinas e óxido nítrico (Hugo Rojas, 2011).

1. Mecanismos de invasão na BHE

Os patógenos neuroinvasivos podem penetrar a BHE e invadir o SNC causando assim manifestações neurológicas. No entanto, os mecanismos utilizados por muitos patógenos para atravessar esta barreira ainda não são bem claros. Alguns estudos revelam que a deslocação microbiana através da BHE pode envolver uma interação microbiana com o hospedeiro (interação ligando-recetor) entre moléculas à superfície dos patógenos e várias moléculas do endotélio cerebral. Por outro lado, os sintomas neurológicos de algumas doenças estão associados com o modo de penetração desta barreira pelos vários patógenos neuro invasivos (Pulzova et al., 2009).

Um número muito elevado de agentes patogénicos é capaz de atravessar a BHE e infetar o SNC (Tabela 1).

Tabela 1 – Agentes patogénicos que causam infeções no SNC humano (Pulzova et al., 2009).

Bacteria	<i>E. coli</i> , group B <i>Streptococci</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> type B, <i>Citrobacter</i> spp., <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i> , <i>Treponema pallidum</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Meningococcus</i> , <i>Salmonella meningitis</i> , <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Francisella tularensis</i> , <i>Chryseobacterium meningosepticum</i> , <i>Kingella kingae</i> , <i>Rothia mucilaginosa</i> and <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Fungi	<i>Cryptococcus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Zygomycetes</i> , <i>Blastomyces</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Cladophialophora bantiana</i> , <i>Coccidioides immitis</i> , <i>Pseudallescheria boydii</i> , <i>Arthrographis kalrae</i> , <i>Exophiala dermatitidis</i> , <i>Ramichloridium mackenzie</i> and <i>Ochroconis gallopava</i>
Parasites	<i>Plasmodium falciparum</i> , <i>Trypanosoma</i> spp., <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Teania solium</i> , <i>Naegleria fowleri</i> , <i>Acanthamoeba</i> and <i>Angiostrongylus cantonensis</i>
Viruses	HIV-1, herpes simplex virus, rhabdovirus (rabies), influenza virus, parainfluenza virus, reovirus, lymphocytic choriomeningitis virus, arbovirus, cytomegalovirus, flaviviruses (West Nile virus, Japanese encephalitis virus, tick-borne virus, St Luis encephalitis virus, Murray Valley encephalitis virus), mumps virus, parvovirus B 19, measles virus, T-cell leukemia virus, enterovirus, morbillivirus (Nipah and Hendra virus), bunyaviruses and togaviruses

Estes agentes patogénicos podem atravessar a BHE de várias formas, transcelularmente, paracelularmente e pelo mecanismo do cavalo de Troia (Figura 8) (Pulzova et al., 2009).

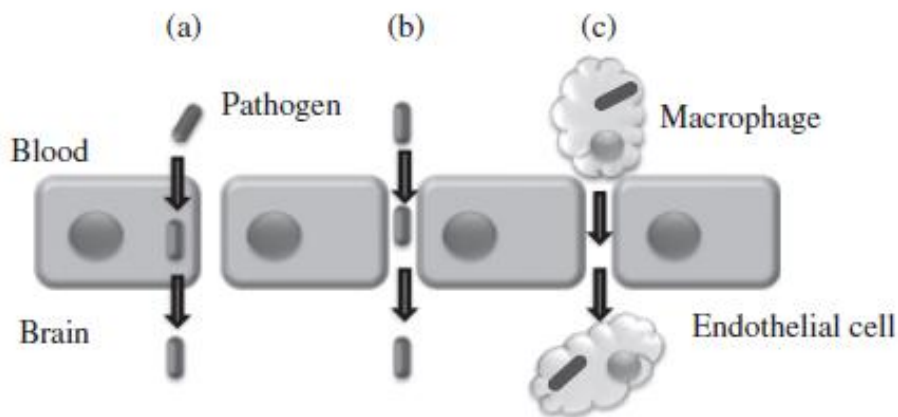


Figura 8 – Mecanismos de passagem dos patógenos pela BHE (Pulzova et al., 2009).

- (a) Passagem transcelular;
- (b) Passagem paracelular;
- (c) Mecanismo do cavalo de Troia

A passagem transcelular da BHE já foi demonstrada por imensos agentes patogénicos como por exemplo: *Escherichia coli* (*E. coli*), *S. agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* entre outros (Pulzova et al., 2009).

A penetração paracelular da BHE tem sido sugerida para *Trypanosoma* sp. No mecanismo do cavalo de Tróia, os fagócitos infetados transportam o agente patogénico através da BHE. Este mecanismo tem vindo a ser sugerido para *L. monocytogenes*, *M. tuberculosis* e para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Pulzova et al., 2009).

A disponibilidade de modelos *in vivo* permitiu esclarecer alguns dos mecanismos que estão envolvidos na passagem de microrganismos pela BHE. Alguns estudos revelaram que o principal local de entrada no SNC de microrganismos tais como *E. coli*, *S. agalactiae* e *C. neoformans* é a vasculatura cerebral (Kim et al., 1992).

Em seguida, passarei à descrição de estudos efetuados que demonstram como diversos agentes patogénicos conseguem quebrar e invadir a BHE, e desta forma provocar patologias nos seres humanos.

1.1 Invasão da BHE por alguns agentes patogénicos

Estudos realizados em humanos e em animais experimentais apontam para uma relação entre o nível de bacterémia e o desenvolvimento de meningite por *E. coli*, *S. agalactiae* e *S. pneumoniae* (Kim, 2006).

Existem ainda outros agentes causadores de meningite que invadem as HBMECs através destas mesmas interações (ligando-recetor). Um dos exemplos descritos é o *S. pneumoniae*, que interatua com as HBMEC pela ligação entre a fosforilcolina da sua parede celular e um fator ativador de plaquetas à superfície das HBMEC (Ring et al., 1998).

Quanto às consequências das infeções no SNC, as infeções por microrganismos podem induzir disfunções na BHE afetando a libertação de citocinas, quimiocinas e outras moléculas, podendo mesmo induzir a citotoxicidade e apoptose das HBMECs, cujo resultado é o aumento da permeabilidade da BHE (Kim, 2003). Esta situação verificou-

se na infeção por vários microrganismos, como por exemplo *E. Coli*, *S. agalactiae*, *N. meningitidis* e *S. suis* (Kim, 2003). Especificando esta situação, infeções provocadas por *E. coli* e *S. agalactiae* (Galanakis et al., 2006) induzem a libertação de interleucina 8 (IL-8) pelas HBMECs (Sokolova et al., 2004). Esta citocina é geralmente sintetizada por macrófagos com a capacidade de induzir a divisão de outras células (Sokolova et al., 2004).

De realçar, é o fato da libertação da IL-8 em resposta à meningite causada por microrganismos não ocorrer em células endoteliais não cerebrais como as células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs), o que elucidada bem como a resposta de IL-8 à meningite causada por microrganismos é específica para HBMECs (Kim, 2008).

Em conclusão, um conhecimento mais alargado das interações microbianas com a BHE pode elucidar o mecanismo pelo qual os agentes neuro invasivos invadem a BHE e facilitar o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção e terapia das infeções do SNC (Kim, 2008)

III. *Streptococcus agalactiae* e outros microrganismos

1. *Streptococcus agalactiae*

O *S. agalactiae* coloniza habitualmente indivíduos saudáveis assintomaticamente, mas em certas circunstâncias, tem a capacidade de invadir tecidos dos hospedeiros, escapar à deteção imunológica e causar doenças graves (Maisey et al., 2008). Esta bactéria está frequentemente presente nas membranas das mucosas dos seres humanos e dos animais, colonizando principalmente o trato intestinal e geniturinário em humanos (GAGO, 2008). O *S. agalactiae* é a causa mais comum de meningite neonatal. A mortalidade desta doença é aproximadamente de 30%, ficando 50% dos sobreviventes com diversas sequelas neurológicas entre elas, cegueira, surdez, e deficiências de desenvolvimento (Annette K. Ansong, 2009). A doença provocada por esta bactéria é tida como causa importante não só de septicémia e pneumonia em recém-nascidos mas também em adultos imunodeprimidos (Franzolin et al., 2005). Assim, uma melhor compreensão da interação do *S. agalactiae* com o hospedeiro fornece não só informações importantes sobre a patogénese desta bactéria mas também destaca alvos moleculares para intervenções terapêuticas (Maisey et al., 2008).

A doença neonatal provocada por é classificada principalmente em duas formas: a doença de início precoce (*early onset disease*, EOD) e a doença de início tardio (*late onset disease*, LOD), dependendo da idade do lactente no momento de manifestação da doença (Schuchat, 2001). A doença de início precoce manifesta-se nas primeiras horas ou dias de vida (≤ 7 dias de vida), apresentando-se frequentemente sob a forma de insuficiência respiratória e pneumonia que pode rapidamente evoluir para bacterémia e choque séptico. Em contraste, a doença de início tardio por *S. agalactiae* pode ocorrer em bebés, a partir da primeira semana de vida até três meses de idade e caracteriza-se clinicamente por bacterémia com cerca de 40-60% de progressão para meningite (Johri et al., 2006). Após o terceiro mês, as manifestações clínicas da infeção por *S. agalactiae* são raras mas há relatos recentes de doença de início ultra-tardio descrevendo casos de meningite (Guilbert et al., 2010). Embora não haja nenhuma informação sobre a causa

da infeção nestes casos, demonstrou-se que há uma correlação com a prematuridade (Guilbert et al., 2010).

Como já referi, nos casos de EOD, a infeção sistémica é mais comum no nascimento ou dentro das primeiras 24 h acompanhada por insuficiência respiratória e pneumonia, que progride rapidamente para síndrome de choque séptico e, menos frequentemente para meningite (Melin, 2011). A infeção de início precoce causada por *S. agalactiae* é caracteristicamente relacionada ao facto da mãe estar infetada no trato genital (assintomaticamente) com *S. agalactiae*, existindo uma relação direta entre a densidade de colonização vaginal no início do trabalho de parto, o risco de transmissão vertical e probabilidade de doença neonatal grave (Melin, 2011). O segundo pico de incidência da doença, LOD, pode ocorrer em crianças até vários meses de idade (7-90 dias). Como já referi, bebés com *S. agalactiae*-LOD apresentam geralmente bacterémia e muitas vezes (quase um quarto dos casos) podem desenvolver meningite (Melin, 2011). Em contraste com EOD, tem sido relatado que a LOD nem sempre é adquirida da mãe (Melin, 2011). Portanto, apesar da aquisição da LOD por *S. agalactiae* não estar completamente esclarecida, a transmissão vertical, a aquisição hospitalar ou infeção através do leite durante a amamentação são apontados como prováveis causas (Schuchat, 2001). Pensa-se que o contacto do bebé com o canal de parto (contaminado) durante o parto, origina infeções persistentes das mucosas do recém-nascido que eventualmente podem levar à disseminação bacteriana e meningite (Fluegge et al., 2006).

Antes da introdução de qualquer estratégia preventiva, a incidência natural de *S. agalactiae* varia entre 0,5 a 4 casos por mil nascidos vivos, com importantes variações geográficas. Nos EUA, após a implementação generalizada de estratégias preventivas, a incidência diminuiu drasticamente de 1,7 casos por 1000 nascidos vivos em 1993 para menos de 0,4 casos por mil nascidos vivos em 2008. Nos países europeus, onde estas estratégias preventivas foram adotadas, uma queda importante da incidência de *S. agalactiae* foi também observada (Coleman et al., 1997). No entanto, durante o período de 20 anos, a incidência da LOD por *S. agalactiae* manteve-se relativamente estável, com 0,4 casos por 1000 nascidos vivos (Figura 9) (Verani et al., 2010).

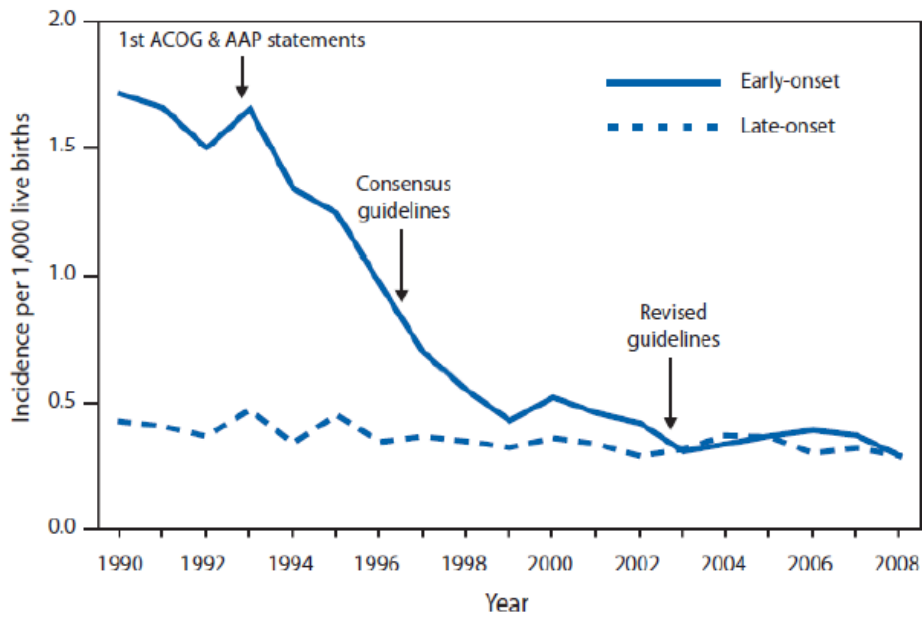


Figura 9 – Variação da incidência precoce e tardia da doença invasiva por *S. agalactiae*, entre 1990 e 2008 (por implementação de estratégias preventivas) (Verani et al., 2010)

O desenvolvimento das doenças causadas por *S. agalactiae* demonstra o sucesso da colonização bacteriana no epitélio vaginal, na penetração de barreiras epiteliais, na resistência à depuração imunológica permitindo a sua sobrevivência na corrente sanguínea e, em casos de meningite, a capacidade de atravessar a BHE. Para superar estes obstáculos, o *S. agalactiae* expressa um conjunto de moléculas superficiais diversificado e secreta fatores de virulência específicos que medeiam as interações específicas da célula-hospedeiro (Campbell et al., 2000).

Sendo *S. agalactiae* a principal causa de meningite em recém-nascidos, foram feitos vários estudos, que mostraram que o risco de meningite por *S. agalactiae* está correlacionado com a magnitude e duração da bacterémia; e a distribuição perivascular da bactéria com o SNC reflete o tropismo do microrganismo para o endotélio da BHE (Doran et al., 2005).

Estudos iniciais, permitiram verificar que o *S. agalactiae* invade eficazmente as HBMECs e sobrevive intracelularmente (Nizet et al., 1997). Através da microscopia eletrónica, verificou-se que o *S. agalactiae* explora as vias de internalização das HBMECs aderindo fortemente à sua superfície, induzindo o rearranjo do citoesqueleto,

e entrando nas células dentro de um vacúolo endocítico (Nizet et al., 1997). No entanto, estudos recentes mostraram que o *S. agalactiae* pode também atravessar a BHE através da sua ativação induzida por sépsis, ou seja, é provável que, à semelhança de outros microrganismos, a bactériemia possa promover o aumento da permeabilidade da BHE favorecendo a sua passagem (Nizet et al., 1997).

Relativamente à resposta inflamatória do hospedeiro ao *S. agalactiae*, sabe-se que contribui significativamente para a patogénese da meningite e lesões do SNC. O início da resposta inflamatória é desencadeada pelo endotélio da BHE, ocorrendo a ativação de um padrão específico de transcrição de genes para o recrutamento de neutrófilos, incluindo a produção de interleucinas (por exemplo IL-8, como já referi) e de recetores endoteliais (Doran et al., 2003). Sabe-se também que a β -hemolisina/citolisina (uma das toxinas formadoras de poros de *S. agalactiae*) induz a secreção de IL-8 e do recetor de neutrófilos (molécula de adesão intercelular-1 ICAM-1), promovendo assim a migração de neutrófilos através das monocamadas das BMEC. Os autores deste estudo sugeriram então que esta toxina é crucial para a manifestação específica da doença ao nível do SNC (Doran et al., 2003). Também tem sido relatado que a produção de β -hemolisina/citolisina faz com que o *S. agalactiae* aumente a sua sobrevivência no sangue humano e que este fenótipo pró-sobrevivência está relacionado com a sua capacidade de induzir citólise e apoptose nos fagócitos (Liu et al., 2004).

O sistema de plasminogénio como já referi, contribui para a invasão do SNC por *S. agalactiae* (Magalhães, 2012). A interação de *S. agalactiae* com o sistema do plasminogénio do hospedeiro contribui para a sua invasividade. De facto, um estudo recente permitiu verificar que esta interação potencia a transcitose da bactéria *in vitro* e para a colonização do cérebro *in vivo*, (num modelo animal) (Magalhães, 2012).

A aquisição de uma atividade de plasmina pela superfície da célula bacteriana é uma grande vantagem para as bactérias invasivas, uma vez que podem contribuir para a penetração tecidual. Isto foi verificado *in vitro* num ensaio com Transwells, na passagem do *S. agalactiae* através das HBMEC (Magalhães, 2012) levando à hipótese que a interação da bactéria com o plasminogénio facilita a penetração da BHE e consequentemente do SNC.

Por outro lado, vários estudos efetuados com o *S. agalactiae* indicam que este agente patogénico causador de meningite invade HBMECs através de interações ligando-recetor (não é esta ref. é o Nizet 1997).

Foram descritas uma variedade de proteínas associadas à ligação e invasão de HBMECs durante a infeção por *S. agalactiae* designadas determinantes de virulência: proteínas ligantes à laminina e ao fibrinogénio, *pili*, o glicolípido IagA, a glicoproteína Srr-1 (Serine-rich repeat-1) e a proteína HvgA (de clones ST-17) (Tenenbaum et al., 2007).

Em seguida, é apresentado um esquema que resume os vários mecanismos de adesão e invasão de *S. agalactiae*.

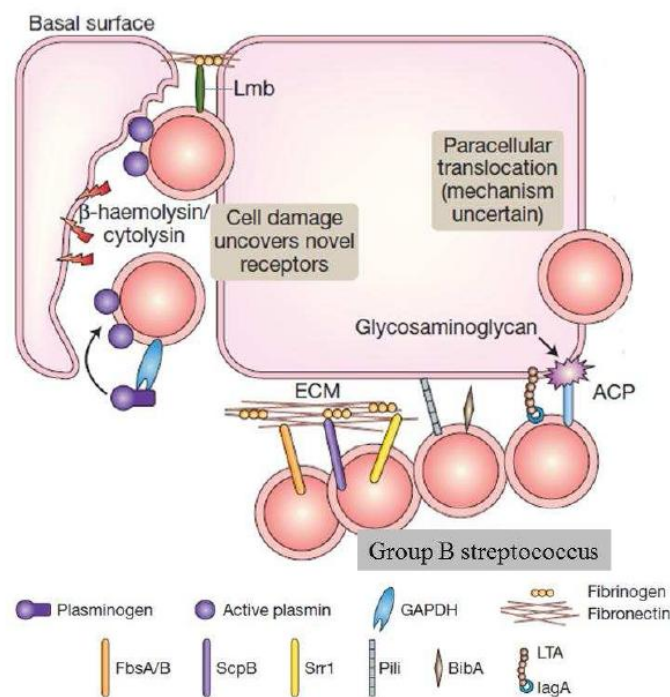


Figura 10 – Mecanismos de adesão e invasão de *S. agalactiae* (Maisey et al., 2008)

A interação do *S. agalactiae* com o plasminogénio é mediada por proteínas recetoras à superfície da bactéria tendo sido identificadas e recentemente descritas: GAPDH, enolase, frutose bifosfato-aldolase e fosfogliceromutase (Magalhães, 2012). De destacar que todos estes recetores, são enzimas glicolíticas que se encontram à superfície da bactéria. Esta situação não é estranha visto várias enzimas glicolíticas já

terem sido previamente descritas como recetores de plasminogénio superficiais, noutros microrganismos, sendo por isso designadas proteínas *moonlighting* (Magalhães, 2012). Estes recetores imobilizam o plasminogénio na superfície das bactérias “melhorando” a sua ativação e transformando as bactérias em organismos proteolíticos. Um estudo recente mostrou que a GAPDH de *S. agalactiae* é libertada para o meio extracelular após a lise celular, é (re)associada com a superfície bacteriana induzindo a apoptose nos macrófagos (Oliveira et al., 2012). O *S. agalactiae* é considerado um agente patogénico extracelular, contudo tem a capacidade de invadir as células eucarióticas. A interação das bactérias com o sistema do plasminogénio está considerada como um mecanismo de invasão generalizado, ou seja, usado por uma grande variedade de microrganismos. Assim, uma grande variedade de bactérias, fungos e parasitas utilizam esta estratégia para invadir as células hospedeiras. A relevância clínica desta estratégia de invasão reside no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas por bloqueio da interação do microrganismo com plasminogénio. Ou seja, a identificação dos recetores superficiais de plasminogénio pode conduzir à descoberta de antagonistas ou inibidores que bloqueiem a interação. Esta estratégia terapêutica cumulativa com a antibioterapia pode ajudar no controlo da infeção sistémica ou localizada por *S. agalactiae* e outros microrganismos (Lauer et al., 2005).

À medida que o tempo vai passando e que são feitas novas pesquisas em *S. agalactiae* são descobertos novos fatores determinantes de virulência ou novas funções para proteínas de superfície previamente identificadas (Lauer et al., 2005). O aumento de doença invasiva em adultos e padrões emergentes de resistência a antibióticos (Chohan et al., 2006) indicam que deve haver uma maior atenção para elucidar quanto aos fatores de virulência do *S. agalactiae* e os mecanismos pelos quais eles interagem com as células do hospedeiro e com o sistema imunológico humano. Desta forma, ao haver uma maior compreensão das bases moleculares da patogénese por *S. agalactiae*, podem ser identificadas novas moléculas bacterianas que podem representar novos alvos terapêuticos (Maisey et al., 2008).

2. *Borrelia burgdorferi*

A *B. burgdorferi* é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia e móvel. Pertence à família das espiroquetas, que são microrganismos helicoidais flexíveis (Johnson et al., 1984). Esta bactéria é causadora da doença “borreliose de Lyme”, uma doença transmitida por vetores (carraças) em zonas temperadas de América do Norte e da Europa. Embora esta infeção seja tratável, os seus sintomas são muitas vezes ignorados, resultando assim em infeções do sistema neuronal (Pulzova et al., 2011). As manifestações neurológicas da doença de Lyme em seres humanos são atribuídas, em parte, à penetração da BHE e à invasão do SNC (Grab et al., 2005). A meningite é uma das manifestações neurológicas da doença de Lyme, ocorrendo estas entre 10 a 40% das infeções clínicas (Steere, 1989). Caso estas infeções não sejam tratadas, estas manifestações podem levar a uma variedade de sintomas, tais como: dores musculares, disfunção cognitiva, parestesias, fadiga profunda e encefalopatia.

Para infetar o cérebro, as espiroquetas que estão em circulação tem que atravessar a BHE (Rubin and Staddon, 1999). Embora existam evidências de que a *B. burgdorferi* penetre no SNC (Garcia-Monco et al., 1997), ainda não é bem claro o modo de como esta bactéria o invade, se transcelularmente, se paracelularmente. Contudo, foi demonstrado que a *B. burgdorferi* atravessa as HBMEC, *in vitro* e que durante a transmigração das espiroquetas, há manutenção da integridade das monocamadas das células endoteliais, tendo sido assim sugerida uma via paracelular de transmigração (Coleman and Benach, 1999).

A *B. burgdorferi* é um patogénio em que a sua interação com o sistema do plasminogénio está documentada; especificando, utiliza o sistema do plasminogénio do hospedeiro para disseminar pelos tecidos do hospedeiro, incluindo o cérebro (Grab et al., 2005). Assim, a *B. burgdorferi* adquire uma atividade proteolítica superficial “plasmin-like” que lhe permite digerir mais facilmente os componentes das MEC (Coleman et al., 1999), podendo também ativar outras proteases, incluindo as MMPs. A *B. burgdorferi* com atividade superficial “plasmin-like” promove a degradação da MEC

e a migração de bactérias através de monocamadas endoteliais (Coleman and Benach, 1999).

Além disso, tem sido demonstrado que esta bactéria estimula a produção de pró-u-PA em monócitos humanos, e aumenta a expressão e a libertação de recetores de monócitos u-PA (Coleman et al., 2001). Consistentemente, esta bactéria adere aos componentes da MEC (Zambrano et al., 2004), o que será importante no direcionamento da ligação da bactéria à plasmina nesta mesma matriz (Gebbia et al., 1999).

Adicionalmente, verificou-se que a travessia de *B. burgdorferi* através das HBMEC induz a expressão de ativadores do plasminogénio, recetores de ativador de plasminogénio e MMPs. A *B. burgdorferi* não secreta qualquer ativador de plasminogénio, sendo o plasminogénio ligado à sua superfície ativado por ativadores endógenos como o u-PA.

Foi igualmente demonstrado que o sistema do plasminogénio se encontra ligado por uma cascata de ativação ao sistema de metaloproteinases, que potencia a degradação da BHE permitindo a esta bactéria invadir o SNC (Grab et al., 2005).

3. *Escherichia coli*

A *E. coli* é uma bactéria bacilar gram-negativa, que pertence à família das entero bactérias e é um dos microrganismos que causa meningite no período neonatal. A mortalidade e morbidade associada à meningite bacteriana continuam a ser significativas, apesar dos avanços na terapia antimicrobiana. Verificou-se que esta bactéria apresenta um mecanismo transcelular de passagem através da BHE (Kim, 2002).

Estudos de translocação de *E. coli* do sangue para o SNC tornaram-se viáveis por causa da disponibilidade tanto de modelos *in vitro* como de modelos *in vivo* da BHE. O modelo *in vitro* da BHE é composto por BMEC (Hoffman et al., 2000). O modelo *in vivo* da BHE foi estabelecido por indução de meningite em ratos (Hoffman et al., 2000). Neste modelo de “meningite experimental”, a *E. coli* é injetada via intracardíaca ou subcutânea, resultando numa entrada para o SNC, que imita a patogénese da meningite causada por *E. coli* em humanos. Esta bactéria atravessa a BHE *in vitro*, sem alterar a integridade da BMEC e *in vivo*, sem alterar a permeabilidade BHE (Stins et al., 2001). Atualmente, as interações *E. coli*-BMEC representam os mais bem caracterizados sistema de como as bactérias circulantes atravessam a BHE (Kim, 2001).

Alguns estudos mostraram que a passagem bem sucedida da BHE por *E. coli* requer um alto grau de bacterémia, invasão da BMEC e rearranjos de actina do citoesqueleto da BMEC. Adicionalmente, vários estudos em humanos e animais experimentais sugerem uma relação entre a magnitude de bacterémia e o desenvolvimento de meningite (Huang et al., 1995).

A meningite causada por *E. coli* nos animais recém-nascidos e em adultos desenvolve um elevado grau de bacterémia, no entanto, o grau de bacterémia é mais suscetível em animais recém-nascidos (Kim, 2002). Assim, a razão para a estreita associação de *E. coli* com a meningite neonatal, é a capacidade que as bactérias tem para escapar às defesas do hospedeiro e para alcançar o nível limiar de bacterémia necessário para a invasão meníngea (Stins et al., 1999). Um alto grau de bacterémia é necessária, mas não suficiente para o desenvolvimento de meningite por *E. coli* ,e a

invasão da BMEC é um pré-requisito fundamental para *E. coli* penetrar a BHE *in vivo* (Badger et al., 2000).

Foi mostrado recentemente que a *E. coli* invade as HBMEC através de interações ligando-recetor. Através da microscopia eletrónica revelou-se que a invasão de *E. coli*, está associada a rearranjos do citoesqueleto de actina das HBMECs, embora os mecanismos de sinalização envolvidos difiram entre os microrganismos causadores de meningite (Pulzova et al., 2009). Relativamente às interações bacterianas ligando-recetor em *E. coli*, verificou-se que a ligação microbiana para a invasão de HBMECs é um pré-requisito para que a penetração no SNC seja um sucesso (Kim, 2006). Esta situação verificou-se na infeção por vários microrganismos além de *E.coli*, como por exemplo *S. agalactiae*, *N. meningitidis* e *S. suis* (Kim, 2003).

Uma das principais limitações nos avanços na prevenção e terapia de meningite bacteriana é a compreensão incompleta da patogénese da doença, por exemplo, como as bactérias atravessam a BHE (Kim, 2002). O isolamento e cultivo de BMECs humanas que constituem a BHE e o desenvolvimento de um modelo experimental que mimetiza a patogénese (meningite) vem permitindo a dissecção de mecanismos patogénéticos (Kim, 2002).

E. coli mostrou que tem determinantes microbianos tais como a cápsula K1, OmpA, proteínas IBE, ASLA, Traj e CNF1 que contribuem para a invasão da BMEC, mas os seus mecanismos não se encontram completamente compreendidos, (Kim, 2002).

Um maior entendimento sobre a interação de *E. coli*-BMEC na passagem da BHE deve contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias para prevenir a meningite causada por *E. coli* (Kim, 2002).

Embora ainda não sejam conhecidas quaisquer interacções entre esta bactéria e o sistema do plasminogénio, a *E. coli* foi inserida nesta análise como exemplo de uma bactéria neuro invasiva.

4. *Yersinia pestis*

A *Yersinia pestis* é uma bactéria gram-negativa, encapsulada e móvel que pertence à família das entero bactérias e que é o principal agente patogénico da peste negra ou bubónica (Sebbane et al., 2006).

Esta bactéria persiste em muitas populações de roedores selvagens em todo o mundo, é transmitida por pulgas (que são o vetor) e provoca uma zoonose altamente invasiva que afeta não só os roedores mas também os humanos (Lahteenmaki et al., 2005).

A transmissão deste agente patogénico ao homem é feita não só pela pulga mas também pelo contato deste com os animais, podendo a patologia manifestar-se de três formas: septicémia, pulmonar e bubónica (tumefação dos gânglios linfáticos). A patologia menos falada é a pulmonar mas não a menos perigosa pois transmite-se muito facilmente através de partículas respiratórias contaminadas o que a faz ser, altamente contagiosa (Ferreira, 2000).

Quanto à propagação desta bactéria, espalha-se a partir do local subcutâneo da picada da pulga para os nódulos linfáticos. Em seguida, segue para a circulação e coloniza o fígado, o baço e os pulmões (Lahteenmaki et al., 2005). As bactérias multiplicam-se e causam linfadenopatia aguda, resultando na formação de edema linfático, necrose, inchaços e dores linfáticas dolorosas. A peste bubónica geralmente progride rapidamente para septicemia, resultando em disseminação sistémica e mortes causadas pela sépsis (Sebbane et al., 2006).

O papel da ativação do plasminogénio na patogénese desta praga está bem documentado (Lahteenmaki et al., 2005). Esta bactéria secreta uma protease, designada Pla, que cliva o plasminogénio e o converte em plasmina. A Pla também se comporta como uma adesina com afinidade para proteínas da MEC. Verificou-se que a Pla permite a migração de *Y. pestis* a partir do sítio da infeção primária intradérmica para a circulação. Não foram identificados quaisquer recetores de plasminogénio ou de plasmina à superfície de *Y. pestis*, mas é notável que a Pla não só ativa o plasminogénio como também inativa a₂-AP (Figura 11). Isto explica como a plasmina formada por *Y.*

pestis permanece ativa no soro que contém $\alpha 2$ -AP em abundância (Lahteenmaki et al., 2005).

Estes processos proteolíticos, “plasmin-like” não reguláveis pelos inibidores fisiológicos do hospedeiro, provocam *in vitro* a degradação da MEC e dos componentes da MB o que permite a esta bactéria disseminar a partir do local de infeção (Roggwiller et al., 1997).

Em suma, vários estudos revelaram que a *Y.pestis* é uma bactéria que tem a capacidade de interagir com o sistema do plasminogénio e que para além da sua capacidade de ligação a esta molécula, tem também a capacidade de o ativar e inibir a ação do inativador $\alpha 2$ -AP (Ferreira, 2000).

Em seguida é apresentada a esquematização da atividade proteolítica da bactéria *Y. pestis*.

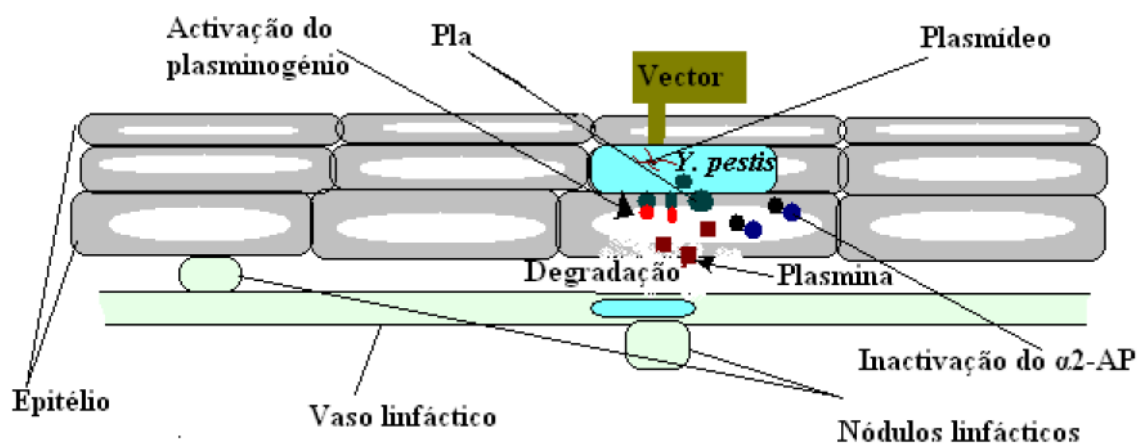


Figura 11 – Esquema da atividade proteolítica de *Yersinia pestis* (Ribeiro, 2011)

5. *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori é uma bactéria Gram-negativa que infeta a mucosa do estômago, um órgão que é considerado um ambiente muito hostil para a colonização bacteriana (Schmidt and Hensel, 2004).

As infeções por *H. pylori* são comuns e frequentemente adquiridas na infância podendo a infeção aguda levar à colonização crónica da mucosa gástrica. Isto geralmente conduz à colonização de gastrite crónica, e formas subsequentes da doença, dependem de fatores do hospedeiro, bem como de fatores bacterianos. Na maioria dos indivíduos com gastrite, a infeção pode permanecer assintomática. No entanto, pacientes com baixa ou elevada produção de ácido gástrico podem desenvolver úlcera gástrica ou duodenal (Schmidt and Hensel, 2004).

O *H. pylori* é uma bactéria curva, em forma de bastonete com um grupo de flagelos polares. A sua motilidade é um importante fator de virulência e permite que as bactérias penetrem a camada de mucina do epitélio gástrico (Josenhans and Suerbaum, 2002). Esta bactéria também tem a capacidade de produzir urease, que é uma enzima que catalisa a formação de dióxido de carbono e de amoníaco e que pode neutralizar o pH ácido na vizinhança das bactérias (Schmidt and Hensel, 2004).

O *H.pylori* expressa à sua superfície recetores com afinidade para diversas proteínas do organismo humano, como os componentes da MEC (laminina, fibronectina e colagénio do tipo I e IV) e o plasminogénio (Pantzar et al., 1998). O *H. pylori* ao colonizar a mucosa gástrica dos seres humanos, está associado a várias formas de infeção de doenças gástricas, tais como: gastrite crónica, úlceras pépticas, adenocarcinoma gástrico e mucosa linfoide associada ao tecido linfoide do estômago (Dubreuil et al., 2002).

As úlceras crónicas estão associadas a danos nos tecidos e a danos de penetração, e até à data, a imobilização e a conversão de plasminogénio na superfície de *H. pylori* é o único mecanismo proteolítico de adesão e invasão conhecida desta bactéria (Nilius et al., 1996). Assim, verificou-se que isolados de *H. pylori* ligam o plasminogénio *in vitro*.

Esta ligação é sensível a análogos da lisina e o plasminogénio ligado é ativado pelo activador endógeno, t-PA (Pantzar et al., 1998).

Recentemente, foram identificados e caracterizados dois genes (pgbA e pgbB) que codificam para proteínas com a atividade recetora de plasminogénio (Jonsson et al., 2004). Verificou-se que estas proteínas se ligam ao plasminogénio, imobilizando-o de forma a revestir o exterior da bactéria com plasminogénio. Apesar destas proteínas apresentarem apenas 27% de identidade de sequência, partilham um elevado teor de resíduos de lisina (Lahteenmaki et al., 2001).

Como já referido, o *H. pylori* tem uma riqueza de interações adesivas com os componentes da MEC (Figura 12), o que direciona a bactéria para a adesão à mucosa gástrica, que é rica em componentes do sistema do plasminogénio, o que potencia a penetração dos tecidos e a carcinogénese. Deste modo, a bactéria ao interagir com o plasminogénio, adquire uma atividade proteolítica “plasmin-like” que lhe permite uma maior facilidade de penetração tecidual, estimula a inflamação, bem como torna deficiente a cicatrização de feridas. Estes efeitos, têm como consequência, a formação de úlceras e o favorecimento de um processo de carcinogénese (Lahteenmaki et al., 2005).

Em seguida é apresentada a esquematização da atividade proteolítica da bactéria *H. pylori*.

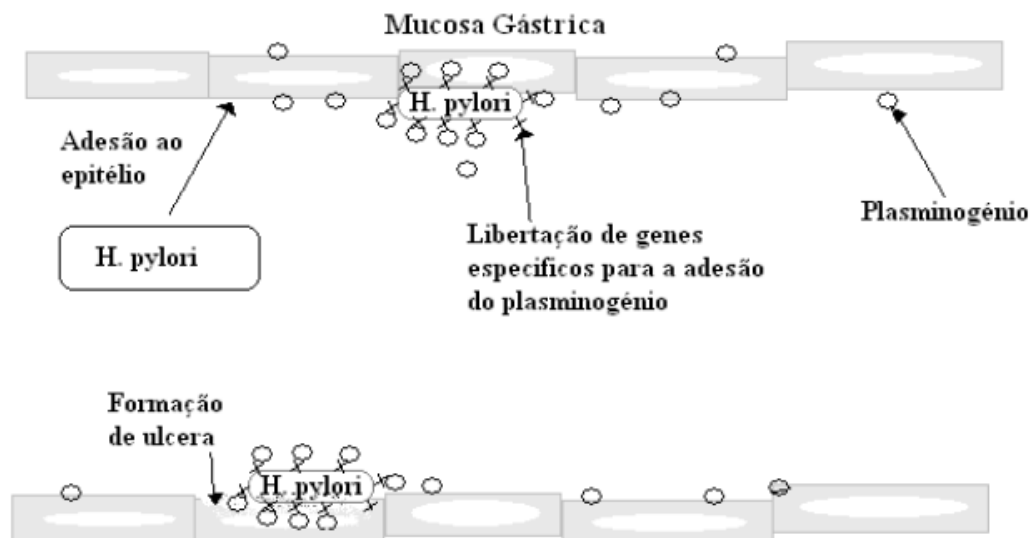


Figura 12 – Esquema da atividade proteolítica de *Helicobacter pylori* (Ribeiro, 2011)

Também tem sido descrito que a *H. pylori* produz proteínas ativadoras de neutrófilos (HP-NAP) como por exemplo as α -TNF que, em contradição com os efeitos “fibrinolíticos” analisados até agora, é capaz de aumentar o potencial pró-coagulante de *H. pylori* através da inibição de atividades fibrinolíticas, o que provavelmente será benéfico para as bactérias, protegendo-as assim contra a fagocitose (Bergmann and Hammerschmidt, 2007).

IV. Conclusão

Neste trabalho foi abordado o papel da interação de vários microrganismos com o sistema do plasminogénio e suas consequências específicas ao nível do desenvolvimento de meningite. Assim, muitos microrganismos desenvolveram estratégias para manipular a defesa do hospedeiro, através da interferência com o sistema do plasminogénio. A capacidade que os agentes patogénicos invasivos têm para interagir com o sistema fibrinolítico do hospedeiro, através do plasminogénio, e para capturarem uma forma de plasmina não regulável pelos inibidores fisiológicos à superfície bacteriana é pensado como sendo uma estratégia comum de virulência que facilita a invasão tecidual.

O *Streptococcus agalactiae* é um dos principais agentes patogénicos envolvidos na septicémia e meningite em recém-nascidos. É também uma bactéria que tem a capacidade de recrutar plasminogénio humano e a proteína ligada pode ser convertida em uma protéase ativa por ativadores endógenos ao hospedeiro.

Vários microrganismos como por exemplo GAS e *Y. pestis* produzem os seus próprios ativadores de plasminogénio. Outros microrganismos, como *B. burgdorferi* e *H. pylori*, têm a capacidade de adquirir atividade proteolítica “plasmin-like” superficial através dos seus recetores. Em qualquer mecanismo, há um aumento do poder de disseminação pelo hospedeiro e consequentemente um aumento da sua invasividade.

Quanto ao *Streptococcus agalactiae*, foi a bactéria mais destacada neste estudo devido à sua capacidade de causar doenças muito graves principalmente a meningite em recém-nascidos sendo esta doença considerada a principal causa de infeções do SNC. Esta bactéria expressa um conjunto diversificado de fatores de virulência específicos que medeiam as interações da célula-hospedeiro. Havendo uma maior e melhor compreensão da interação desta bactéria com o hospedeiro, haverá um maior conhecimento de informações muito importantes sobre a modo de ação deste patogénio, e assim, é possível destacar alvos moleculares para intervenções terapêuticas.

Em adição aos microrganismos apresentados neste trabalho, há outros que são agentes neuro invasivos, e apesar de estar documentada a sua interação com o sistema do plasminogénio, ainda não há estudos relativamente à influência desta interação sobre a invasão da BHE. São exemplos o *Haemophilus influenza* tipo B, o *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis*.

Através deste trabalho conseguimos perceber que uma melhor compreensão das interações microbianas com o hospedeiro que estão envolvidas na quebra da BHE podem ajudar no desenvolvimento de novas estratégias para prevenir as infeções do SNC.

Bibliografia

- ALOISI, F. 2001. *Immune function of microglia*. *Glia*, 36, 165-79.
- ANNETTE K. ANSONG, M., P. BRIAN SMITH, MD MHS, DANIEL K. BENJAMIN, PHD, REESE H. CLARK, MD, JENNIFER S. LI, MD MHS, C. MICHAEL COTTEN, MD MHS, BARRY MANGUM, PHARM, HARMONY P. GARGES, MD MPH, AND DANIEL K. BENJAMIN JR, MD MPH PHD 2009. *Group B Streptococcal Meningitis: Cerebrospinal Fluid Parameters in the Era of Intrapartum Antibiotic Prophylaxis*. *Early Hum Dev*.
- AXELSSON, F. 1995. *Plasminogen, Product Monograph*. COAMATIC® Plasminogen • COATEST® Plasminogen, 1-23.
- BADGER, J. L., WASS, C. A. & KIM, K. S. 2000. *Identification of Escherichia coli K1 genes contributing to human brain microvascular endothelial cell invasion by differential fluorescence induction*. *Mol Microbiol*, 36, 174-82.
- BERGMANN, S. & HAMMERSCHMIDT, S. 2007. *Fibrinolysis and host response in bacterial infections*. *Thromb Haemost*, 98, 512-20.
- BOYLE, M. D. & LOTTENBERG, R. 1997. *Plasminogen activation by invasive human pathogens*. *Thromb Haemost*, 77, 1-10.
- CAMPBELL, J. R., HILLIER, S. L., KROHN, M. A., FERRIERI, P., ZALEZNIK, D. F. & BAKER, C. J. 2000. *Group B streptococcal colonization and serotype-specific immunity in pregnant women at delivery*. *Obstet Gynecol*, 96, 498-503.
- CHOHAN, L., HOLLIER, L. M., BISHOP, K. & KILPATRICK, C. C. 2006. *Patterns of antibiotic resistance among group B streptococcus isolates: 2001-2004*. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2006, 57492.
- COLEMAN, J. L. & BENACH, J. L. 1999. *Use of the plasminogen activation system by microorganisms*. *J Lab Clin Med*, 134, 567-76.
- COLEMAN, J. L., GEBBIA, J. A. & BENACH, J. L. 2001. *Borrelia burgdorferi and other bacterial products induce expression and release of the urokinase receptor (CD87)*. *J Immunol*, 166, 473-80.
- COLEMAN, J. L., GEBBIA, J. A., PIESMAN, J., DEGEN, J. L., BUGGE, T. H. & BENACH, J. L. 1997. *Plasminogen is required for efficient dissemination of B.*

- burgdorferi* in ticks and for enhancement of spirochetemia in mice. *Cell*, 89, 1111-9.
- COLEMAN, J. L., ROEMER, E. J. & BENACH, J. L. 1999. *Plasmin-coated borrelia Burgdorferi degrades soluble and insoluble components of the mammalian extracellular matrix*. *Infect Immun*, 67, 3929-36.
- COLLEN, D. 1999. *The plasminogen (fibrinolytic) system*. *Thromb Haemost*, 82, 259-70.
- DEBOER, G. D. & DODD, J. A. 2007. *Ab initio energies and product branching ratios for the O+C3H6 reaction*. *J Phys Chem A*, 111, 12977-84.
- DECLERCK, Y. A. & LAUG, W. E. 1996. *Cooperation between matrix metalloproteinases and the plasminogen activator-plasmin system in tumor progression*. *Enzyme Protein*, 49, 72-84.
- DOBROVOLSKY, A. B. & TITAEVA, E. V. 2002. *The fibrinolysis system: regulation of activity and physiologic functions of its main components*. *Biochemistry (Mosc)*, 67, 99-108.
- DORAN, K. S., ENGELSON, E. J., KHOSRAVI, A., MAISEY, H. C., FEDTKE, I., EQUILS, O., MICHELSEN, K. S., ARDITI, M., PESCHEL, A. & NIZET, V. 2005. *Blood-brain barrier invasion by group B Streptococcus depends upon proper cell-surface anchoring of lipoteichoic acid*. *J Clin Invest*, 115, 2499-507.
- DORAN, K. S., LIU, G. Y. & NIZET, V. 2003. *Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin activates neutrophil signaling pathways in brain endothelium and contributes to development of meningitis*. *J Clin Invest*, 112, 736-44.
- DUBREUIL, J. D., GIUDICE, G. D. & RAPPUOLI, R. 2002. *Helicobacter pylori interactions with host serum and extracellular matrix proteins: potential role in the infectious process*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66, 617-29, table of contents.
- FAZIOLI, F. & BLASI, F. 1994. *Urokinase-type plasminogen activator and its receptor: new targets for anti-metastatic therapy?* *Trends Pharmacol Sci*, 15, 25-9.
- FERREIRA, W. C. S., C. J. 2000. *Microbiologia - Volume 2*.
- FLUEGGE, K., SIEDLER, A., HEINRICH, B., SCHULTE-MOENTING, J., MOENNIG, M. J., BARTELS, D. B., DAMMANN, O., VON KRIES, R. & BERNER, R. 2006. *Incidence and clinical presentation of invasive neonatal group B streptococcal infections in Germany*. *Pediatrics*, 117, e1139-45.

- FRANCO, R. F. 2001. *FISIOLOGIA DA COAGULAÇÃO, ANTICOAGULAÇÃO E FIBRINÓLISE*. Medicina, Ribeirão Preto, Simpósio: HEMOSTASIA E TROMBOSE 229-237.
- FRANZOLIN, M. R., ALVES, R. C., KELLER, R., GOMES, T. A., BEUTIN, L., BARRETO, M. L., MILROY, C., STRINA, A., RIBEIRO, H. & TRABULSI, L. R. 2005. *Prevalence of diarrheagenic Escherichia coli in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 100, 359-63.
- GAGO, L. 2008. *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE COMO CAUSA DE INFECÇÕES EM MULHERES GRÁVIDAS*. Rio de Janeiro: Escola de Saúde do Exército.
- GALANAKIS, E., DI CELLO, F., PAUL-SATYASEELA, M. & KIM, K. S. 2006. *Escherichia coli K1 induces IL-8 expression in human brain microvascular endothelial cells*. Eur Cytokine Netw, 17, 260-5.
- GARCIA-MONCO, J. C., MILLER, N. S., BACKENSON, P. B., ANDA, P. & BENACH, J. L. 1997. *A mouse model of Borrelia meningitis after intradermal injection*. J Infect Dis, 175, 1243-5.
- GEBBIA, J. A., MONCO, J. C., DEGEN, J. L., BUGGE, T. H. & BENACH, J. L. 1999. *The plasminogen activation system enhances brain and heart invasion in murine relapsing fever borreliosis*. J Clin Invest, 103, 81-7.
- GOZALBO, D., GIL-NAVARRO, I., AZORIN, I., RENAU-PIQUERAS, J., MARTINEZ, J. P. & GIL, M. L. 1998. *The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Candida albicans is also a fibronectin and laminin binding protein*. Infect Immun, 66, 2052-9.
- GRAB, D. J., PERIDES, G., DUMLER, J. S., KIM, K. J., PARK, J., KIM, Y. V., NIKOLSKAIA, O., CHOI, K. S., STINS, M. F. & KIM, K. S. 2005. *Borrelia burgdorferi, host-derived proteases, and the blood-brain barrier*. Infect Immun, 73, 1014-22.
- GUILBERT, J., LEVY, C., COHEN, R., DELACOURT, C., RENOLLEAU, S. & FLAMANT, C. 2010. *Late and ultra late onset Streptococcus B meningitis: clinical and bacteriological data over 6 years in France*. Acta Paediatr, 99, 47-51.
- HENKIN, J., MARCOTTE, P. & YANG, H. C. 1991. *The plasminogen-plasmin system*. Prog Cardiovasc Dis, 34, 135-64.

- HOFFMAN, J. A., BADGER, J. L., ZHANG, Y., HUANG, S. H. & KIM, K. S. 2000. *Escherichia coli* K1 *asfA* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells *in vitro* and *in vivo*. *Infect Immun*, 68, 5062-7.
- HUANG, S. H., WASS, C., FU, Q., PRASADARAO, N. V., STINS, M. & KIM, K. S. 1995. *Escherichia coli* invasion of brain microvascular endothelial cells *in vitro* and *in vivo*: molecular cloning and characterization of invasion gene *ibe10*. *Infect Immun*, 63, 4470-5.
- HUGO ROJAS, C. R., FELIPE DAL PIZZOL 2011. *Mecanismos de disfunção da barreira hematoencefálica no paciente criticamente enfermo: ênfase no papel das metaloproteinases de matriz*. *Rev Bras Ter Intensiva*, 222-227.
- JOHNSON, S. E., KLEIN, G. C., SCHMID, G. P., BOWEN, G. S., FEELEY, J. C. & SCHULZE, T. 1984. *Lyme disease: a selective medium for isolation of the suspected etiological agent, a spirochete*. *J Clin Microbiol*, 19, 81-2.
- JOHRI, A. K., PAOLETTI, L. C., GLASER, P., DUA, M., SHARMA, P. K., GRANDI, G. & RAPPUOLI, R. 2006. *Group B Streptococcus: global incidence and vaccine development*. *Nat Rev Microbiol*, 4, 932-42.
- JONSSON, K., GUO, B. P., MONSTEIN, H. J., MEKALANOS, J. J. & KRONVALL, G. 2004. *Molecular cloning and characterization of two Helicobacter pylori genes coding for plasminogen-binding proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 1852-7.
- JOSEPHANS, C. & SUERBAUM, S. 2002. *The role of motility as a virulence factor in bacteria*. *Int J Med Microbiol*, 291, 605-14.
- KIM, K. S. 2001. *Escherichia coli* translocation at the blood-brain barrier. *Infect Immun*, 69, 5217-22.
- KIM, K. S. 2002. *Strategy of Escherichia coli for crossing the blood-brain barrier*. *J Infect Dis*, 186 Suppl 2, S220-4.
- KIM, K. S. 2003. *Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury*. *Nat Rev Neurosci*, 4, 376-85.
- KIM, K. S. 2006. *Microbial translocation of the blood-brain barrier*. *Int J Parasitol*, 36, 607-14.
- KIM, K. S. 2008. *Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier*. *Nat Rev Microbiol*, 6, 625-34.

- KIM, K. S., ITABASHI, H., GEMSKI, P., SADOFF, J., WARREN, R. L. & CROSS, A. S. 1992. *The K1 capsule is the critical determinant in the development of Escherichia coli meningitis in the rat.* J Clin Invest, 90, 897-905.
- KRISHNAMURTI, C. & ALVING, B. M. 1992. *Plasminogen activator inhibitor type 1: biochemistry and evidence for modulation of fibrinolysis in vivo.* Semin Thromb Hemost, 18, 67-80.
- LAHTEENMAKI, K., EDELMAN, S. & KORHONEN, T. K. 2005. *Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion.* Trends Microbiol, 13, 79-85.
- LAHTEENMAKI, K., KUUSELA, P. & KORHONEN, T. K. 2001. *Bacterial plasminogen activators and receptors.* FEMS Microbiol Rev, 25, 531-52.
- LAUER, P., RINAUDO, C. D., SORIANI, M., MARGARIT, I., MAIONE, D., ROSINI, R., TADDEI, A. R., MORA, M., RAPPUOLI, R., GRANDI, G. & TELFORD, J. L. 2005. *Genome analysis reveals pili in Group B Streptococcus.* Science, 309, 105.
- LIJNEN, H. R. & COLLEN, D. 1995. *Mechanisms of physiological fibrinolysis.* Baillieres Clin Haematol, 8, 277-90.
- LIU, G. Y., DORAN, K. S., LAWRENCE, T., TURKSON, N., PULITI, M., TISSI, L. & NIZET, V. 2004. *Sword and shield: linked group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defense.* Proc Natl Acad Sci U S A, 101, 14491-6.
- LOSCALZO, J. & BRAUNWALD, E. 1988. *Tissue plasminogen activator.* N Engl J Med, 319, 925-31.
- MAGALHÃES, V. 2012. *Analysis of the interactions of Group B Streptococcus with the human plasminogen system and characterization of its role on the development of invasive infections.* Tese de Doutoramento em Ciências Biomédicas. Porto: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar.
- MAISEY, H. C., DORAN, K. S. & NIZET, V. 2008. *Recent advances in understanding the molecular basis of group B Streptococcus virulence.* Expert Rev Mol Med, 10, e27.
- MAKSIMENKO, A. V. 1995. *[Molecular interactions during fibrinolysis. Search for new plasminogen activators].* Mol Biol (Mosk), 29, 38-60.
- MELIN, P. 2011. *Neonatal group B streptococcal disease: from pathogenesis to preventive strategies.* Clin Microbiol Infect, 17, 1294-303.

- NILIUS, M., PUGLIESE, M. & MALFERTHEINER, P. 1996. *Helicobacter pylori* and proteolytic activity. *Eur J Clin Invest*, 26, 1103-6.
- NIZET, V., KIM, K. S., STINS, M., JONAS, M., CHI, E. Y., NGUYEN, D. & RUBENS, C. E. 1997. *Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B streptococci*. *Infect Immun*, 65, 5074-81.
- OLIVEIRA, L., MADUREIRA, P., ANDRADE, E. B., BOUABOUD, A., MORELLO, E., FERREIRA, P., POYART, C., TRIEU-CUOT, P. & DRAMSI, S. 2012. *Group B streptococcus GAPDH is released upon cell lysis, associates with bacterial surface, and induces apoptosis in murine macrophages*. *PLoS One*, 7, e29963.
- PANTZAR, M., LJUNGH, A. & WADSTROM, T. 1998. *Plasminogen binding and activation at the surface of Helicobacter pylori CCUG 17874*. *Infect Immun*, 66, 4976-80.
- PARKS, W. C., WILSON, C. L. & LOPEZ-BOADO, Y. S. 2004. *Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity*. *Nat Rev Immunol*, 4, 617-29.
- PULZOVA, L., Bhide, M. R. & ANDREJ, K. 2009. *Pathogen translocation across the blood-brain barrier*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 57, 203-13.
- PULZOVA, L., KOVAC, A., MUCHA, R., MLYNARCIK, P., BENCUROVA, E., MADAR, M., NOVAK, M. & Bhide, M. 2011. *OspA-CD40 dyad: ligand-receptor interaction in the translocation of neuroinvasive Borrelia across the blood-brain barrier*. *Sci Rep*, 1, 86.
- RIBEIRO, X. 2011. *Estado da arte sobre a interação de microrganismos com o sistema do plasminogénio* Porto: Universidade Fernando Pessoa.
- RING, A., WEISER, J. N. & TUOMANEN, E. I. 1998. *Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway*. *J Clin Invest*, 102, 347-60.
- ROGGWILLER, E., FRICAUD, A. C., BLISNICK, T. & BRAUN-BRETON, C. 1997. *Host urokinase-type plasminogen activator participates in the release of malaria merozoites from infected erythrocytes*. *Mol Biochem Parasitol*, 86, 49-59.
- RUBIN, L. L. & STADDON, J. M. 1999. *The cell biology of the blood-brain barrier*. *Annu Rev Neurosci*, 22, 11-28.
- SCHMIDT, H. & HENSEL, M. 2004. *Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis*. *Clin Microbiol Rev*, 17, 14-56.

- SCHUCHAT, A. 2001. *Group B streptococcal disease: from trials and tribulations to triumph and trepidation*. Clin Infect Dis, 33, 751-6.
- SEBBANE, F., JARRETT, C. O., GARDNER, D., LONG, D. & HINNEBUSCH, B. J. 2006. *Role of the Yersinia pestis plasminogen activator in the incidence of distinct septicemic and bubonic forms of flea-borne plague*. Proc Natl Acad Sci U S A, 103, 5526-30.
- SOKOLOVA, O., HEPPEL, N., JAGERHUBER, R., KIM, K. S., FROSCH, M., EIGENTHALER, M. & SCHUBERT-UNKMEIR, A. 2004. *Interaction of Neisseria meningitidis with human brain microvascular endothelial cells: role of MAP- and tyrosine kinases in invasion and inflammatory cytokine release*. Cell Microbiol, 6, 1153-66.
- STEERE, A. C. 1989. *Lyme disease*. N Engl J Med, 321, 586-96.
- STINS, M. F., BADGER, J. & SIK KIM, K. 2001. *Bacterial invasion and transcytosis in transfected human brain microvascular endothelial cells*. Microb Pathog, 30, 19-28.
- STINS, M. F., NEMANI, P. V., WASS, C. & KIM, K. S. 1999. *Escherichia coli binding to and invasion of brain microvascular endothelial cells derived from humans and rats of different ages*. Infect Immun, 67, 5522-5.
- TENENBAUM, T., SPELLERBERG, B., ADAM, R., VOGEL, M., KIM, K. S. & SCHROTEN, H. 2007. *Streptococcus agalactiae invasion of human brain microvascular endothelial cells is promoted by the laminin-binding protein Lmb*. Microbes Infect, 9, 714-20.
- TETTELIN, H., MASIGNANI, V., CIESLEWICZ, M. J., DONATI, C., MEDINI, D., WARD, N. L., ANGIUOLI, S. V., CRABTREE, J., JONES, A. L., DURKIN, A. S., DEBOY, R. T., DAVIDSEN, T. M., MORA, M., SCARSELLI, M., MARGARIT Y ROS, I., PETERSON, J. D., HAUSER, C. R., SUNDARAM, J. P., NELSON, W. C., MADUPU, R., BRINKAC, L. M., DODSON, R. J., ROSOVITZ, M. J., SULLIVAN, S. A., DAUGHERTY, S. C., HAFT, D. H., SELENGUT, J., GWINN, M. L., ZHOU, L., ZAFAR, N., KHOURI, H., RADUNE, D., DIMITROV, G., WATKINS, K., O'CONNOR, K. J., SMITH, S., UTTERBACK, T. R., WHITE, O., RUBENS, C. E., GRANDI, G., MADOFF, L. C., KASPER, D. L., TELFORD, J. L., WESSELS, M. R., RAPPUOLI, R. & FRASER, C. M. 2005. *Genome analysis of multiple pathogenic isolates of*

- Streptococcus agalactiae: implications for the microbial "pan-genome"*. Proc Natl Acad Sci U S A, 102, 13950-5.
- THANABALASUNDARAM, G., PIEPER, C., LISCHPER, M. & GALLA, H. J. 2010. *Regulation of the blood-brain barrier integrity by pericytes via matrix metalloproteinases mediated activation of vascular endothelial growth factor in vitro*. Brain Res, 1347, 1-10.
- TRAVIS, J., POTEPA, J. & MAEDA, H. 1995. *Are bacterial proteinases pathogenic factors?* Trends Microbiol, 3, 405-7.
- VERANI, J. R., MCGEE, L. & SCHRAG, S. J. 2010. *Prevention of perinatal group B streptococcal disease--revised guidelines from CDC, 2010*. MMWR Recomm Rep, 59, 1-36.
- ZAMBRANO, M. C., BEKLEMISHEVA, A. A., BRYKSIN, A. V., NEWMAN, S. A. & CABELLO, F. C. 2004. *Borrelia burgdorferi binds to, invades, and colonizes native type I collagen lattices*. Infect Immun, 72, 3138-46.