

XAVIER AMÉRICO SOARES RIBEIRO

**ESTADO DA ARTE SOBRE A INTERACÇÃO DE MICROORGANISMOS
COM O SISTEMA DO PLASMINOGÉNIO**

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA - FACULDADE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Porto, 2011

XAVIER AMÉRICO SOARES RIBEIRO

**ESTADO DA ARTE SOBRE A INTERACÇÃO DE MICROORGANISMOS
COM O SISTEMA DO PLASMINOGÉNIO**

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA- FACULDADE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Porto, 2011

XAVIER AMÉRICO SOARES RIBEIRO

**ESTADO DA ARTE SOBRE A INTERACÇÃO DE MICROORGANISMOS
COM O SISTEMA DO PLASMINOGÉNIO**

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

Orientadora:

Professora Vanessa Magalhães
(Mestre em Imunologia Clínica)

Sumário

Tem-se verificado que uma vasta gama de microorganismos tem aumentado as suas capacidades invasivas ao usar vários componentes do sistema do plasminogénio do hospedeiro. De facto, a interacção entre diferentes microorganismos e o sistema do plasminogénio tem sido descrito desde 1930. As observações iniciais, feitas por Tillet e Garner em 1933, mostraram a capacidade dos *Streptococcus* gerarem actividade fibrinolítica levando estes investigadores a sugerir que esta estivesse correlacionada com a extensão da infecção. De facto, esta hipótese foi posteriormente confirmada com vários microorganismos. Assim, diversos estudos têm sido desenvolvidos com a finalidade de interpretar estas interacções com os vários componentes do sistema do plasminogénio. Vários tipos de bactérias, parasitas, fungos e vírus afectam a regulação do sistema do plasminogénio interagindo com o plasminogénio/plasmina e seus reguladores, de forma a aumentar a concentração de plasmina nas suas imediações. A interacção com este sistema pode promover o dano dos componentes da matriz extracelular, bem como aumentar a capacidade de disseminação, dos microorganismos, por diferentes tecidos e órgãos e assim aumentar a sua invasividade.

Summary

It has been reported that a wide range of microorganisms increase their invasive ability by using multiple components of the plasminogen system of the host. In fact, the interaction between different microorganisms and the plasminogen system has been described since 1930. The initial observations made by Tillet and Garner in 1933, showed the ability of *Streptococcus* to generate fibrinolytic activity leading these researchers to suggest that this fact was correlated with the extent of infection. Indeed, this hypothesis was later confirmed by several microorganisms. Thus, several studies have been developed in order to interpret these interactions with the components of the plasminogen system. In this way, it has been described that several types of bacteria, parasites, fungus and virus affect the regulation of the plasminogen system. The pathogens interact with plasminogen/plasmin and its regulators in order to acquire a surface proteolytic plasmin-like activity. Generation of pathogen-bound plasmin, not regulated by physiological inhibitors, can be targeted to fibrin clots and increasing adhesion to basal membranes and extracellular matrices. This increased adhesion promotes the damage of extracellular matrix components and increases the capacity to spread through tissue barriers enhancing their invasiveness.

Agradecimentos

À Professora Vanessa Magalhães pela sugestão do tema desta dissertação de Mestrado, pela orientação dada, e por toda a disponibilidade demonstrada...o meu muito obrigado.

À minha família por toda a dedicação, apoio e amor demonstrado.

À Universidade Fernando Pessoa, por toda a formação e oportunidades que me deu.

ÍNDICES

Índice geral

Introdução	1
Lista de abreviaturas	3
Glossário	4
I. Introdução ao tema	7
1. O sistema do plasminogénio	8
i. Esquematização do plasminogénio	11
2. Abordagem geral da interacção dos microorganismos com o sistema do plasminogénio	11
II. Os microorganismos e o sistema do plasminogénio	16
1. Bactérias.....	17
1.1. Bactérias gram-negativas.....	17
i. <i>Helicobacter pylori</i>	17
ii. <i>Yersinia pestis</i>	19
1.2. Bactérias gram-positivas.....	21
i. <i>Bacillus anthracis</i>	21
ii. <i>Streptococcus</i> do grupo A (<i>Streptococcus pyogenes</i>)	23
2. Parasitas	26
i. <i>Acanthamoeba castellanii</i>	27
ii. <i>Schistosoma bovis</i>	29
3. Fungos.....	30
i. <i>Candida albicans</i>	31
4. Vírus.....	33
i. <i>Influenza vírus</i>	34
III. Conclusão	37
Bibliografia	39

Índice de figuras

Figura 1 – Esquematização da molécula de plasminogénio	9
Figura 2 – Esquematização do sistema fibrinolítico.....	11
Figura 3 – Esquematização geral da interacção de bactérias patogénicas com o sistema do plasminogénio.....	13
Figura 4 – Esquematização da actividade proteolítica da bactéria <i>Helicobacter pylori</i>	19
Figura 5 – Esquematização da actividade proteolítica da bactéria <i>Yersinia pestis</i>	21
Figura 6 – Esquematização da actividade proteolítica da bactéria <i>Bacillus anthracis</i>	23
Figura 7 – Esquematização da actividade proteolítica da bactéria <i>S. pyogenes</i>	26
Figura 8 – Esquematização da actividade proteolítica do protozoário <i>A. castellanii</i>	29
Figura 9 – Esquematização da actividade proteolítica do parasita <i>Schistosoma bovis</i> ..	30
Figura 10 – Esquematização da actividade proteolítica do fungo <i>Candida albicans</i>	33
Figura 11 – Esquematização da actividade proteolítica do vírus <i>Influenza</i>	36

Índice de tabelas

Tabela 1 – Composição do sistema do plasminogénio.....	10
---	----

Introdução

A presente dissertação de Mestrado é baseada na revisão da literatura no que concerne à descrição do estado da arte relativo à interacção dos microorganismos com o sistema do plasminogénio. O tema foi proposto pela coordenação de ciências-farmacêuticas e, desde logo, manifestei interesse em trabalhá-lo, uma vez que os microorganismos são seres espantosos e estão em constante adaptação/desenvolvimento. Estes seres, para além de se poderem modificar de modo a adquirirem resistência a muitos fármacos e de possuírem cada vez mais mecanismos que os permitem escapar ao sistema imunitário, têm também aumentado a sua virulência e poder de disseminação com a utilização de vários mecanismos. A presente dissertação aborda um dos mecanismos usados pelos microorganismos para aumentar a sua invasividade no hospedeiro que infectam: a sua interacção com o sistema do plasminogénio.

Inicialmente é apresentado um glossário, onde constam algumas palavras-chave essenciais para uma melhor compreensão do sistema do plasminogénio. O primeiro capítulo descreve todo o sistema do plasminogénio, mostrando como este sistema é regulado e qual a sua importância para o organismo. Ainda dentro deste capítulo, é feita uma breve descrição de como diversos microorganismos (bactérias, fungos, parasitas e vírus), interactivam com este sistema para aumentarem a sua capacidade de invasão.

No segundo capítulo é feita uma selecção dos microorganismos mais estudados, com relevância para a saúde pública, relativamente à sua interacção com o sistema do plasminogénio, procedendo-se à sua descrição. Relativamente às bactérias, o tema foi abordado nos dois grupos de classificação Gram. No grupo das Gram-positivas, estudei o *Bacillus anthracis*, pelo seu poder de propagação e sua relação com o bioterrorismo e os *Streptococcus do grupo A*, nomeadamente o *Streptococcus pyogenes*, pela grande incidência de estudos. No grupo das Gram-negativas estudei o *Helicobacter pylori*, pela sua enorme presença no organismo humano e a *Yersinia pestis* por ter sido a grande causa de morte durante a Idade Média.

Relativamente aos parasitas, foram analisados o *Acanthamoeba castellanii*, pela sua patologia e o *Schistosoma bovis*, por apresentar uma grande importância a nível veterinário. Nos fungos, analisei a *Cândida albicans* pela sua grande representatividade neste grupo. Por fim, na área de virologia, estudei o vírus *Influenza* pela sua grande infecciosidade.

No último capítulo é feita uma breve conclusão, onde são relacionados e realçados alguns aspectos importantes apresentados por estes microorganismos com a interacção do sistema do plasminogénio.

Esta revisão literária fundamenta essencialmente que diversos organismos, perante as barreiras que encontram quando invadem o hospedeiro, desenvolvem mecanismos, nomeadamente a interacção com do sistema do plasminogénio, de forma a aumentarem a sua capacidade de disseminação/invasividade. Como será descrito, para além de “usarem” vários componentes do sistema do plasminogénio, vários microorganismos intervêm na regulação dos mesmos.

Lista de abreviaturas

- **α 2-AP** – α 2-anti-plasmina
- **α 2-M** – α 2-macroglobina
- **Da** – Daltons
- **GAPDH** - Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase
- **GAS** – *Streptococcus* do grupo A
- **HA** – Hemaglutinina
- **MB** – Membrana Basal
- **MEC** – matriz extra-celular
- **MMP's** – Metaloproteases da matriz
- **NA** – Neuraminidase
- **PAI** – inibidor do activador do plasminogénio
- **PAIs** – Inibidores dos activadores de plasminogénio
- **PAI-1** – inibidor do activador do plasminogénio do tipo 1
- **PAI-2** – inibidor do activador do plasminogénio do tipo 2
- **PAM** – Proteína M estreptocócica do grupo A
- **PAM-negativas** – Bactérias que carecem da molécula PAM
- **PAM-positivas** – Bactérias que secretam a molécula PAM
- **PAP** – Péptido de pré-activação
- **PLR** – GAPDH estreptocócico do grupo A
- **PRA1** – antigénio do fungo *Cândida albicans*
- **pró-MMP's** – Pró-enzima de metaloproteases da matriz
- **pró-uPA** – Precursor de cadeia simples do activador do plasminogénio do tipo urocinase
- **SEN** – α -enolase dos GAS
- **SK** – Estreptoquinase estreptocócica
- **t-PA** – Activador do plasminogénio do tipo tecidual
- **u-PA** – Activador do plasminogénio do tipo urocinase
- **u-PAR** – Receptor do activador de plasminogénio do tipo urocinase

GLOSSÁRIO

Plasminogénio: uma glicoproteína que circula no plasma e no fluído extra-celular, a uma concentração de 2 μ mol/L. É convertido a plasmina pela intervenção de activadores específicos, t-PA e u-PA. Na sua forma nativa de 92 kDa é chamado de Glu-Plasminogénio, uma vez, que possui o ácido glutâmico no terminal amina.

Activador do plasminogénio do tipo tecidual (t-PA): é um activador do plasminogénio de 70 kDa, dos mamíferos, que é sintetizado principalmente por células endoteliais vasculares.

Activador do plasminogénio do tipo urocinase (u-PA): é um activador do plasminogénio de 50 kDa, produzidas por várias culturas de células normais e malignas, e, por monócitos/leucócitos.

Lys-plasminogen: designação comum para as formas de plasminogénio resultantes da clivagem do péptido de pré-activação (PAP) da molécula nativa (Glu-Plasminogénio).

Plasmina: é uma serino-protease de largo espectro que degrada coágulos de fibrina, a MEC, glicoproteínas e proteoglicanos. Tem a capacidade de activar pró-enzimas (pró-MMP'S) para aumentar a sua capacidade de degradação da MEC. A plasmina é compreendida por duas cadeias unidas por pontes de dissulfureto; a cadeia mais pesada possui os receptores de ligação (domínios Kringle), e, a cadeia leve contém o local catalítico.

α 2-anti-plasmina (α 2-AP): é um inibidor de serino-proteases (serpina) que inibe a plasmina solúvel através das ligações aos domínios Kringle, bloqueando os seus locais de ligação, transformando-a numa proteína inactiva. Este inibidor circula no plasma sanguíneo a uma concentração aproximada de 60 μ g/ml.

α 2-macroglobina (α 2-M): é uma anti-protease de amplo espectro, que inibe a plasmina, serino-proteases, aspartato, cisteína e metaloproteases. Apesar da sua elevada concentração, de 2,4 mg/ml, revela-se menos eficiente na inactivação da plasmina do que a α 2-AP.

Domínios Kringle: é uma estrutura de aproximadamente 80 aminoácidos, que contém locais específicos de ligação para a fibrina. Estes domínios Kringle estão presentes em muitos componentes do sistema do plasminogénio, como o plasminogénio, t-PA e u-PA.

Inibidores dos activadores de plasminogénio (PAIs): são inibidores serino-proteases (serpinas), que inibem a acção dos activadores do plasminogénio. O inibidor do activador do plasminogénio do tipo 1 (PAI-1) é o inibidor predominante no plasma, que inibe tanto o t-PA como o u-PA, enquanto, que o inibidor do activador do plasminogénio do tipo 2 (PAI-2) inibe principalmente o u-PA.

Matriz Extra-Celular (MEC): rede molecular que suporta as células de mamíferos e suas interacções, composta por componentes secretados pelas células: colagénio, glicoproteínas (laminina e fibronectina), proteoglicanos e elastina. MEC actua como uma barreira para a migração celular.

Membrana Basal (MB): finas camadas de natureza polissacarídea e delicadas fibras, situadas na região de contacto entre o epitélio e células endoteliais. Basicamente, a MB é composta por laminina, colagénio tipo IV, e proteoglicano de Heparan sulfato.

Metaloproteases da matriz (MMP's): as metaloproteases são secretadas através da degradação da matriz extra-celular (MEC), sob a forma de uma pró-enzima (pró-MMP's) e activados por proteases, tais como a plasmina e outras MMP's. As MMP's são divididas em subgrupos, de acordo com a especificidade do seu substrato; por exemplo, a collagenase degrada fibras de colagénio, e, as gelatinases degradam o colagénio tipo IV e gelatina.

Receptor do activador de plasminogénio do tipo urocinase (uPAR): é o receptor celular específico para a glicoproteína u-PA.

I. INTRODUÇÃO AO TEMA

É do conhecimento comum que uma das estratégias usadas por uma vasta gama de microrganismos para potenciar a sua invasividade é a sua interacção com o sistema do plasminogénio do hospedeiro. O sistema do plasminogénio, também designado por sistema fibrinolítico, é um sistema altamente regulado no hospedeiro saudável, que visa a fibrinólise, ou seja, a dissolução de coágulos de fibrina [1,2].

1. O Sistema do Plasminogénio

O plasminogénio, principal componente deste sistema, é uma proteína produzida pelo fígado e está presente na maioria dos fluidos biológicos (plasma e fluidos extracelulares) [3]. A molécula de plasminogénio humana na sua forma nativa é uma glicoproteína de 92 kDa, que é sintetizada como uma única cadeia peptídica de 810 aminoácidos, sendo, subsequentemente modificada, após activação proteolítica, para uma proteína de 791 aminoácidos, a plasmina [4].

A forma nativa de plasminogénio (Figura 1) é composta por 5 domínios Kringle, um domínio C-terminal homólogo a outras enzimas do tipo tripsina; na extremidade N-terminal, a molécula contém um resíduo de ácido glutâmico, sendo, por isso, designado Glu-plasminogénio. Após clivagem proteolítica, o Glu-plasminogénio é convertido na forma Lys-plasminogénio, sendo, geralmente, libertado o peptídeo de pré-activação (PAP) da extremidade amino-terminal (Figura 1) [5]. O papel fisiológico, destas alterações conformacionais, não se encontra completamente esclarecido; pensa-se que a forma Lys-plasminogénio é mais “activável” pelo t-PA [6].

O plasminogénio é uma glicoproteína abundante, que circula no plasma e no fluido extra-celular a uma concentração de 2 μ mol/L [7].

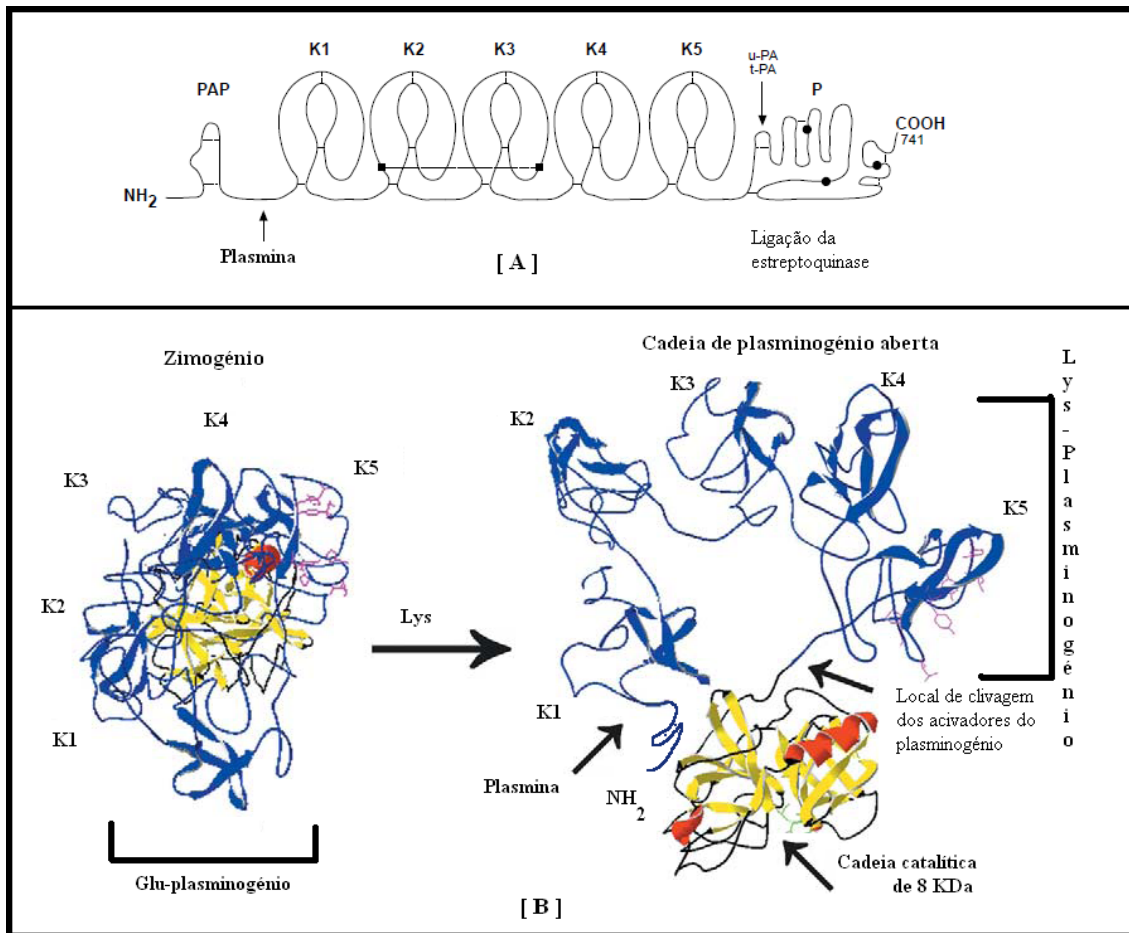


Figura 1 – Esquematização da molécula de plasminogénio.

- [A] – Domínios estruturais da molécula de plasminogénio humano [18];
- [B] – Conversões da molécula de plasminogénio [13].

Os activadores do plasminogénio são serino proteases específicas que catalisam a conversão do plasminogénio em plasmina activa, sendo classificados em dois tipos: t-PA e u-PA [8]. O t-PA é uma enzima activa de 70 kDa, secretada e sintetizada pelas células endoteliais [9]. O u-PA tem 50 kDa e pode apresentar-se em duas formas, uma de cadeia simples e outra com duas cadeias polipeptídicas unidas por uma ligação de dissulfeto [10]. Está descrito que o t-PA é o principal activador de plasminogénio na fibrinólise, estando a u-PA associado a vários outros processos como a inflamação, a cicatrização, a remodelação dos tecidos, a metástase e a invasão [11, 12].

A activação do plasminogénio é estritamente regulada por inibidores. A inibição da activação do plasminogénio pode ser mediada por PAIs (inibidores de serino-proteases ou serpinas). A plasmina circulante pode ser especificamente inactivada pelos

inibidores α 2-AP ou α 2-M que interagem com a plasmina para formar um complexo enzimaticamente inactivo [14, 15].

Os níveis de fibrina depositados no sistema intravascular são o principal alvo do sistema fibrinolítico. No entanto, a plasmina tem um largo espectro de acção, estando, também, implicada na degradação de uma grande quantidade de outros substratos [16]. Para além de danificar directamente a MB por degradação directa da laminina (a maior glicoproteína da membrana basal), a plasmina também a danifica indirectamente através da activação das MMP's que têm capacidade de degradar todos os componentes da MEC, modular a inflamação e a imunidade microbiana [17].

Tabela 1 – Composição do sistema do plasminogénio [13, 16, 18]

Composição	Massa atómica (kDaltons)	Aminoácidos	Concentração no Plasma	Tempo de vida em circulação	Local de síntese	Função
Plasminogénio	92	810	2 μ mol/L	2,2 dias	Fígado	Pro-enzima da plasmina
u-PA	50	411	8ng/ml	5-10 min.	Rim e Pulmão	Activador do plasminogénio
t-PA	70	527	5ng/ml	3-4 min.	Endotélio	Activador do plasminogénio
α 2-AP	70	452	60 μ g/ml	2,6 dias	Fígado	Inibidor da plasmina
PAI-1	52	379	20ng/ml	2-3 horas	Endotélio	Inibidor do activador do plasminogénio
PAI-2	60	393	*250ng/ml	24horas	Placenta	Inibidor do activador do plasminogénio

* Resultado recolhido em análises elaboradas na 30^o semana de gravidez.

i. Esquematização do Sistema do Plasminogénio

Todo este sistema deve ser constantemente regulado para evitar o risco de formação de trombos nos vasos sanguíneos bem como evitar a destruição dos próprios epitélios. Recorde-se que a activação do precursor enzimático, zimogénio, ocorre preferencialmente na superfície da fibrina, onde se encontram locais de ligação para a activação do plasminogénio e principalmente para o seu activador t-PA (figura 2). Para além desta ligação favorecer a activação do plasminogénio, situa a acção da plasmina para locais de formação de fibrina, promovendo a lise destes coágulos [1,2].

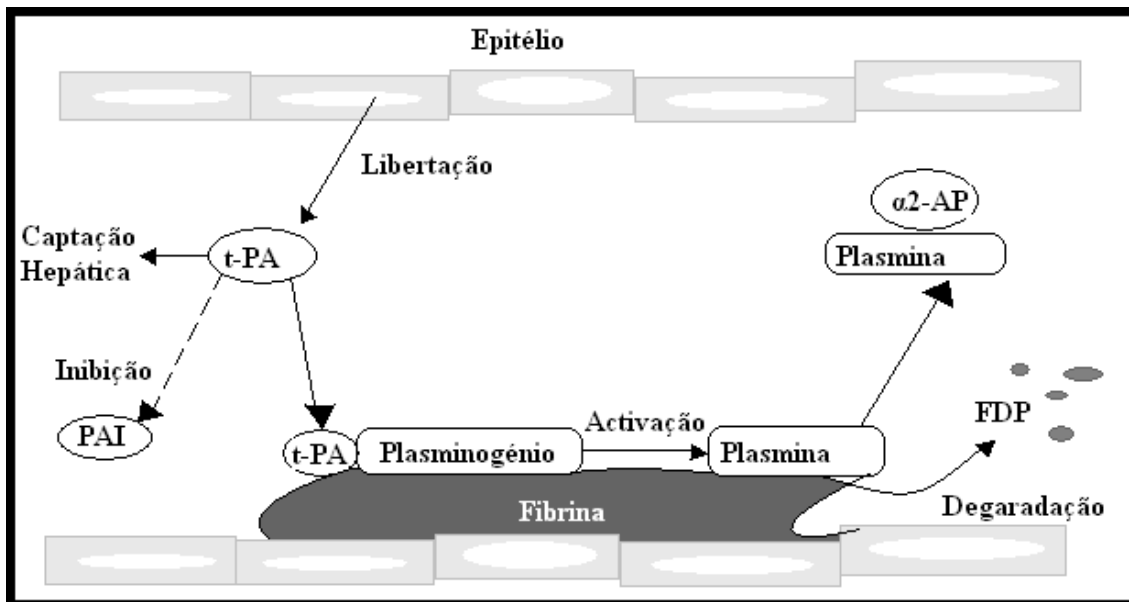


Figura 2 – Esquematização do sistema fibrinolítico. FDP – produtos de degradação de fibrina

2. Abordagem geral da interacção dos microorganismos com o sistema do Plasminogénio

É bem conhecido que uma ampla gama de microorganismos patogénicos interage com o sistema do plasminogénio. De facto, a captura do plasminogénio do hospedeiro e sua subsequente activação por activadores exógenos (produzidos pelo microorganismo) ou endógenos (produzidos pelo hospedeiro), gera uma actividade proteolítica superficial “plasmin-like” que permite ao patogénio uma maior capacidade

de invasão tecidual. Deste modo, os patogénicos adquirem uma maior capacidade de chegar aos endotélios e conseqüentemente aceder à submucosa e ao sangue [16]. De facto, esta estratégia de invasão tem sido amplamente estudada em vários microorganismos patogénicos.

Segundo Lähteenmäki, as bactérias patogénicas podem intervir com o sistema do plasminogénio em vários pontos. A figura 3, esquematiza o modo como estes microorganismos se envolvem e controlam o sistema do plasminogénio. Normalmente, o plasminogénio nativo em circulação, vai ser activado por t-PA e u-PA sendo convertido em plasmina [13]. Esta, como serino-protease altamente potente, para além de degradar coágulos de fibrina (fibrinólise), degrada vários componentes da MEC (entre os quais, fibronectina, proteoglicano, gelatina e laminina), mostrando-se pouco activa contra o colagénio e contra a elastina. Por outro lado, a plasmina vai activar Pro-MMPs, que na sua forma activa degradam colagénios, bem como, outras proteínas da MB e da MEC, que formam barreiras para a migração celular [19, 20]. O u-PA ajuda a localizar o u-PA, mediando a activação do plasminogénio à superfície celular. Recorde-se, que esta activação é normalmente controlada a nível da produção de t-PA e u-PA, juntamente com PAI-1; adicionalmente, a posterior acção da plasmina é regulada pelos seus inibidores, α 2-AP e α 2-M [21].

As bactérias (assinaladas a verde na figura 3) intervêm com o sistema do plasminogénio através da imobilização do plasminogénio, plasmina e do t-PA à sua superfície, aumentando a activação do plasminogénio pelo t-PA, e, protegendo a plasmina da acção da α 2-AP. Está descrito, que alguns patogénios têm a capacidade de activarem, por si só, o plasminogénio e outros têm capacidade de inactivar a acção das anti-proteases [22].

Os estudos realizados sobre a interacção dos microorganismos com o sistema fibrinolítico do hospedeiro revelam que estes interferem com a produção/regulação dos componentes endógenos deste sistema. Vários estudos mostraram que as bactérias e suas endotoxinas são capazes de regular a produção dos activadores e inibidores do plasminogénio [20]. A geração de bactérias com plasmina à superfície pode ser direccionada para a degradação de coágulos de fibrina e para o aumento da adesão

bacteriana à MB e MEC, levando consequentemente ao aumento da migração de bactérias através das barreiras teciduais [13,23]. A imagem que se segue ilustra o previamente descrito:

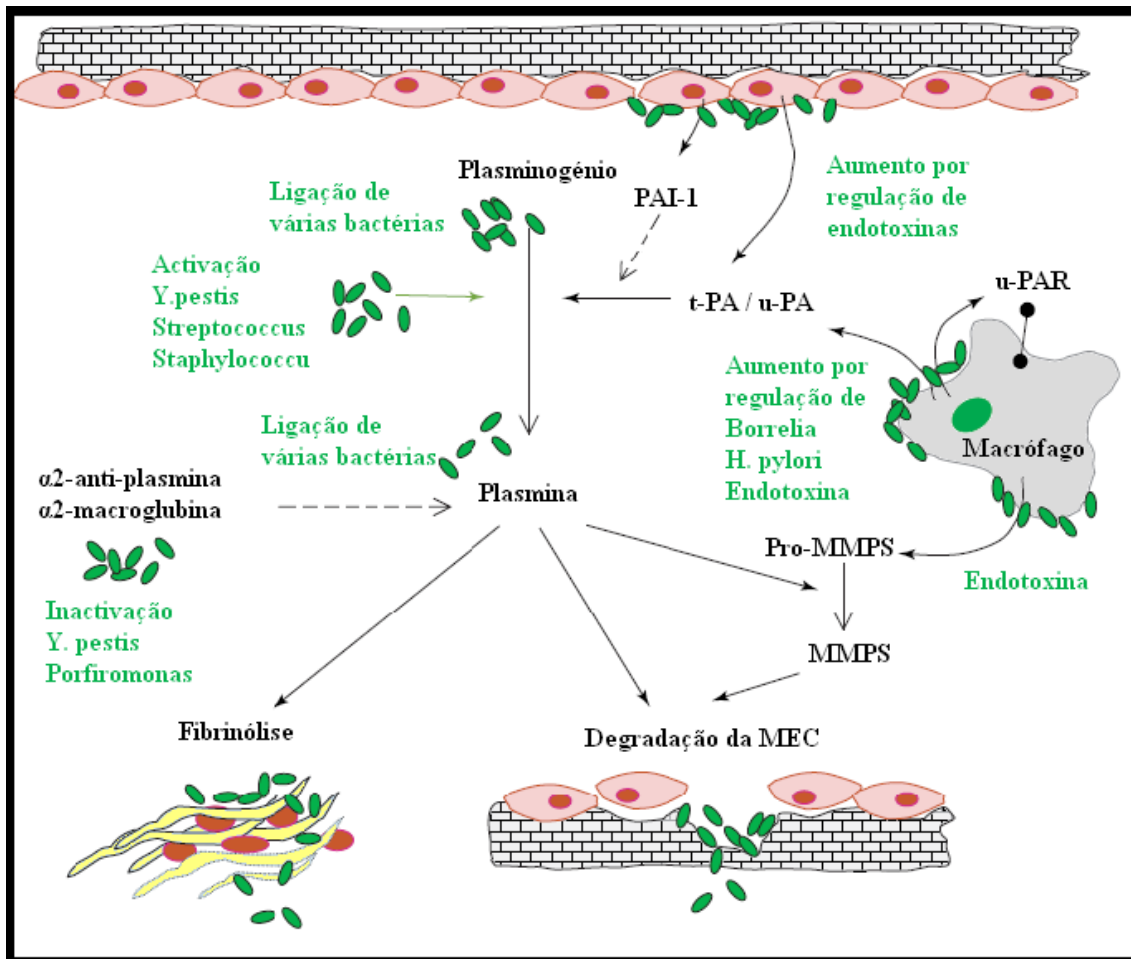


Figura 3 – Esquemática geral da interacção de bactérias patogênicas com o sistema do plasminogénio [13].

Têm sido realizados vários testes *in vitro* que demonstram as interacções entre as bactérias e o sistema fibrinolítico, desde a produção de activadores e receptores do plasminogénio (excretados ou ligados à membrana) até à sua influência na produção de activadores e inibidores do plasminogénio do hospedeiro. Por exemplo, os *Streptococcus* dos grupos A, C, G e *Streptococcus uberis* e o *Staphylococcus aureus* secretam activadores exógenos do plasminogénio: a estreptoquinase e a estafiloquinase respectivamente. Estes activadores exógenos formam um complexo de estequiometria de 1:1 com o plasminogénio e com a plasmina, resultando em alterações na

conformação destas moléculas [13,24]. Por outro lado, várias bactérias, como os *Streptococcus* dos grupos A, C e G expressam receptores do plasminogénio, que imobilizam o plasminogénio à superfície bacteriana, aumentando a sua activação, bem como, protegendo a plasmina formada da acção dos seus inibidores fisiológicos. Estes receptores têm o potencial de transformar estas bactérias em organismos proteolíticos [25].

As bactérias gram-positivas, mais estudadas relativamente à sua interacção com o sistema do plasminogénio são os *Streptococcus* dos grupos A e C isolados de humanos. Os receptores de plasminogénio mais comumente descritos são: a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), a α -enolase e a proteína PAM (Proteína M estreptocócica do grupo A) [26]. Os dois primeiros, GAPDH e α -enolase, pertencem ao grupo das enzimas *housekeeping* [26, 56]. Pensa-se que estas enzimas glicolíticas são secretadas e posteriormente reassociadas na superfície da bactéria. Ambas as proteínas foram recentemente descritas como receptores do plasminogénio à superfície de várias espécies de *Streptococcus*. [55,56].

Bergmann e colaboradores identificaram a presença de um receptor de plasminogénio à superfície das células de *Streptococcus pneumoniae*, tendo verificado que é 100% homólogo à sequência N-terminal com a GAPDH [27]. Adicionalmente, Gozalbo e colaboradores mostraram que a GAPDH também é expressa à superfície do fungo *Candida albicans* e que esta se ligava a proteínas da MEC, fibronectina e laminina, estando esta aderência correlacionada com a patogenicidade do fungo [28]. A GAPDH está também presente à superfície de outros microorganismos como por exemplo o *Streptococcus agalactiae* [27], o *Bacillus anthracis* [47], e, o *Streptococcus pyogenes* [53].

Na área de parasitologia, Mitra e colaboradores mostraram que *Acanthamoeba castellanii* secreta uma serino protease, que funciona como um activador do plasminogénio [29]. Torre-Escudero e colaboradores identificaram no sistema tegumentar do verme *Schistosoma bovis* adulto a presença da enzima enolase. Esta proteína evidenciou ser capaz de aumentar a conversão de plasminogénio à superfície deste verme [30].

Outro exemplo que envolve o sistema do plasminogénio na disseminação dos parasitas é o caso do parasita da malária, *Plasmodium falciparum*. Roggwiller e colaboradores mostraram a presença de um receptor à superfície dos eritrócitos infectados por este parasita, que confere afinidade para a ligação da serino protease u-PA. O plasminogénio situado à superfície é convertido em plasmina pela acção do u-PA, provocando a ruptura das hemáceas infectadas permitindo, desta forma, que o parasita se propague [31].

Na área de virologia, Goto e colaboradores mostraram que uma das glicoproteínas presentes no envelope do vírus *Influenza A* (H1N1), está relacionada com a capacidade de este se reproduzir utilizando o sistema do plasminogénio [32].

Como foi inicialmente referido, tem sido verificado que um número crescente de microorganismos interage com o sistema do plasminogénio do hospedeiro com o objectivo de adquirirem uma actividade proteolítica superficial “plasmin-like”, aumentando o seu poder de invasão (16). Passarei a descrever, mais especificamente o estado da arte relativo aos seguintes microorganismos: bactérias, parasitas, fungos e vírus.

II. OS MICROORGANISMOS E O SISTEMA DO PLASMINOGÉNIO

1. Bactérias

No final do século XVII, Leeuwenhoek, negociante holandês, que tinha como passatempo a construção de microscópios descobriu as bactérias, quando observava resíduos dos seus dentes ao microscópio. Desde então, tem sido estudado ao pormenor cada particularidade/patogenicidade destes microorganismos [33].

As bactérias são organismos unicelulares procariontes, que se podem apresentar de diferentes formas (coco, bacilo, vibrião, espirilo e espiroqueta) isoladamente ou em colónias, sendo classificadas como anaeróbicas, aeróbicas ou anaeróbicas facultativas. Estes organismos de pequenas dimensões manifestam-se de forma variada, reproduzindo-se em grande número, devido quer à sua enorme capacidade de adaptação, quer à sua capacidade de resistência perante os mais diversos obstáculos [33, 34].

Seguidamente, passarei a explicar as interacções destes microorganismos com o sistema fibrinolítico, começando por alguns exemplos de bactérias Gram-negativas passando às bactérias Gram-positivas.

1.1. Bactérias Gram-negativas

i. *Helicobacter pylori*

Warren descobriu o *Helicobacter pylori* ao nível da mucosa gástrica e em 1982, deu início à sua investigação a par de Marshal. Esta bactéria é um bacilo com forma espiral, com 2,5 a 3,5 μm de comprimento e 0,5 a 1 μm de diâmetro, possui uma superfície lisa e pólos arredondados, onde emergem entre 1 a 6 flagelos, mostrando-se positiva para a presença de catalase, oxidase e urease [35].

Esta bactéria coloniza a mucosa gástrica humana e a sua infecção está associada a várias formas de doenças gástricas, desde gastrites crónicas, úlceras pépticas,

adenocarcinoma gástrico e linfoma do estômago associado à mucosa do tecido linfóide [36].

Segundo Javier Torres e seus colaboradores, a prevalência de *Helicobacter pylori* varia entre 10% a 80%, sendo a sua incidência baixa nos EUA, Canadá, norte e oeste da Europa. Já, na Índia, África, América Latina e a este da Europa verifica-se a sua maior prevalência. Esta prevalência deve-se a diversos factores de risco, tais como: factores sócio-económicos, aglomeração domiciliar, a etnia, a migração para regiões com alta prevalência, e o estado de infecção de membros familiares. A sua transmissão dá-se por via oral ou fecal-oral [37].

A secreção de grandes quantidades da enzima urease permite a esta bactéria sobreviver em meios ácidos, como é o caso do estômago; a amónia libertada da conversão de ureia vai tamponar o pH gástrico [35]. À semelhança de outras bactérias, o *H. pylori* expressa à sua superfície receptores 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 [38].

As úlceras crónicas estão associadas à danificação e penetração tecidual [38]. Vários estudos mostraram que o *H. pylori* tem capacidade de ligação ao plasminogénio e que a sua posterior activação pelo sistema de activação do hospedeiro confere actividade proteolítica superficial “plasmin-like”. Estas experiências mostram que a ligação ao plasminogénio poderá estar associada a uma maior invasividade da bactéria, na penetração do tecido gástrico [38, 39].

Posteriormente, Jonsson e colaboradores estudaram as proteínas expressas à superfície por uma variedade de estirpes de *H. pylori* e procederam à identificação e caracterização de dois genes (PgbA e PgbB). Verificaram que estas proteínas se ligam ao plasminogénio, imobilizando-o, de forma a revestir o exterior da bactéria com plasminogénio; este será activado pelos activadores endógenos (t-PA e u-PA) [39].

Como referido anteriormente, *H. pylori* interage com os componentes da MEC (Figura 4), direccionando-se para a adesão à mucosa gástrica, que é rica em componentes do sistema do plasminogénio. Deste modo, a bactéria ao interactuar com o plasminogénio, adquire uma actividade proteolítica “plasmin-like” que lhe permite uma maior facilidade de penetração tecidual, inflamação, bem como uma deficiência na cicatrização de feridas. Estes efeitos têm como consequências, a formação de úlceras e o favorecimento de um processo de carcinogénese [13,39].

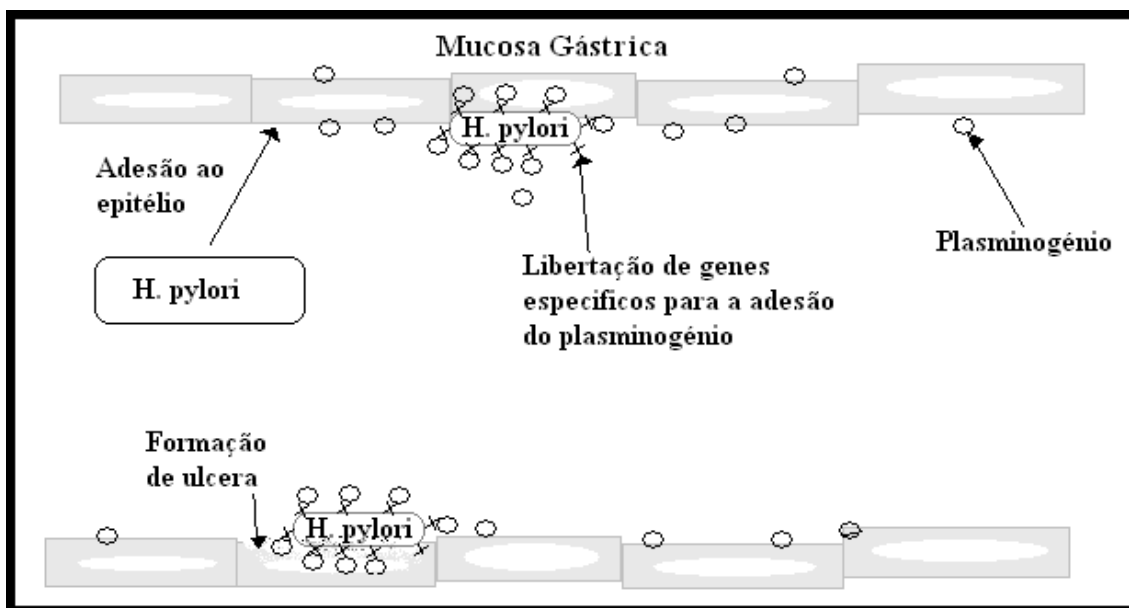


Figura 4 – Esquemática da actividade proteolítica da bactéria *Helicobacter pylori*.

ii. *Yersinia pestis*

A bactéria *Yersinia pestis* é um bacilo pertencente à família enterobacteriaceae. Esta bactéria é o agente causador da peste bubónica e pneumónica, considerada como uma das mais patogénicas no mundo. Conhecida na Idade Média por peste negra, tendo sido responsável por várias pandemias [40, 35]. A sua evolução, segundo Lahteenmaki e colaboradores, é altamente uniforme e tem evoluído a partir do patogénio *Yersinia pseudotuberculosis* [41].

Segundo Zhou e colaboradores, a Ásia, África e a América são consideradas zonas endémicas desta doença, visto que a epidemia desta peste entre os animais é

frequente e representa, constantemente, uma ameaça à saúde pública [42]. O vector desta doença é a pulga do rato (*Xenopsylla cheopsis*) e seus reservatórios são os roedores (ratos, esquilos, cães da pradaria) [35].

A transmissão é feita ao homem pela pulga e pelo contacto do homem com animais, podendo a doença manifestar-se em três formas distintas: septicemia, bubónica (tumefacção dos gânglios linfáticos) e pulmonar. No que diz respeito, à peste pneumónica, esta é altamente contagiosa, e, transmite-se facilmente pela inalação de partículas respiratórias contaminadas [35, 42].

Y. pestis dissemina, a partir de um local periférico da picada, através do sistema linfático para uma zona de drenagem dos nódulos linfáticos. As bactérias propagam-se em circulação colonizando o fígado, baço e os pulmões, podendo levar à morte por septicémia, por linfadenopatia aguda (bubónica – edema dos nódulos linfáticos) e por peste pneumónica [13].

O papel da activação do plasminogénio nesta doença tem sido bem estudado e documentado. Kukkonen e colaboradores defendem que a disseminação deste patogénico está associada ao plasmídeo pPCP1 [43]. Este plasmídeo codifica três proteínas: uma delas é uma protease de membrana externa designada Pla, que se pensa ser responsável pela propagação da bactéria [43, 42]. Para além de ser uma adesina com afinidade para a MEC e laminina da MB, verificou-se que Pla é capaz de activar o plasminogénio, clivando-o no mesmo local peptídico que o t-PA e u-PA [41]. Adicionalmente, para além de converter o plasminogénio em plasmina, a Pla também inibe a acção do inactivador de plasmina $\alpha 2$ -AP (Figura 5) [43].

Esta actividade proteolítica “plasmin-like” não regulável pelos inibidores do hospedeiro causa a degradação de vários componentes da MB e da MEC, permitindo a *Y. pestis* disseminar do local de infecção primária [13].

Em resumo, estes estudos mostram que esta bactéria interactua com o sistema do plasminogénio; ela não só se liga ao plasminogénio, como, também produz um

activador do plasminogénio (Pla, activador exógeno) e inibe a acção do inactivador α_2 -AP [43].

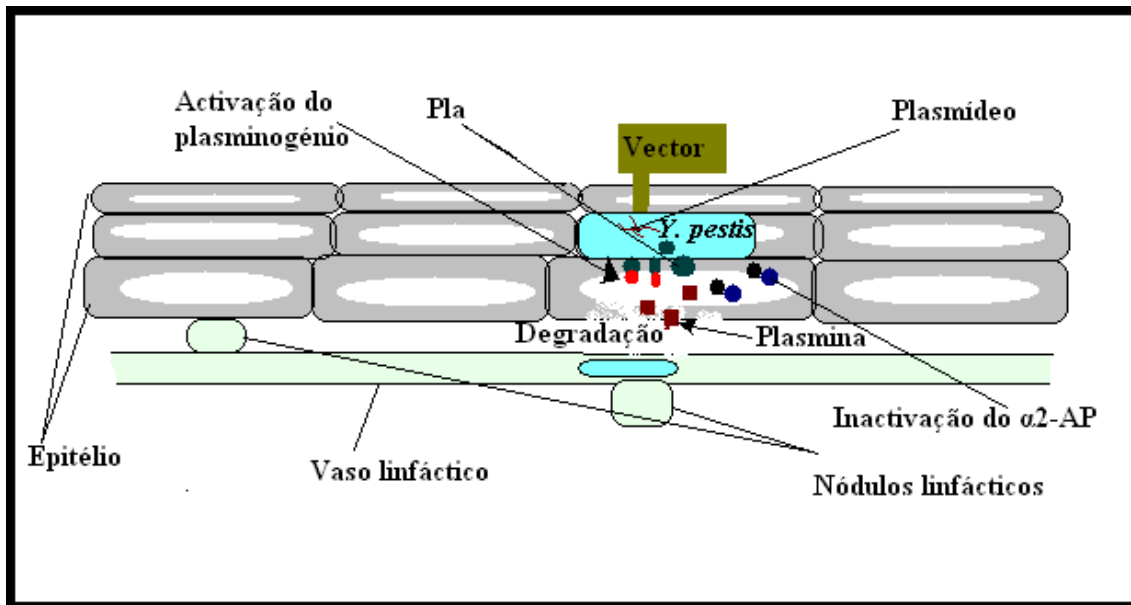


Figura 5 – Esquemática da actividade proteolítica da bactéria *Yersinia pestis*.

1.2. Bactérias Gram-positivas

i. *Bacillus anthracis*

A bactéria, *Bacillus anthracis* apresenta-se sob a forma de um bacilo (isolado, aos pares ou em curtas cadeias) e revela-se produtora de esporos na presença de oxigénio [35].

Em 1876, Robert Koch concluiu que este microorganismo era causador de uma determinada doença nos animais. Já em 1881, Pasteur criou e testou uma vacina contra o carbúnculo, tendo constituído um dos primeiros sucessos da vacinação [44]. O *B. anthracis* pode ser encontrado em solos alcalinos, onde se manifesta facilmente na forma esporolada [35].

Adicionalmente, durante a Guerra Fria, o *B. anthracis* foi considerado um potencial agente de bioterrorismo também utilizado nos ataques aos EUA em 2001. A sua incidência é maior nos países como o Irão, Turquia, Sudão, e, nos países do continente africano [44, 45].

Esta bactéria propaga-se facilmente, podendo infectar a maioria dos animais mamíferos (sendo os herbívoros os animais mais afectados) e ser transmitida aos seres humanos (zoonose) por contacto directo com os animais infectados ou através de produtos de origem animal [44]. Causa lesões cutâneas no local de infecção (podendo, evoluir, posteriormente para septicémia), infecção pulmonar (por inalação dos esporos) ou infecções no tracto gastrointestinal (pela ingestão de produtos contaminados). As infecções a nível pulmonar e gastrointestinal são as formas de doença mais graves, estando relacionadas com uma alta taxa de mortalidade [44, 35].

A sua virulência deve-se essencialmente aos genes produzidos pelos seus plasmídeos, pXO1 e pXO2 (produção de toxinas, proteínas essenciais para a formação de cápsula, antígenos, proteínas glicolíticas - GAPDH e α -enolase) [44]. Argawal e colaboradores verificaram que esta bactéria também interacciona com o sistema do plasminogénio. Verificaram que uma das proteínas que medeia a ligação ao plasminogénio é a enzima glicolítica α -enolase à superfície da bactéria. Verificaram também que para além de ligar ao plasminogénio, a enolase tem capacidade para ligar a componentes da MB como a laminina (Figura 6) [46].

Recentemente, Mata e colaboradores verificaram a presença de mais uma enzima glicolítica à superfície do *B. anthracis*, a GAPDH. Mostraram que a GAPDH também tem capacidade de ligar ao plasminogénio e aumentar assim a actividade proteolítica da bactéria [47].

Todos estes resultados mostram que a presença destes receptores (enzimas “housekeeping”) à superfície da bactéria *Bacillus anthracis*, confere um aumento do potencial proteolítico (aumentando a concentração de plasmina superficial), levando à

promoção invasão tecidual (através da degradação da MEC) e posteriormente, à sua disseminação pela circulação sanguínea (Figura 6) [46, 47].

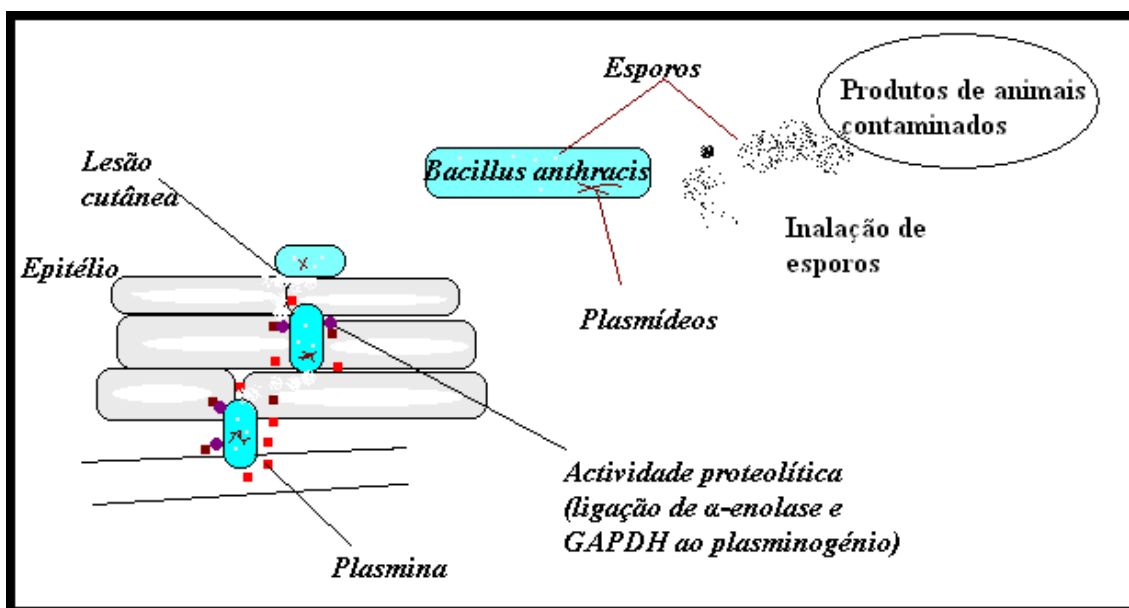


Figura 6 – Esquematização da actividade proteolítica da bactéria *Bacillus anthracis*.

ii. *Streptococcus* do grupo A (*Streptococcus pyogenes*)

Os *Streptococcus* são bactérias gram-positivas, anaeróbicas facultativas, comensais dos seres humanos e animais, mostrando-se capazes de causar infecções letais. São classificados mediante o antigénio (hidrato de carbono) que possuem, de acordo, com a classificação serológica de Lancefield, mediante as diferentes propriedades hemolíticas [37]. Deste modo, os que possuem o antigénio A são designados *Streptococcus* do grupo A (GAS), sendo o *Streptococcus pyogenes* a bactéria com mais relevância neste grupo [48].

Os *Streptococcus* podem causar infecções localizadas (impetigo, faringite), disseminadas/invasivas (escarlatina, erisipela, septicemia, febre puerperal) e doenças pós-estreptocócicas de mecanismos imunológicos (febre reumática, coreia e glomerulonefrite). O *S. pyogenes*, destaca-se pelo facto de ser responsável por causar formas malignas de infecções, como fascíte necrosante, miose e septicémia [35, 49].

Os GAS são bactérias capazes de produzir uma cápsula de ácido hialurónico, conferindo resistência à fagocitose pelos leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e de provocar a lise completa das hemácias, sendo classificados como beta-hemolíticos [35].

Segundo Low e colaboradores, as infecções por GAS, ressurgiram nas últimas duas décadas nos países desenvolvidos, manifestando-se por diversas formas. Este facto incentivou os trabalhos experimentais de forma a estudar os seus mecanismos de invasão. Verificou-se que os GAS têm a capacidade em utilizar múltiplas vias para a aquisição e activação do plasminogénio humano [50]. Verificou-se também que a virulência da bactéria está associada, maioritariamente, à produção de diversas proteínas [51, 52]. Passarei a explicar a acção das proteínas que interferem com o sistema do plasminogénio, de forma a aumentar a sua invasão.

Segundo Walker e colaboradores, vários resultados experimentais mostram que os GAS têm múltiplas estratégias para ligar e activar o plasminogénio, tendo sido identificados e caracterizados vários receptores do plasminogénio/plasmina expressos à superfície da bactéria e a proteína activadora exógena estreptoquinase (SK) [53].

Foram descritas duas vias para a ligação dos GAS ao plasminogénio: a directa e a indirecta. A ligação directa da bactéria aos componentes do sistema do plasminogénio é mediada por três proteínas: a PAM, α -enolase (designada como SEN nos GAS) e a GAPDH (conhecida também por PLR ou por desidrogenase estreptocócica). A ligação indirecta é mediada pela formação de um complexo trimolecular composto por: plasminogénio, estreptoquinase e fibrinogénio (molécula envolvida na coagulação) [53, 54].

Experiências efectuadas por Svensson e colaboradores permitiram concluir que a proteína PAM contribui para a ligação directa do plasminogénio, levando a um aumento da concentração de plasmina à superfície da bactéria, após activação do plasminogénio [55]. A GAPDH foi inicialmente identificada como um receptor para a plasmina e a enolase (SEN), foi identificada como um receptor para o plasminogénio [53, 56].

Lottenberg e colaboradores, mostraram que a plasmina à superfície dos GAS não sofre qualquer tipo de inibição perante a presença da α_2 -AP [60]. Assim, uma vez à superfície da bactéria, a plasmina não é inibida pelos inibidores fisiológicos, ou seja, a bactéria adquire uma actividade proteolítica “plasmin-like” não regulável [60].

Em resumo, a actividade do *S. pyogenes*, foi verificada por vários investigadores, caracterizando a sua actividade da seguinte forma (Figura 7): a SEN e a PAM (se PAM-positivas) fixam o plasminogénio à superfície bacteriana; este é activado pelos activadores endógenos, u-PA e t-PA. A GAPDH fixa a plasmina à superfície da bactéria. Todos estes processos conduzem à aquisição de uma actividade proteolítica “plasmin-like” [53, 55].

Quando se trata de PAM-negativas, para além dos processos referidos anteriormente, a SK secretada activa o plasminogénio directamente (formando plasmina) ou indirectamente, fazendo parte de um complexo trimolecular gerador de plasmina à superfície da bactéria [55].

Na presença de PAM-positivas, a formação de plasmina, à superfície da bactéria, para além de ocorrer pela acção directa do u-PA e t-PA sobre o plasminogénio, também ocorre pela acção da SK. Neste ultimo processo, primeiramente, ocorre a ligação da molécula PAM ao plasminogénio, e, posteriormente, é que este é clivado pela SK em plasmina [57, 58].

Todos estes processos têm como principal objectivo aumentar a concentração de plasmina à superfície bacteriana; esta aquisição de actividade proteolítica torna-se um mecanismo de promoção da invasividade [59].

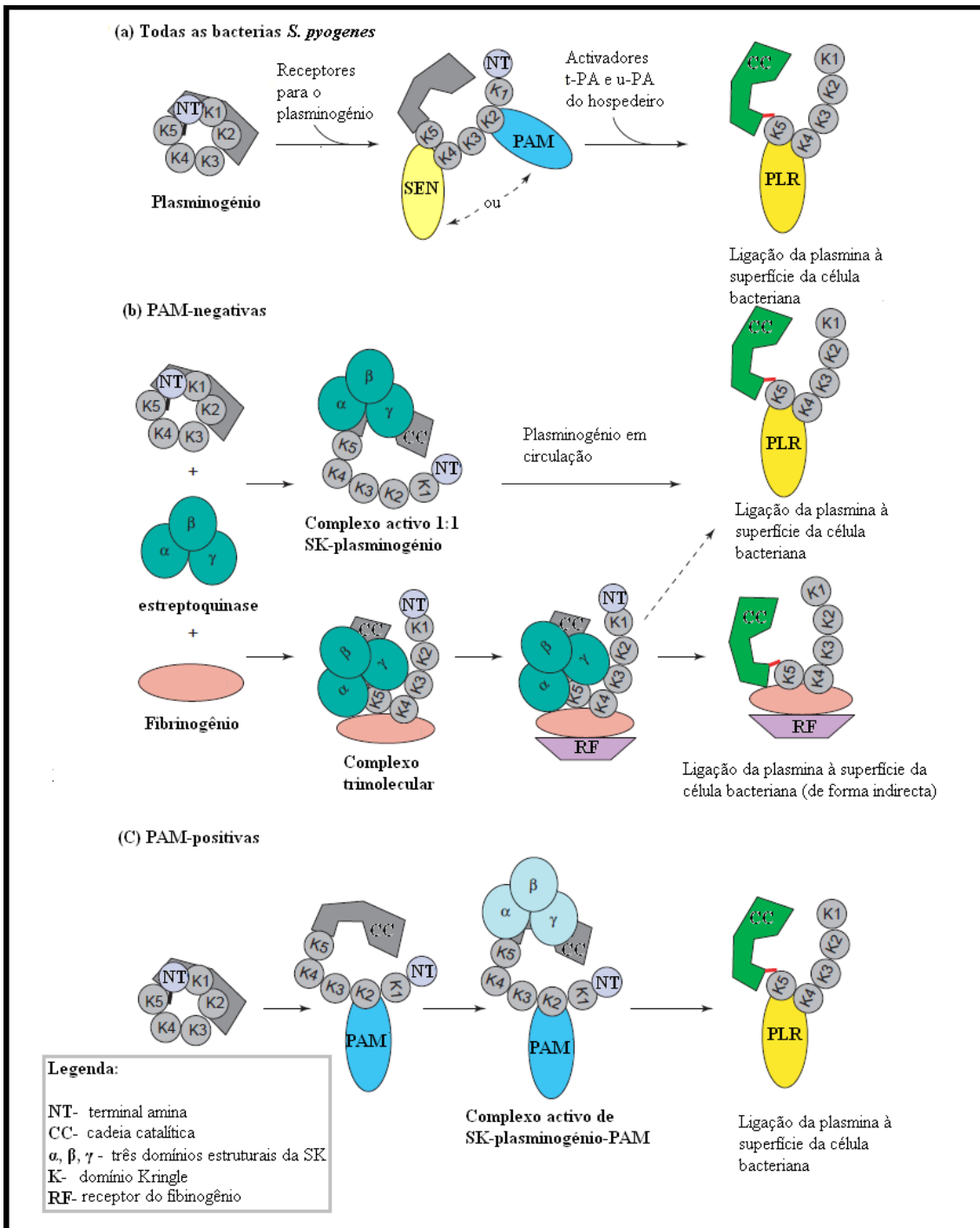


Figura 7 – Esquematisação da actividade proteolítica da bactéria *S. pyogenes* [55].

2. Parasitas

O termo parasita é atribuído aos organismos que vivem à custa de outros organismos vivos, quer temporariamente quer permanentemente [61]. De acordo, com a estrutura celular, os parasitas são classificados, como: protozoários (seres unicelulares,

eucariotas) e metazoários (seres multicelulares, eucariotas). O parasitismo estabelece as relações entre parasita-hospedeiro; um determinado parasita pode desenvolver-se em uma ou várias espécies de hospedeiros podendo não causar qualquer tipo de alteração, enquanto que noutros pode levar a diversas alterações patológicas, com diferente gravidade [61, 62].

No meio natural, os parasitas envolvem: hospedeiros (classificados como definitivos, intermediários e de transporte; de acordo com a fase do ciclo de vida do parasita), vectores (hospedeiros intermediários e transportadores, sendo classificados em vectores biológicos, mecânicos e fômites) e reservatórios (fonte de transmissão) [61].

Estes organismos, de dimensões e forma variada, manifestam uma enorme variedade de propagação, sob a forma activa (por exemplo, larvas, trofozoítos) e sob a forma passiva (quistos, ovos...). Neste sentido, vários estudos científicos foram efectuados com a finalidade de compreender as interacções, destes microorganismos, com os diversos componentes do organismo do hospedeiro [62, 63].

Uma forma destes seres aumentarem a sua disseminação é a utilização do sistema do plasminogénio do hospedeiro. Em seguida, passarei a apresentar dois exemplos: o *Acanthamoeba castellanii* e o *Schistosoma bovis*.

i. *Acanthamoeba castellanii*

Este protozoário, *Acanthamoeba castellanii*, pertencente à família *Acanthamoebidae*, é considerado uma ameba de vida livre, podendo ser encontrado por toda a parte. Normalmente, habita lagos e lagoas, piscinas, solos húmidos, cursos de água e esgotos expostos a efluentes industriais, em todos os climas e continentes [62].

O género *Acanthamoeba* é conhecido por infectar humanos, sendo o *A. castellanii* o agente causador de duas infecções distintas, a encefalite amebiana granulomatosa (doença fatal, que afecta o sistema nervoso central, normalmente em indivíduos debilitados ou imunodeprimidos) e a ulceração da córnea, chamada de

ceratite amebiana [62,64]. Segundo Brewitt, a ceratite amebiana não é muito comum e está associada com o uso de lentes de contacto, especialmente pela falta de higiene [65].

De acordo, com estudos desenvolvidos por Larkin e colaboradores, estes parasitas propagam-se sob a forma activa (trofozoítos), revelando a sua patogenicidade no homem pela sua ligação à superfície da córnea [66]. Foi também evidenciado, *in vitro*, que este género é capaz de produzir efeitos de necrose nas células da córnea e potenciar as interacções de enzimas proteolíticas [29].

Mitra e colaboradores identificaram uma serino protease, de cerca de 40 KDa, secretada por *A. castellanii* patogénicos que designaram activador do plasminogénio (AP) [29]. Verificaram que esta enzima era capaz de activar o plasminogénio de diferentes espécies incluindo os humanos, suínos e bovinos [29, 67].

Este AP foi analisado e os resultados evidenciaram que em termos de actividade biológica, esta enzima está relacionada com o u-PA, mas a nível de regulação, pelos inibidores fisiológicos do plasminogénio do hospedeiro, mostram que este AP não sofre qualquer tipo de inibição [29, 67].

Após a entrada no hospedeiro, *Acanthamoeba castellanii* secreta várias proteases (colagenase, elastase e AP). Esta actividade proteolítica contribui para uma maior facilidade de invasão no hospedeiro [29]. Deste modo, à semelhança da *Yersinia pestis* e do *Streptococcus pyogenes*, este parasita secreta um activador do plasminogénio. De igual modo, a interacção deste parasita com o sistema do plasminogénio confere-lhe uma maior capacidade de invasão tecidual.

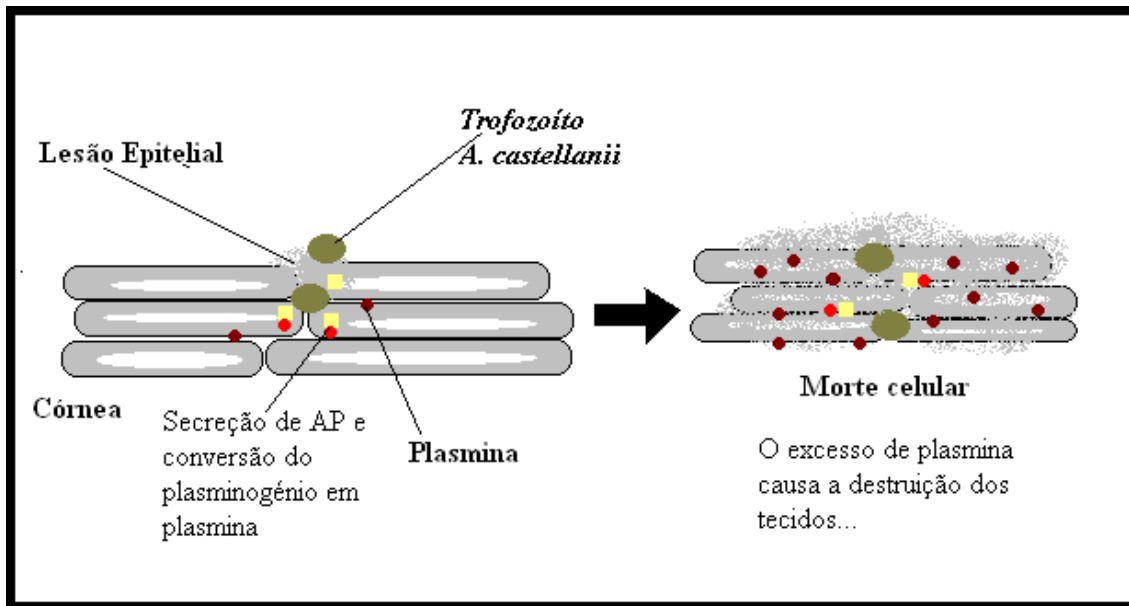


Figura 8 – Esquemática da actividade proteolítica do protozoário *A. castellanii*.

ii. *Schistosoma bovis*

Os *Schistosomas* são classificados como tremátodes, pertencentes à família *Schistosomatidae*. Estes microorganismos são agentes responsáveis da schistosomose, manifestando-se em humanos e animais em muitos países tropicais e subtropicais [61,68]. Os seres humanos são mais infectados pelo *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum* e os animais por *S. matthei* e *S. bovis* [69, 70].

Como todas as espécies de schistosomas, o *S. bovis* migra e vive nos vasos sanguíneos do seu hospedeiro definitivo sem ser detectado pelo sistema de defesa do hospedeiro [71]. O revestimento externo dos vermes adultos é composto por um tegumento, que é recoberto por uma citomembrana espessa, estando este componente envolvido em todas as interacções do parasita com o organismo do hospedeiro [61, 72].

Este parasita é capaz de viver vários anos nos vasos sanguíneos do hospedeiro pelo que têm sido realizadas várias experiências para estudar a sua interacção com o sistema do plasminogénio [69]. Hernández e colaboradores identificaram 18 proteínas localizadas à superfície do *S. bovis*, entre elas várias isoformas de enolase, GAPDH e

actina [72]. Escudero e colaboradores, verificaram que ocorre ligação com o plasminogénio ao nível da superfície tegumentar na presença de t-PA [30].

A proteína enolase secretada por *S. bovis*, foi estudada por Escudero e colaboradores que concluíram que esta funciona como um receptor para o plasminogénio, sendo este activado em plasmina por acção do tPA. Desta forma, o parasita é capaz de degradar coágulos de sangue podendo circular mais livremente pelos vasos sanguíneos, aumentando a sua disseminação/patogenicidade [30].

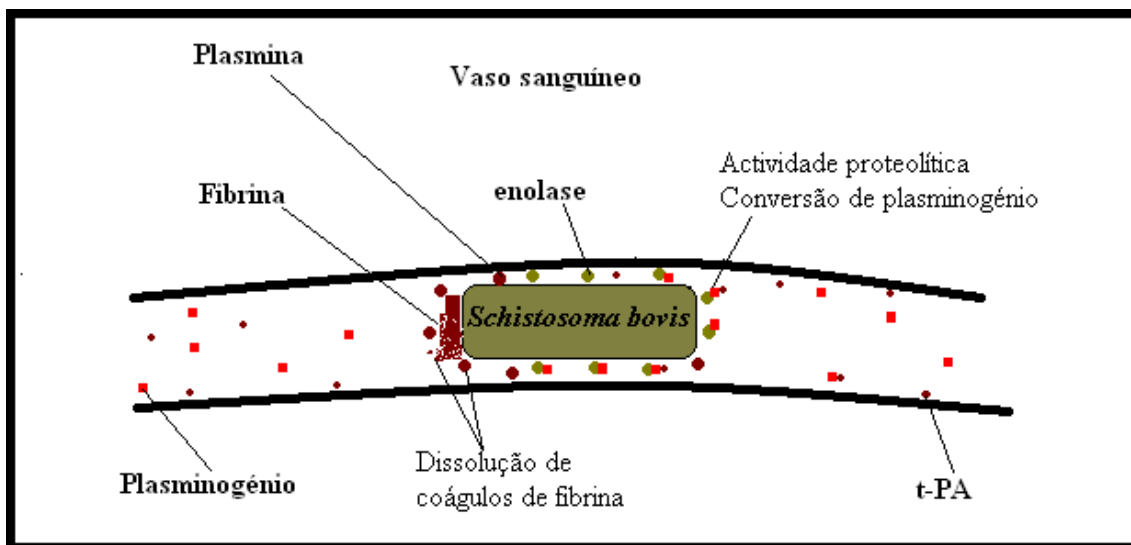


Figura 9 – Esquemática da actividade proteolítica do parasita *Schistosoma bovis*.

3. Fungos

Os fungos são seres eucariotas que se nutrem por absorção e se reproduzem por esporos. Podem ser classificados como fungos leveduriformes ou unicelulares (leveduras) e como fungos filamentosos ou pluricelulares. São desprovidos de clorofila e reproduzem-se por esporos sexuais e assexuais ou por reprodução vegetativa. Os fungos filamentosos podem apresentar hifas septadas que dividem o fungo em compartimentos, ou hifas asseptadas que desempenham funções protectoras [35].

Existem centenas de espécies de fungos, quer desempenhando efeitos benéficos, quer efeitos prejudiciais para a vida. Estes microorganismos podem contribuir, de um

modo benéfico para o ambiente (fertilização dos solos, simbiose das plantas, indicadores de poluição), para um controlo biológico (evitando praga de insectos), para a investigação científica (pelo seu crescimento rápido e facilidade de reprodução e manipulação) e para a indústria (graças às suas capacidades enzimáticas, biossintéticas e fermentativas). Contribuem de modo prejudicial provocando a contaminação e destruição de vários produtos e pela sua capacidade de causar diversas patologias nos humanos e animais [35].

Como todos os outros organismos, os fungos foram evoluindo ao longo do tempo, relevando-se cada vez mais patogénicos e frequentes colonizadores dos organismos, quer a nível animal, quer a nível humano. Estes organismos invasores colonizam diversos seres, de forma a aumentar a disseminação por esporos, e, manifestando-se por vários tipos de micoses [28, 35].

Diversos autores têm estudado, os mecanismos utilizados, por este tipo de microorganismos, no aumento da sua disseminação/patogenicidade. Deste modo, têm sido identificadas interações com o sistema do plasminogénio, sendo, o fungo com mais relevância, a *Candida albicans* [73].

i. *Candida albicans*

O fungo *Candida albicans* é o maior causador de candidoses nos seres humanos. Este patogénico é considerado um fungo dimórfico, unicelular quando patogénico e saprófita, quando faz parte da flora comensal. É um fungo comensal do tubo digestivo da maior parte dos mamíferos e das aves, podendo-se revelar um fungo oportunista em indivíduos imunocompetentes [35, 28]. No entanto, esta colonização apresenta efeitos benéficos para o hospedeiro, pois, para além de limitar a colonização de outros fungos patogénicos oportunistas, protege o hospedeiro imunocompetente de possíveis infecções sistémicas, promovendo a resposta do sistema imunitário [35, 28].

A sua maior incidência de patogenicidade ocorre a nível dos tecidos epiteliais mucosos dos tractos gastrointestinal e genito-urinário. A sua patogenicidade pode-se

revelar desde lesões superficiais a doenças sistémicas, podendo causar meningite pela sua invasão no sistema nervoso [28].

Vários estudos mostraram que o poder patogénico de *C. albicans* depende da sua relação com o hospedeiro, não só dos factores intrínsecos e extrínsecos do hospedeiro, mas também dos factores de virulência do fungo, por exemplo: a formação de tubos germinativos, a capacidade de adesão às células do hospedeiro e a produção de enzimas extracelulares [73].

Segundo Klotz a adesão a componentes da MEC (fibronectina, laminina, actina e colagénio) representa um passo crucial no desenvolvimento/disseminação da candidíase. Deste modo, têm sido efectuados vários estudos na identificação de proteínas produzidas por *C. albicans* que medeiam a ligação a proteínas da MEC e especificamente ao plasminogénio, de modo a investigar a sua actividade proteolítica [74].

Como referido, Gozalbo e colaboradores, identificaram a presença de GAPDH à superfície de *C. albicans* e verificaram que funciona como um receptor para a adesão do fungo à fibronectina e à laminina, contribuindo para um aumento da sua invasividade [28].

Jong e colaboradores identificaram a presença da proteína enolase à superfície de *C. albicans*. Verificaram que esta proteína funciona como um receptor para o plasminogénio, contribuindo para um aumento da sua concentração à superfície do fungo. Verificaram também que o plasminogénio, uma vez à superfície do fungo, é activado pelos activadores fisiológicos do hospedeiro, conferindo, desta forma, um aumento da actividade proteolítica “plasmin-like”, levando a uma maior rapidez de disseminação e colonização de órgãos alvo [75].

Posteriormente, Luo e colaboradores, identificaram uma proteína superficial, designada Pra1 com capacidade de ligação ao plasminogénio. Mais uma vez, esta

interacção conduz à aquisição de uma actividade proteolítica “plasmin-like” importante na degradação da MEC e aumento do poder de disseminação do fungo [76].

A presença de receptores de plasminogénio à superfície de *Candida albicans* (Figura 10), contribuem para um aumento da sua invasividade/patogenicidade pela destruição dos componentes da MEC. A GAPDH tem como função “conduzir” o fungo para os componentes da MEC. Já a enolase, juntamente com a Pra1, “conduzem” o plasminogénio para a superfície do fungo. Após a sua activação, o aumento da concentração da plasmina superficial gera uma actividade superficial proteolítica “plasmin-like” [28, 75, 76].

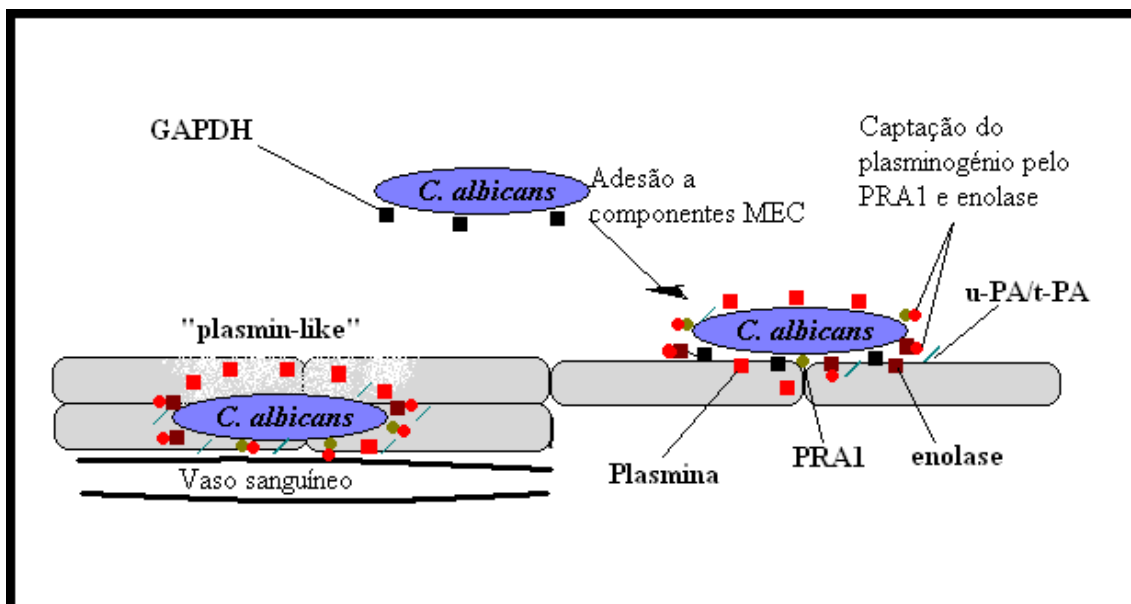


Figura 10 – Esquemática da actividade proteolítica do fungo *Candida albicans*.

4. Vírus

Os vírus são considerados parasitas intracelulares obrigatórios visto serem desprovidos de metabolismo e necessitarem obrigatoriamente das células hospedeiras para se reproduzirem. São seres com dimensões menores que as bactérias, sendo só visíveis ao microscópio electrónico, possuem uma enorme capacidade reprodutiva, e, fora do ambiente intracelular revelam-se inertes [61].

A sua estrutura mais básica é compreendida pela informação genética e por uma cobertura de natureza proteica. De acordo com a sua estrutura são classificados como vírus nus (desprovidos de invólucro) ou como vírus com invólucro. Os vírus sem invólucro são habitualmente mais resistentes aos agentes físicos e químicos; já os que possuem invólucro (camada lipídica exterior) mostram-se mais frágeis, sendo incapazes de sobreviver no meio ambiente por longos períodos [61, 77].

Os vírus quando transmitidos de hospedeiro em hospedeiro, difundem-se do local de entrada para o interior das células, de modo a aumentarem a sua reprodução. Estes seres infectam as células do hospedeiro pelo contacto entre regiões virais da cápside ou do invólucro com receptores celulares específicos. Assim, mediante a especificidade, a interacção vírus-célula, de um modo geral, pode ocorrer por três mecanismos [61, 77]. Os vírus podem penetrar nas células e replicarem-se, provocando a lise mediante a libertação dos viriões; podem também infectar as células, persistindo no seu interior e levando a alterações ou a transformações celulares. Podem ainda penetrar nas células e bloquearem o seu mecanismo de replicação. Paralelamente podem ocorrer alterações genéticas, de forma a tornarem estes seres mais resistentes [61].

Têm sido elaboradas diversas análises aos mecanismos de interacção entre os vírus e o organismo humano, tendo-se verificado que estes microorganismos utilizam o sistema do plasminogénio para aumentarem a sua disseminação, como é o caso do vírus da gripe, o *Influenza vírus* [32].

i. *Influenza vírus*

O vírus *Influenza* pertence à família *Orthomyxoviridae*, é o causador da doença infecciosa aguda do tracto respiratório de fácil transmissão por contacto directo com a pessoa infectada, o que pode originar, rapidamente, grandes epidemias e pandemias [61].

Este vírus tem um período de incubação muito curto, cerca de 1 a 4 dias, após o aparecimento dos sinais clínicos, conhecidos por todos como febre, mal-estar, cefaleias, dores musculares e a presença de sintomas a nível respiratório (tosse, obstrução nasal, etc.) [61]. Têm sido feitas diversas análises serológicas ao vírus *Influenza*, tendo sido atribuída maior importância aos tipos A e B. Destes dois tipos, o do tipo A têm sido melhor caracterizado, visto ser epidemiologicamente mais importante e estar relacionado não só com as manifestações em humanos mas também em animais [61].

O vírus apresenta uma forma esférica, sendo constituído por uma parte central mais interna, uma nucleocápside (com simetria helicoidal com RNA monocatenário fragmentado em 8 segmentos) e por uma parte externa, designada invólucro. Cada segmento codifica uma proteína; o fragmento 1, 2 e 3 codificam polimerases para a síntese do RNA viral e complementar (designadas por PA, PB1 e PB2), o fragmento 4 codifica a hemaglutinina (HA), o fragmento 5 codifica a nucleoproteína viral, o fragmento 6 a neuraminidase (NA), o fragmento 7 codifica a proteína M, e o 8 codifica proteínas não estruturais. As suas características antigénicas devem-se ao antígeno S (da nucleocápside), à proteína M, HA e NA; estes três últimos são designados de antígenos de invólucro [61, 78].

O poder de infecção do vírus *Influenza* está dependente da clivagem da HA, em duas fracções, HA1 e HA2, visto a HA2 ter sido revelada necessária para que o invólucro viral se funda com a membrana celular. Esta clivagem ocorre a nível extracelular pela acção de proteases celulares abundantes no tracto respiratório [61, 78]. Goto e colaboradores estudaram estes mecanismos e verificaram que a NA secretada pelo vírus para além de facilitar a libertação dos vírus recém-formados da superfície das células infectadas, também tem a capacidade de ligar o plasminogénio. Após a activação a plasmina, pelos t-PA ou u-PA, o complexo NA-plasmina à superfície do vírus, promove a clivagem da HA, que como referido, é um pré-requisito para a infecciosidade dos vírus *Influenza*, promovendo a entrada do vírus na célula do hospedeiro [79,80].

O uso do sistema do plasminogénio pelas partículas virais do vírus *influenza*, contribui para um maior poder e rapidez de invasão, podendo este se disseminar por várias células, infectando-as, ao longo do organismo do hospedeiro [80].

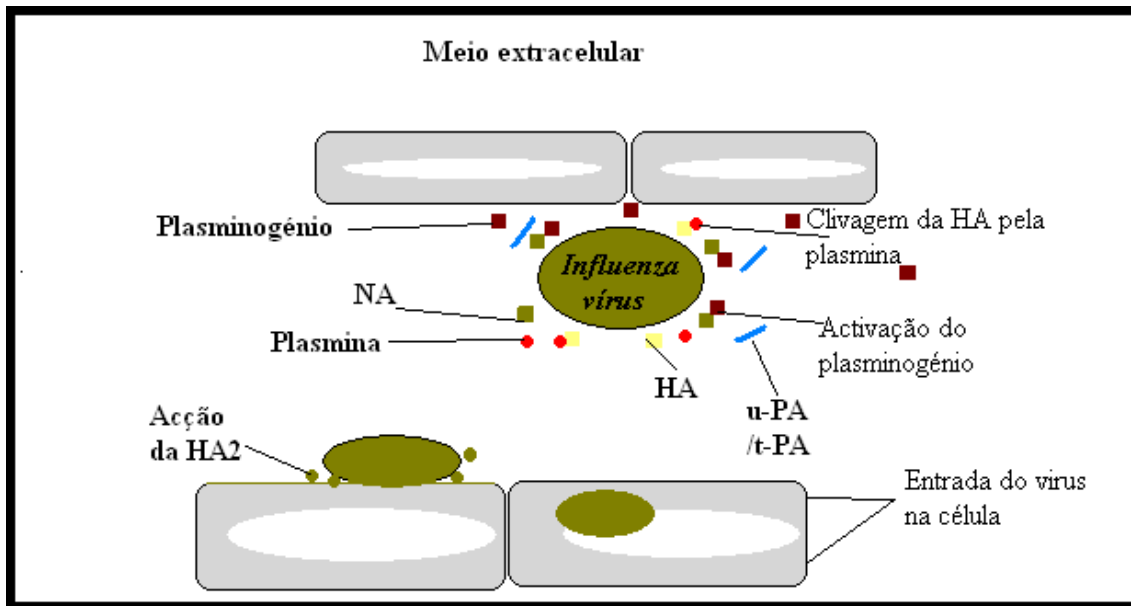


Figura 11 – Esquematização da actividade proteolítica do vírus *Influenza*.

Como se verifica, a interacção com o sistema do plasminogénio é um mecanismo de invasão usado por uma ampla gama de microorganismos (bactérias, fungos, protozoários, vírus). Esta estratégia de invasão confere ao microorganismo uma capacidade/vantagem proteolítica adicional que lhe permite aumentar o seu poder de disseminação no hospedeiro e assim aumentar a sua sobrevivência.

III. CONCLUSÃO

A fibrinólise pode ser definida como a degradação da fibrina, mediada pela plasmina. O sistema fibrinolítico ou sistema do plasminogénio é composto por diversas proteínas (proteases séricas e inibidores) que regulam a geração de plasmina, uma enzima activa, produzida a partir de uma pró-enzima inactiva (plasminogénio). A plasmina tem a função de degradar a fibrina e activar metaloproteases de matriz extracelular. Para além do seu papel no sistema hemostático, têm sido descobertas várias funções do sistema do plasminogénio em outros processos, incluindo remodelação da matriz extracelular, crescimento e disseminação tumoral, cicatrização e infecção.

De facto, tem sido verificado que diversos microorganismos têm a capacidade de alterar a regulação deste sistema, levando a um aumento da concentração de plasmina, através da produção de activadores de plasminogénio, como é exemplo da bactéria *Yersinia pestis*, dos GAS, e do parasita *Acanthamoeba castellanii*. Outros microorganismos expressam receptores à sua superfície para o plasminogénio e plasmina, como é o caso do *Helicobacter pylori*, *Bacillus anthracis*, GAS, *Schistosoma bovis*, *Candida albicans* e do *Influenza vírus*. Os receptores e activadores expressos por estes microorganismos permitem-lhes adquirir uma actividade proteolítica “plasmin-like” superficial, aumentando o seu poder de disseminação pelo organismo do hospedeiro e assim a sua invasividade. Na bactéria *Yersinia pestis* e *Streptococcus pyogenes* verificou-se, também, que a plasmina à superfície destas bactérias não sofre qualquer regulação pelos inibidores fisiológicos do hospedeiro, o que lhes confere uma actividade proteolítica “plasmin-like” não regulável.

Deste modo, é reconhecida a importância da interacção de vários microorganismos com o sistema do plasminogénio como um mecanismo potenciador da sua disseminação/ invasão no organismo do hospedeiro.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Levi, M.; VanderPoll, T.; Buller, H. R. (2004). Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation*, 109, pp. 2698–2704.
- [2] COLLEN, D. (1999). The plasminogen (fibrinolytic) system. *Thromb Haemost*, 82, pp. 259-270.
- [3] Raum, D. *et alii*. (1980). Synthesis of human plasminogen by the liver. *Science*, 208, pp. 1036-7.
- [4] Henkin, J.; Marcotte, P.; Yang, H. (1991). The plasminogen-plasmin system. *Prog Card Diseas* 2, pp. 135-164.
- [5] Dobrovolsky, A. B.; Titaeva, E. V. (2002). The fibrinolysis system: regulation of activity and physiologic functions of its main components. *Biochemistry*, 67, pp. 99-108.
- [6] Fredenburgh, J. C.; Nesheim, M. E. (1992). Lys-plasminogen is a significant intermediate in the activation of Glu-plasminogen during fibrinolysis in vitro. *J Biol Chem* 36, pp. 26150-26156.
- [7] Miyashita, C.; Wenzel, E.; Heiden, M.; (1988). Plasminogen: a brief introduction into its biochemistry and function. *Haemostasis*, 18, pp. 7–13.
- [8] Bergano, D. *et alli*. (1982). International Committee for Thrombosis and Haemostasis (XXVIIIth Meeting). *Fibrinolysis subcommittee*, 32, pp. 1223-1236.
- [9] Pennica, D.; Wallen, P.; Ranby, M. (1985). Fibrinolysis mediated by tissue plasminogen activator. Disclosure of a kinetic transition. *Eur J Biochem*, 149, pp. 193-200.
- [10] Rijken, D. C.; Sakharov, D. V. (2001). Basic principles in thrombolysis: Regulatory role of plasminogen. *Thombosis research*, 103, pp. s41-s49.
- [11] Danç, K. *et alli*. (1985). Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res*, 44, pp. 139-266.
- [12] Fazioli, F.; Blasi, F. (1994). Urokinase-type plasminogen activator and its receptor: new targets for anti-metastatic therapy? *Trends Pharmacol Sci*, 15, pp. 25-9.
- [13] Lahteenmaki, k.; Edelman, S.; Korhonen, K.T. (2005). Bacterial metastis: the host plasminogen system in bacterial invasion. *Trends in Microbiology*, pp. 13.
- [14] Plow, E.E. *et alli*. (1986). The plasminogen system and cell surfaces: evidence for plasminogen and urokinase receptors on the same cell type. *J Cell Biol*, 103, pp. 2411-20.
- [15] Potempa, J.; Korzus, E.; Travis, J.; (1994) The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J Biol Chem*, 269, pp. 15957-60.

- [16] Coleman, J.L.; Benach, J.L. (1999) Use of the plasminogen activation system by microorganisms. *J Lab Clin Med*, 134, pp. 567-7
- [17] DeClerckYA; Laug, W. E. (1996). Cooperation between matrix metalloproteinases and the plasminogen activator-plasmin system in tumor progression. *Enzyme and Protein*, 49, pp. 72-84.
- [18] Axelsson, F. *et alli*. (1995). Plasminogen. *Chormogenix*, pp. 1-23.
- [19] Parks, W.C. *et alli*. (2004). Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol*, 4, pp. 617–629.
- [20] Lahteenmaki, K. *et alli*. (2001). Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol*, 25, pp. 531–552
- [21] Lijnen, H. R.; Collen, D. (1995). Mechanisms of physiological fibrinolysis. *Baillie`re`s Clin. Haematol*, 8, pp. 277–290.
- [22] Boyle, M. D. P.; Lottenberg, R. (1997). Plasminogen activation by invasive human pathogens. *Thromb. Haemost*, 77, pp. 1–10.
- [23] Van-Gorp, E.C.M. *et alli*. (1999). Review: Infectious diseases and coagulation disorders. *J. Infect. Dis.*, 180, pp. 176–186.
- [24] Radek, J. T.; Castellino, F. J. (1989) Conformational properties of streptokinase. *J Biol Chem*, pp. 264 – 9915.-22.
- [25] Wang, H.; Lottenberg, R.; Boyle, M. D. (1995). A role for fibrinogen in the streptokinase-dependent acquisition of plasmin(ogen) by group A streptococci. *J Infect Dis*, 171, pp. 85-92.
- [26] Kalia, A.; Bessen, D. E. (2004). Natural selection and evolution of streptococcal virulence genes involved in tissue-specific adaptations. *J. Bacteriol*, 186, pp. 110–121.
- [27] Bergmann, S. *et alli*. (2004). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* is a surface-displayed plasminogenbinding protein. *Infect. Immun*, 72, pp. 2416–2419.
- [28] Gozalbo, D. *et alli*. (1998). The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. *Infect. Immun*, 66, pp. 2052–2059.
- [29] Mitra, M. M. *et alli*. (1995). Characterization of a plasminogen activator produced by *Acanthamoeba castellanii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 73, pp. 157-164.

- [30] Torre-Escudero. *et alli.* (2010). Cloning and characterization of a plasminogen-binding surface-associated enolase from *Schistosoma bovis*. *Veterinary Parasitology*, 172, pp. 76-84.
- [31] Roggwiller, E. *et alli.* (1997). Host urokinase-type plasminogen activator participates in the release of malaria merozoites from infected erythrocytes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 86, pp. 49-59.
- [32] Goto, H.; Kawaoka, Y. (2000). Assays for functional binding of plasminogen to viral proteins. *Methods*, 21, pp. 159-163.
- [33] James, J. *et alli.* (1994). Van Leeuwenhoek's discoveries of 1677–1678: A look too far. *Elsevier Ltd*, pp.1-5.
- [34] Hurt, L. (2003). Dr. Robert Koch a founding father of biology. *Elsevier Science*, 10, pp. 73-74 .
- [35] Ferreira, W. C.; Sousa, J. C. (2000). Microbiologia – volume 2. Porto, Lidel.
- [36] Dubreuil, J.D. *et alli.* (2002). *Helicobacter pylori* interactions with host serum and extracellular matrix proteins: potential role in the infectious process. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, 66, pp. 617–629.
- [37] Torres, J. *et alli.* (2000). A Comprehensive Review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in Children. *Elsevier Science*, 31, pp. 431-469.
- [38] Pantzar, M.; Ljungh, A.; Wadstrom, T. (1998). Plasminogen Binding and Activation at the Surface of *Helicobacter pylori* CCUG 17874. *Infection and Immunity*, pp. 4976-4980.
- [39] Jonsson, K. *et alli.* (2003). Molecular cloning and characterization of two *Helicobacter pylori* genes coding for plasminogen-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101, pp. 1852–1857.
- [40] Sebbane, F. *et alli.* (2006). Role of the *Yersinia pestis* plasminogen activator in the incidence of distinct septicemic and bubonic forms of flea-borne plague. *Stanley Falkow*, 103, pp. 5527-5530
- [41] Lahteenmaki, K.; Kukkonen, M.; Korhonen, T. K. (2001). The Pla surface protease/adhesion of *Yersinia pestis* mediates bacterial invasion into human endothelial cells. *Felix Wieland*, 404, pp. 69-72.
- [42] Zhou, D. *et alli.* (2004). DNA Microarray Analysis of Genome Dynamics in *Yersinia pestis*: Insights into Bacterial Genome Microevolution and Niche Adaptation. *Journal of Bacteriology*, 186, pp. 5138-5146.

- [43] Kukkonen, M. *et alli.* (2001). Protein regions important for plasminogen activation and inactivation of α 2-antiplasmin in the surface protease Pla of *Yersinia pestis*. *Molecular Microbiology*, 40, pp. 1097-1111.
- [44] Kolsto, A. B.; Tourasse, N. J.; Okstad, O. A. (2009). What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus Species*?. *The Annual Review of Microbiology*, 63, pp. 451-476.
- [45] Jernigan, J. A. *et alli.* (2001). Bioterrorism-related inhalational anthrax: the first 10 cases reported in the United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 7, pp. 933-944.
- [46] Agarwal, S. *et alli.* (2008). α -Enolase binds to human plasminogen on the surface of *Bacillus anthracis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1784, pp. 986-994.
- [47] Matta, S. K.; Agarwal, S.; Bhatnagar, R. (2010). Surface localized and extracellular Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Bacillus anthracis* is a plasminogen binding protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804, pp. 2111-2120.
- [48] Breiman, R. F. *et alli.* (1993). Defining the group A streptococcal toxic shock syndrome. Rationale and consensus definition. *The Working Group on Severe Streptococcal Infections. J. Am. Med. Assoc*, 269, pp. 390-391.
- [49] Anthony, B. F.; Kaplan, E. L.; Wannamaker, L. W.; Chapman, S. S. (1976). The dynamics of streptococcal infections in a defined population of children: serotypes associated with skin and respiratory infections. *Am. J. Epidemiol*, 104, pp. 652-666.
- [50] Low, D. E. *et alli.* (1997). The reemergence of severe group A streptococcal disease: an evolutionary perspective. *American Society for Microbiology Press*, pp. 93-123.
- [51] Losada, M. F. *et alli.* (2010). Effects on human plasminogen conformation and activation rate caused by interaction with VEK-30, a peptide derived from the group A streptococcal M-like protein (PAM). *Biochimica et Biophysica acta*, 1804, pp. 1342-1349.
- [52] Mitchell, T. J. (2003). The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat. Rev. Microbiol*, 1, pp. 219-230.
- [53] Walker, M. J. *et alli.* (2005). Is plasminogen deployed as a *Streptococcus pyogenes* virulence factor? *Trends in Microbiology*, 13, pp. 308-313.
- [54] Bessen, E. D. (2009). Population biology of the human restricted pathogen, *Streptococcus pyogenes*. *Infection, Genetics and Evolution*, 9, pp. 581-593.

- [55] Svensson, M.D. *et alli.* (2002). Roles of the plasminogen activator streptokinase and the plasminogen-associated M protein in an experimental model for *streptococcal impetigo*. *Microbiology*, 148, pp. 3933–3945.
- [56] Pancholi, V.; Chhatwal, G. S. (2003). Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. *Int. J. Med. Microbiol*, 293, pp. 391–401.
- [57] Svensson, M. D.; Sjobring, U.; Bessen, D. E. (1999). Selective Distribution of a High-Affinity Plasminogen-Binding Site among Group A Streptococci Associated with Impetigo, *American Society for Microbiology*, 67, pp. 3915-3920.
- [58] McKay, F.C. *et alli.* (2004). Plasminogen binding by group A *streptococcal* isolates from a region of hyperendemicity for *streptococcal* skin infection and a high incidence of invasive infection. *Infect. Immun.*, 72, pp. 364–370.
- [59] Kalia, A.; Bessen, D. E. (2004). Natural Selection and Evolution of *Streptococcal* Virulence Genes Involved in Tissue-Specific Adaptations. *Journal of Bacteriology*, 186, pp. 110-121.
- [60] Lottenberg, R.; Wenz, D. M.; Boyle, M. D. P. (1994). Capturing host plasmin(ogen): a common mechanism for invasive pathogens? *Trends in Microbiology*, 2, pp. 11-16.
- [61] Ferreira, W. C.; Sousa, J. C. (2002). *Microbiologia – volume 3*. Porto, Lidel.
- [62] Rey, L. (2002). *Bases da parasitologia médica – Segunda Educação*. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A.
- [63] Schofield, C. J. (2005). 21 years of parasitology. *Trends in Parasitology*, 21, pp. 483-485.
- [64] Robles, A. G. *et alli.* (2006). *Acanthamoeb castellanii*: structural basis of the cytopathic mechanisms. *Experimental Parasitology*, 114, pp. 133-140.
- [65] Brewitt, H. (1997). Contact lenses: infections and hygiene. *Ophthalmologe*, 94, pp. 311–316.
- [66] Larkin, D. F.; Berry, M.; Easty, D. L. (1991). *In vitro* corneal pathogenicity of *Acanthamoeba*. *Eye*, 5, pp. 560–8.
- [67] Naat, B. K.; Kim, J. C.; Song, C. Y. (2001). Characterization and pathogenetic role of proteinase from *Acanthamoeba castellanii*. *Microbial Pathogenesis*, 30, pp. 39-48.
- [68] Hernández, A. R. *et alli.* (2007). *Schistosoma bovis*: Plasminogen binding in adults and the identification of plasminogen-binding proteins from the worm tegument. *Experimental Parasitology*, 115, pp. 83-91.

- [69] Sánchez, R. P. *et alli.* (2008). A proteomic approach to the identification of tegumental proteins of male and female *Schistosoma bovis* worms. *Molecular Biochemical Parasitology*, 161, pp. 112-123.
- [70] Agnew, A. M. *et alli.* (1989). *Schistosoma bovis* as an analogue of *S. haematobium*. *Parasite Immunol*, 11, pp. 329-40.
- [71] Lindberg, R. *et alli.* (1995). Tissue response of goats to single or repeated low-level doses and to a massive challenge dose of *Schistosoma bovis*. *Research in Veterinary Science*, 58, pp. 56-60.
- [72] Hernández, R. A. *et alli.* (2007). Carbohydrate profiling and protein identification of tegumental and excreted/secreted glycoproteins of adult *Schistosoma bovis* worms. *Veterinary Parasitology*, 144, pp. 45-60.
- [73] Crowe, J. D. *et alli.* (2003). *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. *Molecular Microbiology*, 47, pp. 1637-1651.
- [74] Klotz, S. A. (1994). Plasma and extracellular matrix proteins mediate in the fate of *Candida albicans* in the human host. *Med. Hypotheses*, 42, pp. 328-334.
- [75] Jong, A. Y. *et alli.* (2003). Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Journal of Medical Microbiology*, 52, pp. 615-622.
- [76] Luo, S. *et alli.* (2009). Immune evasion of the human pathogenic yeast *Candida albicans*: Pra1 is a Factor H, FHL-1 and plasminogen binding surface protein. *Molecular Immunology*, 47, pp. 541-550.
- [77] Clewley, J. P. (2004). A role for arrays in clinical virology: fact or fiction? *Journal of Virology*, 29, pp. 2-12.
- [78] Luo, M. *et alli.* (2008). Immunization with plasmid DNA encoding influenza A virus nucleoprotein fused to a tissue plasminogen activator signal sequence elicits strong immune responses and protection against H5N1 challenge in mice. *Journal of Virological Methods*, 154, pp. 121-127.
- [79] Goto, H.; Kawaoka, Y. (2000). Assays for functional binding of plasminogen to viral proteins. *Academic Press*, 21, pp. 159-163.
- [80] Goto, H.; Kawaoka, Y. (2001). Role of plasminogen-binding neuraminidase in influenza pathogenicity. *International Congress Series*, 1219, pp. 591-594.