



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Beatriz Jandre Ferreira

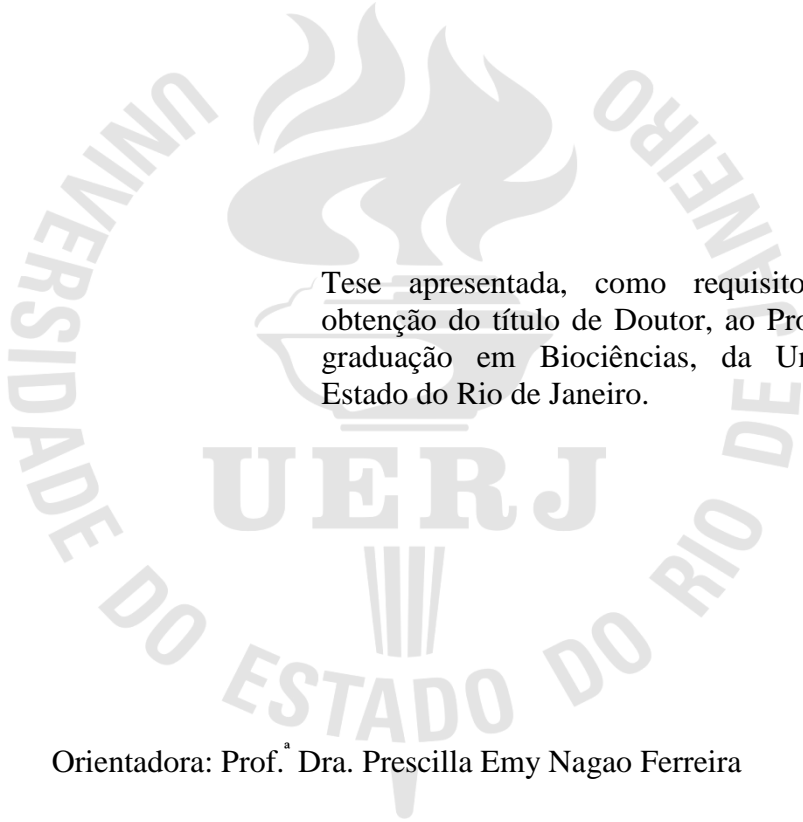
**Envolvimento de microdomínios lipídicos na infecção de células endoteliais  
humanas por *Streptococcus agalactiae***

Rio de Janeiro

2017

Beatriz Jandre Ferreira

**Envolvimento de microdomínios lipídicos na infecção de células endoteliais humanas por  
*Streptococcus agalactiae***



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Prescilla Emy Nagao Ferreira

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

F383 Ferreira, Beatriz Jandre.  
Envolvimento de microdomínios lipídicos na infecção de células endoteliais humanas por *Streptococo agalactiae* / Beatriz Jandre Ferreira. – 2017.  
108 f.

Orientadora: Prescilla Emy Nagao Ferreira.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Estreptococos – Teses. 2. Streptococcus agalactiae. 3. Esfingosina. 4. Células endoteliais - Teses. I. Ferreira, Prescilla Emy Nagao. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 576.851.214

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Beatriz Jandre Ferreira

**Envolvimento de domínios lipídicos na infecção de células endoteliais humanas por  
*Streptococcus agalactiae***

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 16 de fevereiro de 2017.

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Prescilla Emy Nagao Ferreira (Orientadora)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra Cláudia Vitória de Moura Gallo  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Verônica Viana Vieira  
Fundação Oswaldo Cruz

---

Prof. Dr. Marcelo Einecker Lamas  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2017

## **DEDICATÓRIA**

A Deus, ao Universo e a melhor família do mundo.

A minha!

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me fazer perceber a cada segundo, que está ao meu lado. Um período de transformações e nova visão de vida.

A minha família, por todo apoio, força, carinho e amor.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dra Prescilla Emy Nagao Ferreira, à qual não tenho palavras para agradecer a oportunidade e confiança. Um simples OBRIGADA, com todo carinho e gratidão fala mais alto que qualquer coisa.

A todos do laboratório, agradeço por toda força e companhia durante todo esse tempo, vocês são incríveis.

Um paragrafo é pouco para agradecer as minhas companheiras diárias de bancada, risos, desesperos, angústias e comilanças. Pamella, Priscila, Jessica Mendonça, Glenda, Dayane e Melissa, vocês são para vida toda! Meu muito obrigada, carinho e respeito.

A Jéssica Oliveira, Bruna, tia Mariléa, Gabriela e Marcos Temperini, obrigada pela ajuda, conversas e força nos momentos mais necessários.

Agradeço também ao Professor Marcelo por acreditar no meu trabalho e abrir as portas de seu laboratório para que parte dele pudesse ser realizada. Agradeço também a Professora Jennifer e a Rose (Rosilane) por todo conhecimento, força e apoio.

Enfim, agradeço a todos por tudo, citados ou não, vocês fizeram esses quatro anos passarem sem que eu percebesse.

Agradecimento especial ao meu programa de pós-graduação (principalmente a Mônica), a CAPES e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

## RESUMO

FERREIRA, Beatriz Jandre. **Envolvimento de microdomínios lipídicos na infecção de células endoteliais humanas por *Streptococo agalactiae***. 2017. 108 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Estreptococos do grupo B (EGB) é a causa mais comum de pneumonia e sepse durante o período neonatal. O primeiro passo para o desenvolvimento da patogênese depende do processo de adesão e invasão do patógeno a célula alvo. A exploração de regiões conhecidas como microdomínios lipídicos (ML) e a modulação de vias de sinalização podem contribuir com o processo de invasão do patógeno. Embora o mecanismo pelo qual o EGB interage com as células humanas e causam danos ao processo fisiológico nessa área precisa ser melhor entendido. O objetivo desse estudo foi investigar a adesão e viabilidade intracelular do EGB pertencente ao sorotipo III em células endoteliais humanas. A amostra de EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) exibiu uma redução na adesão e invasão após tratamento com M $\beta$ CD nas células endoteliais. Em contraste, houve um aumento expressivo na adesão e diminuição da invasão foi verificada nas HUVEC tratadas com inibidor de PI3K (LY294002). OS resultados demonstram a presença das moléculas marcadoras de ML (Cav-1, Cav-2, Flot-1 and Flot-2) nas HUVEC. Nossos dados demonstram pela primeira vez a co-localização do EGB com Cav-1, Cav-2 e Flot-1 nas HUVEC por microscopia confocal a laser. Em adição, ensaios realizados por western blotting mostram o envolvimento da via PI3K/AKT durante a interação EGB-HUVEC após 15 min de infecção. A modulação dos níveis de Esfingosina-1 fosfato durante a interação do EGB com as HUVEC foi demonstrado por cromatografia líquida. Esse trabalho promoveu evidências que os ML e PI3K associado aos ML esta relacionado com a invasão do EGB nas células endoteliais humanas.

Palavras-chave: Estreptococos do grupo B. Células endoteliais. Microdomínios lipídicos. PI3/AKT. Esfingosina-1 fosfato.

## ABSTRACT

FERREIRA, Beatriz Jandre. **Implication of lipid microdomains in the infection of human endothelial cells for *Streptococcus agalactiae***. 2017. 108 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Group B streptococci (GBS) are the most common cause of pneumonia and sepsis during the neonatal period. The first step in the development of pathogenesis depends on the process of adhesion and invasion of the pathogen to the target cell. The exploration of regions known as lipid microdomains (ML) and the modulation of signaling pathways may contribute to the process of pathogen invasion. However, the mechanism by which GBS interacts with human cells and damage physiological processes is an area that needs to be better understood. The objective of this study was to investigate the adhesion and intracellular viability of GBS belonging to serotype III in human endothelial cells. GBS 90356 strain (capsular type III-CSF) exhibited a reduction in adhesion and invasion in M $\beta$ CD-treated endothelial cells. In contrast, an expressive increase in adhesion and decrease of invasion were verified in HUVEC treated with PI3K inhibitor (LY294002). The results showed the presence of the major ML marker molecules (Cav-1, Cav-2, Flot-1 and Flot-2) on HUVEC. Our data addresses for the first time the co-localization of GBS with Cav-1, Cav-2 and Flot-1 on HUVEC by confocal laser microscopic analysis. In addition, western blotting assays of showed the involvement of the PI3K/AKT pathway during the interaction GBS-HUVEC after 15 min post-infection. The modulation at the levels of sphingosine-1 phosphate during the interaction of GBS with HUVEC was also demonstrated by liquid chromatography. This work provides the evidence that lipid rafts and raft-associated PI3K are implicated in GBS invasion to human endothelial cells.

Keywords: Group B streptococcus. Endothelial cells. ICAM-1. Cellular interaction. Lipidic microdomains. PI3K/AKT. Sphingosine-1 phosphato.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema representativo da estrutura dos microdomínios lipídicos na membrana plasmática.....	30
Figura 2 –	Esquema representativo da estrutura de microdomínio lipídico linear.....	33
Figura 3 –	Representação esquemática da via de síntese de S1P.....	36
Figura 4 –	Citotoxicidade da M $\beta$ CD em HUVEC.....	52
Figura 5 –	Curva de crescimento da amostra de EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) na presença de M $\beta$ CD.....	53
Figura 6 –	Interação da amostra de EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) com HUVEC na presença ou ausência de M $\beta$ CD.....	54
Figura 7 –	Interação EGB-HUVEC na presença ou ausência do inibidor de PI3K e M $\beta$ CD.....	56
Figura 8 –	Moléculas marcadoras de ML na superfície das HUVEC.....	57
Figura 9 –	Proteínas marcadoras de ML na superfície das HUVEC por microscopia confocal a laser.....	59
Figura 10 –	Modulação da distribuição das proteínas de ML na superfície das HUVEC após tratamento com M $\beta$ CD por microscopia confocal a laser.....	60
Figura 11 –	Modulação da distribuição das proteínas de superfície das HUVEC após infecção com EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) por microscopia confocal a laser.....	62
Figura 12 –	Distribuição das proteínas marcadoras de ML nas HUVEC após tratamento com a M $\beta$ CD e infecção com EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) por microscopia confocal a laser.....	63
Figura 13 –	Índice de co-localização da amostra EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) com proteínas de ML na superfície das HUVEC.....	65
Figura 14 –	Fosforilação da proteína Akt durante interação EGB 90356 (tipo capsular III-líquor)-HUVEC na presença ou ausência de M $\beta$ CD.....	66
Figura 15 –	Perfil de fosforilação da proteína PI3K durante a interação EGB 90356 (tipo capsular III-líquor)-HUVEC na presença ou não de M $\beta$ CD e LY294002.....	67
Figura 16 –	Análise da atividade da esfingosinaquinase na interação de EGB 90356 (tipo capsular III-líquor)-HUVEC na presença ou não de M $\beta$ CD.....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP	Academia Americana de Pediatria
AC	Adenilato ciclase
ACOG	Colégio de Obstetras e Ginecologistas
AKT	Serine/threonine kinase
ALT	Ácido lipoteicóico
AMPc	AMP ciclíco
ATP	Adenosina trifosfato
BHI	Infusão cérebro coração (brain heart infusion)
BMEC	Células endoteliais da microvasculatura de cérebro
BSA	Albumina sérica bovina
CC	Complexo clonal
CDC	Centro de controle e prevenção de doenças
CD	Ciclodextrina
CE	Célula endotelial
C1P	Ceramida-1-fosfato
CAMP	Christie, Atkins e Munch-Petersen
CAV	Proteína caveolina
CAV-1	Caveolina 1
CAV-2	Caveolina 2
CC	Complexo clonal
CDC	Centro de controle e prevenção de doenças
CD	Ciclodextrina
CE	Célula endotelial
CEM	<i>Cholesterol-enriched membranes</i> (membranas enriquecidas de colesterol)
CER	Ceramida
CERK	Ceramida cinase
CERS	Ceramida sintase
CERT	Proteína transportadora de ceramida
CP	Capsula polissacarídica
CSF	Fator estimulador

CTA	Subunidade A da toxina a coléra
CTB	Subunidades B da toxina a coléra
CT	Toxina do cólera
CTxB	Subunidade B da toxina do coléra
DAPI	4,6-Diamino-2-phenylindole dihydrochloride
DEGS	Dihidroceramida dessaturases
DIGs	<i>Detergent insoluble</i>
DRMs	<i>Detergent-resistant membranes</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade ótica
ECV304	Linhagem de célula endotelial da veia umbilical humana
EDG	<i>Endothelial differentiation gene</i>
EDTA	Ácido etileno amino acético
EGB	Estreptococos do grupo B
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Enos	<i>Endotelial nitric-oxide synthase</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FLOT-1	Flotilina 1
FLOT-2	Flotilina 2
GEMs	<i>Glycosphingolipid-enriched membranes</i>
GM1	Monossialogangliosídeo 1
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HBMEC	Microvasculatura de cérebro humano
HMEC	<i>Human Mammary Epithelial Cells</i>
HPβCD	Hidroxipropil-β-ciclodextrina
HUVEC	Célula endotelial da veia umbilical humana
ICAM-1	Molécula de adesão celular-1
IFN-gama	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
kDa -	Quilodálton

LPS -	Lipopolissacarídios
M199	Meio 199
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
ML	Microdomínios lipídicos
MP	Membrana plasmática
MTT	3-(4,5 dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazólio brometo
M $\beta$ CD	Metil- $\beta$ -ciclodextrina
NOS	Óxido nítrico sintase
PBS	Solução salina tamponada fosfatada
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PMSF	<i>phenylethylsulphonyl fluoride</i>
RE	Retículo endoplasmático
ROS	Espécies reativas do oxigênio
S1P	Esfingosina 1-fosfato
SBE $\beta$ CD	Sulfobutil éter- $\beta$ -ciclodextrina
SDS -	Duodecil sulfato de sódio
SFB -	Soro fetal bovino
SGPL	Esfingosina 1-fosfato liase
SPFH	<i>Stomatins, Prohibitins, Flotillins, HflK/C</i>
SPHK	<i>Sphingosine kinase</i>
Spns2	Spinster 2
ST	Sequência tipo
TGF Beta	Fator de crescimento tumoral-beta
TLR -	Receptor <i>Toll Like</i>
TNF-alfa -	Fator de necrose tumoral alfa
VCAM	Molécula de adesão celular vascular
VIP21	<i>Vesicular integral membrane protein</i>
UFC/mL -	Unidades formadoras de colônia por mililitro
VCAM -	Molécula de adesão celular vascular

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	43
2	<b>METODOLOGIA</b> .....	44
2.1	<b>Amostra bacteriana</b> .....	44
2.2	<b>Cultura de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC)</b> .....	44
2.3	<b>Tratamento das HUVEC com Metil-b-ciclodextrina (M<math>\beta</math>CD) e/ ou LY294002</b> .....	45
2.4	<b>Anticorpos e marcadores fluorescentes</b> .....	45
2.5	<b>Determinação de viabilidade celular por MTT</b> .....	46
2.6	<b>Ensaio de interação de EGB com HUVEC tratada ou não com M<math>\beta</math>CD e/ouLY294002</b> .....	46
2.7	<b>Microscopia de fluorescência</b> .....	47
2.8	<b>Dosagem de proteína</b> .....	48
2.9	<b>Western-Blotting</b> .....	48
2.10	<b>Ensaio de fosforilação e extração de lipídios</b> .....	49
2.11	<b>Análise densitométrica</b> .....	50
2.12	<b>Análise estatística</b> .....	50
3	<b>RESULTADOS</b> .....	51
3.1	<b>Efeito da Metil-<math>\beta</math>-ciclodextrina (M<math>\beta</math>CD) nas HUVEC</b> .....	51
3.2	<b>Efeito da M<math>\beta</math>CD no crescimento bacteriano</b> .....	53
3.3	<b>Interação da amostra de EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) com HUVEC na presença ou ausência da M<math>\beta</math>CD</b> .....	54
3.4	<b>Interação da amostra de EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) com HUVEC na presença do inibidor de PI3K (LY294002) associado ou não ao tratamento com M<math>\beta</math>CD</b> .....	55
3.5	<b>Presença de moléculas marcadoras de microdomínios lipídicos (ML) na superfície das HUVEC</b> .....	57
3.6	<b>Distribuição das proteínas marcadoras de ML na superfície das HUVEC quiescentes através de microscopia de fluorescência confocal a laser</b> .....	58
3.7	<b>Modulação da distribuição das proteínas marcadoras de ML na superfície</b>	

	<b>das HUVEC após tratamento com M<math>\beta</math>CD.....</b>	<b>59</b>
3.8	<b>Modulação da distribuição das proteínas de superfície das HUVEC após infecção com a amostra de EGB 90356 (tipo capsular III-líquor).....</b>	<b>61</b>
3.9	<b>Modulação da distribuição das proteínas de membrana marcadoras de ML nas HUVEC após tratamento com M<math>\beta</math>CD e infecção com EGB 90356 (tipo capsular III-líquor).....</b>	<b>62</b>
3.10	<b>Índice de co-localização EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) com ML em HUVEC).....</b>	<b>64</b>
3.11	<b>Perfil de fosforilação da proteína Akt durante interação EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) com HUVEC na presença ou ausência de M<math>\beta</math>CD.....</b>	<b>65</b>
3.12	<b>Perfil de fosforilação da proteína PI3K durante a interação EGB 90356 (tipo capsular III-líquor)- HUVEC na presença ou não de M<math>\beta</math>CD.....</b>	<b>67</b>
3.13	<b>Atividade da esfingosinaquinase durante a interação EGB 90356 (tipo capsular III - líquor)- HUVEC.....</b>	<b>68</b>
4	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>70</b>
	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>81</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>82</b>

## INTRODUÇÃO

### Estreptococos do grupo B: características gerais

Os *Streptococcus agalactiae* (estreptococos do grupo B, EGB) pertencem à família *Streptococcaceae* e são caracterizados pela presença do antígeno do grupo B de Lancefield constituído por resíduos de ramnose e *N*-acetilglicosamina (Lancefield, 1934). São cocos Gram-positivos,  $\beta$ -hemolíticos, anaeróbio facultativos, catalase e oxidase negativos, hipotato e CAMP positivo que crescem aos pares ou em cadeias (Spellerberg, 2000; Nizet, 2002, Farley, 2001, McGee & BeAll, 2013).

O EGB é classificado em diferentes tipos sorológicos de acordo com o polissacarídeo capsular constituído por resíduos de glicose, galactose, ramnose, *N*-acetilglicosamina e ácido siálico (Paoletti *et al.*, 1996; Chaffin *et al.*, 2005; Cieslewicz *et al.*, 2005, Slotved *et al.*, 2007). Podem ser classificados em dez sorotipos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX) de acordo com as variações do número de unidades repetidas dos açúcares capsulares e o tipo de ligação glicosídica (Spellerberg, 2000; Slotved *et al.*, 2007; Kong *et al.*, 2008). O sorotipo IX, último a ser descrito, parece ter evoluído a partir da mutação e/ou da recombinação entre os sorotipos V e VII (Berti *et al.*, 2014).

O EGB também foi classificado quanto a sua sequência tipo (ST), de acordo com o perfil alélico de sete *loci* (*adhP*, *pheS*, *atr*, *glnA*, *sdhA*, *glcK*, *tkl*) diferentes, sendo caracterizado como ST-1, ST-17, ST-19 ou ST-23 (Jones *et al.*, 2003), que pertencem aos complexos clonais (CCs), CC1, CC10, CC17, CC19 e CC23 associados a colonização e invasão, enfatizando, assim, a diversidade do EGB em humanos (Jones *et al.*, 2006; Karatan & Watnick, 2009; Brzychczy-Wloch *et al.*, 2014; Cunha *et al.*, 2014). Vários estudos revelaram que CC17 é formado por um grupo homogêneo de isolados do tipo capsular III e outros CCs são grupos heterogêneos que expressam diferentes tipos capsulares (Luan *et al.*, 2005; Usein *et al.*, 2014). Tazi e colaboradores (2010) demonstraram uma alta ligação do clone hipervirulento tipo III (ST-17) à doença invasiva neonatal e a meningite, sendo este um importante alvo para estudos epidemiológicos dos EGB, que se propagou com sucesso a nível mundial (Jones *et al.*, 2006; Lamy *et al.*, 2006; Bellais *et al.*, 2012).

Dos 10 sorotipos capsulares já descritos, cinco deles (Ia, Ib, II, III e V) são associados à doenças no mundo (Edmond *et al.*, 2012; Le Doare & Heath, 2013). A distribuição dos

diferentes sorotipos pode variar de acordo com a região geográfica e origem étnica (Le Doare & Heath, 2013). Nos Estados Unidos e em alguns países da Europa, os sorotipos Ia, II, III e V representam 80-90% dos isolados clínicos, enquanto os sorotipos VI e VIII são relativamente comuns (60,3 %) no Japão (Lachenauer *et al.*, 1999; Dogan *et al.*, 2005; Kong *et al.*, 2008; Murayama *et al.*, 2009). Nos Emirados Árabes e Noruega há prevalência dos sorotipos V e IV, respectivamente (Amin *et al.*, 2012; Radtek *et al.*, 2012). No continente africano, o sorotipo V apresenta maior ocorrência (Doare & Heath, 2013), enquanto na Ásia o predomínio é dos sorotipos Ib e III (Rivera *et al.*, 2015).

Estudos sobre a caracterização e epidemiologia do EGB ainda são limitados nos países em desenvolvimento (Johri *et al.*, 2013). Na América Latina, em países como República Dominicana e Panamá, os sorotipos mais frequentes em neonatos foram Ia e III, respectivamente (Rivera *et al.*, 2015). No Brasil, o número de estudos relacionados à prevalência do EGB na população ainda é escasso, porém, dentre os poucos trabalhos, os sorotipos Ia, Ib, II, III, IV e V foram os mais encontrados, relacionados com infecções em gestantes e neonatos. Nas regiões Centro-Oeste e Sul do Brasil há uma prevalência dos sorotipos Ia e II; no Norte e Nordeste prevalece o sorotipo Ib, enquanto no Sudeste os sorotipos II e III (Fiolo *et al.*, 2012; Pinto *et al.*, 2013; Dutra *et al.*, 2014). Ainda na região Sudeste, no estado do Rio de Janeiro, um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa demonstrou a prevalência dos sorotipos III, V, II, Ia e Ib (Soares *et al.*, 2014). São escassos os estudos relacionados à distribuição desses sorotipos em países subdesenvolvidos (Doare *et al.*, 2013), onde são encontrados as maiores taxas de mortalidade por infecções neonatais (seps e pneumonia) (Liu *et al.*, 2015).

### **Patogênese da infecção por EGB**

O primeiro relato sobre a ocorrência de EGB aconteceu por volta de 1887 (Nocard & Mollereau, 1887 *apud* Bisharat *et al.*, 2004), quando foi verificada a presença deste micro-organismo no leite bovino com a capacidade de colonizar as glândulas mamárias de ruminantes e de sobreviver por longos períodos, causando mastite nesses animais (Teixeira *et al.*, 2008, Martins *et al.*, 2010). A mastite trata-se de um processo inflamatório das glândulas mamárias (Martins *et al.*, 2010), apresentando graves consequências na economia industrial (Rosinski-Chupin *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013; Brito *et al.*, 2016). O EGB também pode



colonizar e causar infecções invasivas em outros animais como cachorros, cavalos, porcos guiné (Vandamme, 1997), sapos (Amborski *et al.* 1983), golfinhos (Evans *et al.* 2008) e peixes, como tilápias (Mian *et al.* 2009; Dangwetngam *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017).

Na década de 30, o EGB foi reconhecido como micro-organismo comensal e oportunista que compõe a microbiota normal dos tratos gastrointestinal e geniturinário de cerca de 30-40% de adultos saudáveis (Lancefield, 1934; Martinez *et al.*, 2000; Oster *et al.*, 2014; Korir *et al.*, 2016). A atuação deste micro-organismo como patógeno humano foi confirmada em 1970 em infecções invasivas como pneumonia, sepse e meningite (Schuchat, 1998; Schuchat, 1999; Edwards & Backer, 2001, Teixeira *et al.*, 2008).

O EGB permanece como a principal causa de sepse e meningite neonatal e está associado com significativa morbidade e mortalidade (Libster *et al.*, 2012; Mithal *et al.*, 2017), sendo uma das principais bactérias que ameaça a vida de gestantes, neonatos, idosos e adultos imunocomprometidos (Koenig & Keenan, 2009; Lemire *et al.*, 2012). Estima-se que 10-30% das mulheres sejam portadoras de EGB, cuja colonização vaginal e/ou retal pode ser permanente, intermitente ou transitória (Soriani *et al.*, 2006; Petterson, 2007; Verani & Schrag, 2010). Nos homens pode se multiplicar nos órgãos reprodutivos masculinos, particularmente na uretra e próstata, podendo levar a um quadro de bacteremia (Frey *et al.*, 2011).

Estudo realizado por Marchaim e colaboradores (2003) numa população do Sul de Israel demonstrou que a prevalência da colonização materna foi de 12,3% e a incidência de infecção neonatal foi 0,095/1.000 nascidos vivos. Na Arábia Saudita, a taxa de colonização por EGB entre mulheres grávidas foi de 27,6% (El-Kersh *et al.*, 2003), enquanto no Irã a prevalência de colonização reto-vaginal foi de 9,1% com taxa de transmissão de 60% nos recém-nascidos (Namavar *et al.*, 2008). Pesquisa realizada na Polônia com 340 gestantes, no período de 2004-2006, demonstrou que mulheres com gravidez de risco (hipertensão, pré-eclampsia/eclampsia, diabetes *mellitus*, cardiopatia ou ameaça de trabalho de parto prematuro) foram mais suscetíveis à colonização pelo EGB que àquelas com gravidez normal (20,0% versus 17,2%) (Strus *et al.*, 2009).

No Brasil o primeiro a analisar a colonização por EGB em gestantes foi Benchetrit (1982), onde dentre as 86 gestantes, 26% eram colonizadas pelo patógeno. Além disto, relatou que 15% dos recém-nascidos dessas mulheres tornaram-se contaminados. Na Universidade Estadual Paulista (UNESP), das 405 mulheres entre a 35<sup>a</sup> e 37<sup>a</sup> semana de gestação, 25,4% apresentaram colonização por EGB (Rocchetti *et al.*, 2011). No Paraná (Londrina) foi descrita a menor taxa de colonização (15%) (Mocelin *et al.*, 1995). Em Santa Catarina a prevalência

do EGB foi de 21,6% em gestantes, próxima da encontrada na região Sudeste (Pogere *et al.*, 2005) e no Nordeste do Brasil (20,4%) (Costa *et al.*, 2008). As taxas de colonização materna por EGB entre 15-25% coloca o Brasil em um patamar preocupante, pois é possível que infecções neonatais estejam ocorrendo sem serem identificadas.

A incidência de sepse causada por EGB em recém-nascidos tem sido relatada em 0,2-2/1000 nascidos vivos em diferentes populações (Grimwood *et al.*, 2002; Bertini *et al.*, 2006). Em Porto Alegre foi encontrada uma prevalência de 1/1000 nascidos vivos no período de 1996-1999 (Miura & Martin, 2001). Na cidade de Campinas foi relatada uma incidência de 1,4/1000 neonatos no período de 2003-2004 (Nonura *et al.*, 2005). Estudos mais recentes entre 2007-2011 mostrou a incidência de 0,6/1000 nascidos vivos para infecção por EGB (Fiolo *et al.*, 2012). Em Brasília, a incidência relatada é ainda maior em casos de prematuridade, 1,7/1000 nascidos vivos com índice de fatalidade de 44% dos casos (Freitas & Romero, 2016).

A patogênese da infecção em neonatos tem início através da colonização assintomática do trato genital feminino, geralmente nos três primeiros meses de gravidez (Baker & Edwards, 2001; Gibbs *et al.*, 2004; Rocchetti *et al.*, 2011). O primeiro contato com a bactéria pode ocorrer de modo ascendente, onde o EGB atravessa a membrana placentária, iniciando uma infecção intrauterina e induzindo o parto prematuro ou através da aspiração do líquido amniótico e/ou fluido vaginal contaminado durante a passagem do neonato pelo canal do parto. Assim, através da aspiração o patógeno pode colonizar a cavidade oral do recém-nascido, seguido do trato respiratório e, posteriormente o trato gastrointestinal (Doran & Nizet, 2004).

O risco de transmissão deste patógeno em neonatos é de aproximadamente 70% (Bodaszewska-Lubas *et al.*, 2013). A transmissão de forma vertical para o neonato não ocorre somente em decorrência da contaminação do canal do parto (via ascendente), mas também por contaminação secundária à bacteremia materna (via transplacentária) (Anderson-Berry *et al.*, 2006). Tais dados são confirmados por estudos realizados nos Estados Unidos onde foi demonstrado que 10-36% das mulheres grávidas eram portadores de EGB, com uma taxa de transmissão vertical de 50-65%. Pesquisas na área de saúde na Índia mostraram baixa taxa de colonização (1,6-1,76%), embora a taxa de transmissão vertical seja consistente com as relatadas em outros países (53-56%) (Patil *et al.*, 2013).

Infecções neonatais invasivas por EGB são caracterizadas por dois quadros clínicos: a infecção de início precoce e a infecção de início tardio (Schuchat, 1999; Rajagopal, 2009). A infecção de início precoce se inicia nas primeiras 24-48 horas de vida, em 85% dos casos

(Jiang *et al.*, 2004; Joubrel *et al.*, 2015; Giannoni *et al.*, 2016) e é considerada entre 0-6 primeiros dias de vida (Simonsen *et al.*, 2014), tendo como principais manifestações clínicas a pneumonia e a sepse (Schuchat, 1998; Doran & Nizet, 2004). Estima-se que, na ausência de qualquer intervenção, aproximadamente 50% dos bebês nascidos de mães colonizadas se tornam colonizados e 1-2% deles progridem para desenvolver doença invasiva (Yow *et al.*, 1980; Cutland *et al.*, 2009; Le Doare & Heath, 2013). Desta forma, mais de 95% dos casos de infecções neonatais estão relacionados a vários fatores de risco como: o grau de colonização materna, tempo entre a ruptura da placenta e o parto, febre materna acima de 38°C, infecção urinária e a prematuridade (Baker, 1999; Hickman *et al.*, 1999; Gibbs *et al.*, 2004; Law *et al.*, 2005; Hakansson *et al.*, 2006).

A taxa de mortalidade é de 2-5% para bebês nascidos entre a 37<sup>a</sup> e 42<sup>a</sup> semanas de gestação e de 25% para bebês prematuros (Radetsky *et al.*, 1994; Adriaanse *et al.*, 1996; Gibbs *et al.*, 2004). Um estudo no Malawi demonstrou que cerca de metade (52%) das crianças com doença de início precoce apresentaram o quadro de sepse, 17% apresentaram meningite e 14% um provável quadro de meningite (Gray *et al.*, 2007). Os sorotipos Ia, II e III são os mais prevalentes neste tipo de infecção (Apgar *et al.*, 2005).

A infecção de início tardio ocorre, geralmente, entre 7-89 dias de vida (Verani & Schrag, 2010) e, na maioria dos casos, em decorrência da contaminação do recém-nascido por micro-organismos do ambiente onde se encontra internado (infecção hospitalar) ou adquirida na comunidade (Schuchat, 1998; Adams-Chapman & Stoll, 2006). A invasão da corrente sanguínea pela bactéria é seguida pela contaminação do líquido, o que inicia uma resposta inflamatória característica da meningite. Desta forma, as manifestações clínicas mais frequentes neste tipo de infecção são a bacteremia e a meningite que atingem até 50% dos casos (Edwards & Baker, 2001). Essas infecções de início tardio representam 80% de todos os casos de infecções por EGB (Spellerberg, 2000).

A taxa de mortalidade da doença de início tardio (2-6%) é significativamente menor que a de início precoce (10%), porém atinge elevada morbidade. Além disto, dos 50% de neonatos que sobrevivem à infecção de início tardio por EGB apresentam sequelas neurológicas como: cegueira cortical, surdez, ataques apopléticos descontrolados, hidrocefalia e perda da audição e fala (Edwards & Baker, 2001; Johri *et al.*, 2006; Dangor *et al.*, 2015).

A transmissão vertical, aquisição nosocomial, prematuridade e o uso de antibióticos na profilaxia intraparto são reconhecidos como fatores de risco (Schrag *et al.*, 2000; Rajagopal, 2009; Verani *et al.*, 2010). Estudo realizado no Reino Unido mostrou que 22% dos sobreviventes à meningite neonatal ( $\leq$  28 dias de vida) apresentaram sequelas

leves/moderadas (por exemplo, hidrocefalia, epilepsia, problemas de aprendizagem e paralisia cerebral leve) e 14% apresentavam sequelas severas (paralisia cerebral, atraso global, problemas de aprendizagem significativos) (Stevens *et al.*, 2003). Outro estudo realizado nos Estados Unidos descreveu porcentagens semelhantes em relação às sequelas neurológicas entre os sobreviventes da meningite ocasionadas pelo EGB (25% com sequelas moderadas e 19% com grave comprometimento neurológico) (Libster *et al.*, 2012).

O sorotipo III é o principal responsável pela maioria das infecções tardias que são manifestadas por meningite e sepse (Tazi *et al.*, 2010; Bodaszewska-Lubas *et al.*, 2013; Escolano *et al.*, 2014). Dados da literatura mostram que a gestação de gêmeos é um fator predisponente para a infecção, tanto precoce quanto tardia (Presentation, 2002). Apesar de não existir um índice de colonização vaginal em mulheres grávidas de gêmeos bivitelinos, o risco de desenvolvimento de uma infecção invasiva nas 24-48h posteriores ao início da infecção em um dos irmãos pode ser maior (Moylett, 2000). Isto apoiaria a teoria de que a mesma amostra bacteriana foi responsável pela colonização na infecção tardia e não ocorreu pela aquisição de um novo patógeno (Escolano, 2014).

A partir da década de 90 com a emissão de recomendações do Centro de Controle e Prevenção de doenças (CDC) de Atlanta, juntamente com o Colégio de Obstetras e Ginecologistas (ACOG) e a Academia Americana de Pediatria (AAP), passou-se a sugerir o rastreamento do EGB no pré-natal e a profilaxia com antimicrobianos durante o parto para as gestantes colonizadas entre a 35-37<sup>a</sup> semana de gestação diminuindo significativamente a mortalidade em países industrializados (Moore *et al.*, 2003; Verani *et al.*, 2010). Como exemplo desta medida, os Estados Unidos, apresentou uma diminuição no índice da doença de início precoce de 1,7/1000 nascidos vivos no início da década de 90 para 0,34/1000 nascidos vivos após a implementação das novas recomendações. Porém, a incidência da doença de início tardio, a qual representa cerca de um terço dos casos, permaneceu inalterada, o que tem gerado preocupações sobre o surgimento de resistência aos antibióticos e seu impacto sobre a microbiota intestinal do neonato. Além disso, o uso da profilaxia antibiótica pode ser ainda mais problemático, pois houve um aumento no índice de ocorrência da sepse de início precoce causada pelo patógeno *Escherichia coli* após aplicação deste procedimento (Stoll *et al.*, 2002; Verani *et al.*, 2010; Phares *et al.*, 2008; Deshmukh *et al.*, 2014).

No Brasil, as autoridades de saúde pública não adotaram as recomendações dos CDC para prevenir a doença de início precoce por EGB e os dados nacionais sobre a taxa de transmissão durante a gravidez ou a incidência da doença de início precoce é resultado de poucos trabalhos publicados, sendo o mais recente, compreendendo o período de 2007-2011

demonstrando uma prevalência de 0.51/1000 nascidos vivos (Miura *et al.*, 2001; Vaciloto *et al.*, 2002; Fiolo *et al.*, 2012; Barros *et al.*, 2016).

Enquanto o EGB é responsável pela sepse, meningite e pneumonia em neonatos (Schuchat, 1999), as manifestações clínicas em adultos são numerosas e variadas. Podem ser observadas infecções cutâneas, pneumonia, infecção urinária, meningite, endocardite, bacteremia, entre outras (Farley, 2001; Lanotte *et al.*, 2013). Nas infecções por EGB em adultos, as taxas de incidência tornaram-se mais elevadas entre pacientes com 60 anos de idade ou mais, sendo a sepse a forma mais comum da doença invasiva, seguida por infecção de pele e tecidos moles, pneumonia e infecções do trato urinário. Os fatores de risco em adultos incluem diabetes *mellitus*, doença cardiovascular, doença hepática, portadores do vírus HIV, câncer, pessoas em terapia com corticosteroides e transplantados (Jackson *et al.*, 1995). Estudo desenvolvido por Pimentel (2016) enfatizou a vulnerabilidade dos pacientes com câncer às infecções por EGB no Rio de Janeiro (2010-2014), demonstrando um número significativo de casos de infecções invasivas (82%) em adultos com idade entre 20 a 79 anos de idade.

As infecções por EGB podem ser adquiridas na comunidade ou no ambiente nosocomial. O sorotipo V é o mais frequente nas infecções em adultos (Blummburg *et al.*, 1996), sendo responsável por 41% dos casos de sepse (Areschoug *et al.*, 1999), com taxa de mortalidade de 15% em idosos nos EUA (Farley, 2001; Edwards & Baker, 2005, Rajagopal, 2009).

Pacientes infectados com EGB do sorotipo III têm uma maior taxa de meningite, enquanto os infectados com amostras do sorotipo V têm uma maior mortalidade (Harrison *et al.*, 1998; Weisner, 2004; Fluegge, 2005; Pettersson, 2007). As taxas de casos fatais são muito maiores entre adultos do que entre neonatos (Skoff *et al.*, 2009).

### **Fatores de virulência**

Os mecanismos utilizados pelo EGB para causar doenças no hospedeiro não estão totalmente esclarecidos. A capacidade do EGB em causar doenças depende da codificação de inúmeros fatores de virulência como: a cápsula polissacarídica, o fator CAMP, a hialuronidase, a hemolisina, a C5a peptidase, a proteína C, o ácido lipotéico e a toxina CM101 (Liu & Nizet 2004; Lindahl *et al.*, 2005; Maisey *et al.*, 2008; Beigverdi *et al.*, 2014).

Como observado em diversas bactérias patogênicas, isolados clínicos de EGB são recobertos pela cápsula polissacarídica (CP, antígeno tipo-específico) (Cielsiewicz *et al.*, 2005). A CP é encontrada em todos os isolados clínicos oriundos de doenças invasivas e demonstrada como o principal fator de virulência do EGB (Kogan *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 2001; Emaneini *et al.*, 2014). É formada por polímeros de alto peso molecular constituído por unidades repetidas de glicose, galactose, N-acetilglicosamina e ácido siálico (Kogan *et al.*, 1996). O ácido siálico pertence a uma família de açúcares comumente presente na superfície das células dos vertebrados, sendo reconhecido como um fator importante para a sobrevivência do EGB dentro do hospedeiro (Cielsiewicz *et al.*, 2005). A sialilação da CP representa um dos fatores mais críticos para limitar a eficácia da defesa fagocítica do hospedeiro, pois inibe a ativação da via do complemento dificultando o reconhecimento do EGB como organismo estranho e o protegendo das funções bactericidas de neutrófilos e monócitos (Basset *et al.*, 2003; Maisey *et al.*, 2008; Carlin *et al.*, 2009; Rajagopal, 2009; Chang *et al.*, 2014).

Diversos estudos têm correlacionado a produção da CP e a virulência bacteriana (Yeung & Mattingly, 1984; Albanyan & Edwards, 2000; Lemire *et al.*, 2012). Estudos demonstraram que amostras de EGB não encapsuladas apresentam significativa redução na virulência e maior susceptibilidade à ação do sistema imune do hospedeiro (Wessels *et al.*, 1987 *apud* Doran *et al.*, 2016; Patterson *et al.*, 2012). A remoção de ácido siálico em amostras pertencentes ao sorotipo III reduziu a virulência bacteriana em ratos neonatos e aumentou a opsonização e fagocitose por neutrófilos humanos *in vitro* (Wessels *et al.*, 1992). Dados obtidos pelo nosso laboratório demonstraram que amostras de EGB pertencentes aos sorotipos Ia, III e V, quando tratadas com neuraminidase, não apresentaram viabilidade intracelular após 1 h de interação, sugerindo o importante papel do ácido siálico na sobrevivência dessas amostras em macrófagos murinos residentes (Monteiro *et al.*, 2004). Lemire e colaboradores (2012) também demonstraram que amostras de EGB encapsuladas apresentaram vantagem em relação à invasão e sobrevivência em células dendríticas derivadas de camundongo quando comparadas com amostras bacterianas mutantes não encapsuladas.

O fator CAMP, que é nomeado pelas iniciais dos pesquisadores Christie, Atkins and Miunch - Peterson (Christie *et al.*, 1944) é uma proteína de 23-25 kDa secretada pelos EGB que promove aumento da hemólise em placa de ágar sangue-5% hemácia de carneiro quando associada à  $\beta$ -hemolisina produzida por amostras de *Staphylococcus aureus*. O alargamento da zona de lise adquire forma de ponta de seta na área de intersecção das duas estrias (*S. aureus* e EGB) (Koneman *et al.*, 1997; Martins, 2010). O fator CAMP também possui a

capacidade de ligar-se a proteínas ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol, promovendo a lise da célula hospedeira através deste receptor (Lang *et al.*, 2007). Além da capacidade de lisar membranas, o fator CAMP pode interagir com a porção Fc das imunoglobulinas humanas da classe IgG e IgM fazendo com que anticorpos do hospedeiro tornem-se ineficazes durante a opsonização bacteriana (Jurgens *et al.*, 1987).

Os mecanismos moleculares e a importância deste fator de virulência permanecem pouco conhecidos. Skalka & Smola (1981) demonstraram que a injeção intravenosa do fator CAMP em coelhos promoveu a morte destes animais. Outros autores também relataram os efeitos letais do fator CAMP em coelhos e camundongos (Fehrenbach *et al.*, 1984; Jurgens *et al.*, 1987). Lang & Palmer (2003) evidenciaram, através de microscopia eletrônica de transmissão, a formação de poros de tamanho limitado e heterogêneo em eritrócitos de carneiro. A formação de poros contribuiu de forma significativa para a perda da integridade da barreira celular imposta pelo hospedeiro e sua consequente disseminação.

A hialuronidase é uma proteína de 110 kDa responsável por clivar cadeias glicosaminoglicanas durante a degradação do ácido hialurônico, componente principal do tecido conjuntivo e do sistema nervoso, sendo encontrado em altas concentrações na placenta, no líquido amniótico e no pulmão (Lin *et al.*, 1994; Gase *et al.*, 1998; Li & Jedrzejak, 2001; Rajagopal, 2009). A hialuronidase cliva a ligação glicosídica entre os resíduos de *N*-acetil- $\beta$ -D-glicosamina e ácido D-glicurônico do ácido hialurônico, facilitando a propagação dos EGB pelos tecidos do hospedeiro (Pritchard *et al.*, 1994). O envolvimento da hialuronidase no processo de invasão e disseminação bacteriana através da barreira hemato-encefálica também foi demonstrado (Kostyukova *et al.*, 1995; Zwijnenburg *et al.*, 2001).

A maioria dos isolados de EGB apresenta a  $\beta$ -hemolisina, uma toxina pluripotente associada à membrana, sendo pouco detectada no meio extracelular (Liu & Nizet, 2004; Rajagopal, 2009). A produção de  $\beta$ -hemolisina tem sido associada à lise direta de uma variedade de células eucarióticas (Gibson *et al.*, 1999), ativação inflamatória (Doran *et al.*, 2002) e virulência em modelos animais (Ring *et al.*, 2002). O gene de biossíntese de  $\beta$ -hemolisina (*cylE*) está associado à produção de um pigmento carotenóide que promove resistência do patógeno contra espécies reativas de oxigênio (Spellerberg, 2000; Liu *et al.*, 2004; Liu & Nizet, 2009). Alguns estudos demonstraram a atividade hemolítica e citolítica deste pigmento, atribuindo ao mesmo, um papel na patogênese de doenças invasivas ocasionadas pelo EGB (Liu *et al.*, 2004; Sendi *et al.*, 2009; Whidbey *et al.*, 2013). Uma mutante deficiente em  $\beta$ -hemolisina reduziu a virulência em modelos animais de sepsis e

meningite (Ring *et al.*, 2000; Doran *et al.*, 2003), evidenciando a importância deste fator de virulência.

Ring e colaboradores (2000) descreveram que a  $\beta$ -hemolisina e componentes da parede celular dos EGB agem em sinergismo, induzindo a síntese de iNOS (óxido nítrico sintase induzida) e geração de óxido nítrico, um potente fator na cascata da sepse. A  $\beta$ -hemolisina ainda exibe propriedades invasivas e apoptóticas que contribuem para patogenicidade da infecção bacteriana (Liu & Nizet 2004). Babien e colaboradores (2012) demonstraram que a  $\beta$ -hemolisina é capaz de desencadear a ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) em macrófagos infectados por EGB, induzindo a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 e a supressão de genes necessários para uma ação antibacteriana eficaz da resposta imune.

A C5a peptidase é uma serinoprotease de 128 kDa presente na superfície do EGB, capaz de clivar e inativar o componente quimiotático C5a do complemento. Desta forma, esta proteína evita o recrutamento de leucócitos colaborando para uma resposta imunológica ineficiente nos tecidos infectados (Hemming *et al.*, 1976; Lindhal *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2005; Rajagopal, 2009). Esta proteína é altamente conservada em relação a sua composição estrutural e está presente em todos os sorotipos de EGB (Hemming *et al.*, 1976). Além disso, Cheng e colaboradores (2002) demonstraram que a C5a peptidase é capaz de se ligar a fibronectina, atuando como uma adesina e promovendo a invasão bacteriana nas células epiteliais através de alterações no citoesqueleto da célula hospedeira.

Dentre as proteínas de superfície encontradas no EGB, o complexo proteína C é a melhor caracterizada. Este complexo consiste em antígenos alfa e beta independentemente expressos, relacionados à aderência em células epiteliais e a participação no processo de invasão, bem como a resistência a fagócito (Spellerberg, 2000; Lindahl *et al.*, 2005; Oviedo *et al.*, 2013). A proteína C é capaz de se ligar inespecificamente à porção Fc de IgG e IgM, interferindo assim com a opsonofagocitose dos EGB (Jürgens *et al.*, 1987; Baron *et al.*, 2004). Essa proteína é encontrada em cerca de 40-60% dos isolados clínicos, sendo detectada principalmente nos sorotipos Ia, Ib e II (Hickman *et al.*, 1999). Estudos demonstraram a interação da proteína C com glicosaminoglicanos presentes na superfície de células epiteliais, promovendo o rearranjo dos filamentos de actina, mediando a translocação do patógeno pela barreira epitelial e facilitando a invasão do patógeno (Baron *et al.*, 2004). Consequentemente, mutações que alteram a ligação a glicosaminoglicanos tornaram os EGB deficientes para invadir células epiteliais cervicais (Baron *et al.*, 2007).



Tanto as proteínas de superfície dos EGB quanto o ácido lipoteicoico (ALT) são moléculas importantes na aderência bacteriana às células hospedeiras. Contudo, o envolvimento deste fator de virulência como “adesina” ainda é controverso. Estudos realizados por Cox e colaboradores (1993), demonstraram a redução da aderência bacteriana em células do epitélio vaginal tratadas com ALT. Entretanto, em pesquisas posteriores, observou-se que o ALT não foi capaz de inibir a aderência de EGB às células de epitélio vaginal (Tamura *et al.*, 1994). Doran e colaboradores (2005) demonstraram que o ALT é uma molécula necessária para a invasão dos EGB às células endoteliais de microvasculatura de cérebro. Sabe-se que o ALT é também um importante indutor de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) em células mononucleares (Spellerberg, 2000), sendo a resposta inflamatória induzida pela ligação do ALT ao receptor *Toll Like* (TLR)-2/6 e dependente da fosforilação de resíduos de tirosina no TLR-2 (Henneke *et al.*, 2005).

A exotoxina CM-101 é um polissacarídeo produzido pelo EGB que se liga a receptores de células endoteliais da vasculatura pulmonar de neonatos. Essa exotoxina induz uma reação inflamatória local intensa que parece estar envolvida com a pneumonia causada pelo EGB em recém-nascidos com a síndrome de início precoce (Hellerqvist *et al.*, 1995). Além disto, essa exotoxina é responsável pelos danos no endotélio pulmonar e formação de trombos (Hellerqvist *et al.*, 1981; Hellerqvist *et al.*, 1987; Yakes *et al.*, 2000). A utilização do domínio purificado desta proteína tem inibido o crescimento de tumores (Yakes *et al.*, 2000).

### **Células endoteliais**

Células endoteliais (CE) estão envolvidas em modulações da homeostase metabólica, equilíbrio vascular, vasoconstrição e vasodilatação, adesão, coagulação e anticoagulação. Além disso, modula o tônus vasomotor, regula a estrutura vascular, controla o fluxo sanguíneo e é mediadora das respostas inflamatórias e imunológicas (Thorin & Shreeve 1998; Davidson *et al.*, 2010).

O endotélio é uma barreira semipermeável, pois permite a passagem de hormônios, hemácias, leucócitos, dentre outras moléculas (Banks, 1992). É formado por uma camada única de CE derivadas de precursores mesodérmicos pluripotentes, conhecidos como angioblastos e classificado como um tecido de revestimento pavimentoso simples (Banks, 1992; Mantovani *et al.*, 1992; Cines *et al.*, 1998) que na sua totalidade, é composto de  $1 - 6 \times 10^{13}$  CE, o que corresponde a uma área de superfície de mais de 1000 metros quadrados (Jaffe, 1987 *apud* Jietang *et al.*, 2013 ). As CE revestem a luz dos vasos sanguíneos de todo o

sistema circulatório, desde o coração até os capilares mais delgados (Junqueira & Carneiro, 1995), limitando um espaço localizado estrategicamente entre o sangue e os tecidos (Junqueira & Carneiro, 2011). Além de servir como uma barreira física, as CE equilibram a liberação de vários fatores vasodilatadores ou vasoconstritores tais como óxido nítrico, prostaciclina e endotelina (Moncada *et al.*, 2006; Davidson *et al.*, 2010).

As CE se apoiam sobre uma lâmina basal a qual é composta por colágeno tipo IV, proteoglicanas e as glicoproteínas laminina e entactina. Além de papel estrutural, a lâmina basal realiza, entre suas funções, a regulação da proliferação e diferenciação celular, influencia na polaridade e metabolismo celular, transdução de sinais e suporte para a migração celular (Junqueira & Carneiro, 2001). Lateralmente, a aderência célula-célula é realizada por meio de zônulas de oclusão e adesão (Bazzoni & Dejana, 2004) que atuam como uma barreira seletiva ao egresso de moléculas da circulação (Gutstein *et al.*, 2003; Galley & Webster, 2004), contribuindo assim para polaridade celular que controla o tráfego de nutrientes e a manutenção do fluxo sanguíneo (Aird, 2004).

As CE desempenham um importante papel durante infecções (Torres-Estay *et al.*, 2016). Está entre as primeiras células do corpo que mantêm contato com patógenos invasores, logo este tecido possui mecanismos de reconhecimento celular que iniciam a expressão de mediadores inflamatórios (Peters *et al.*, 2002). A inflamação é um mecanismo vital de defesa do organismo caracterizado pela resposta dos tecidos à presença de micro-organismos ou injúria. A lesão tecidual causada por bactérias, traumas, agentes químicos, calor ou qualquer outro fenômeno, determina a liberação de diversas substâncias que produzem alterações secundárias acentuadas nos tecidos lesionados (Gluck *et al.*, 2001; Resche-Rigon *et al.*, 2006).

Um dos primeiros eventos de resposta endotelial aos estímulos inflamatórios é a expressão de moléculas de adesão como a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adesão celular vascular (VCAM), E-selectina e P-selectina que regulam a entrada dos leucócitos para os tecidos afetados, sendo as duas primeiras minimamente expressas na superfície das CE quiescentes, apresentando um aumento na expressão após ativação com citocinas ou com lipopolissacarídeo (LPS) (Galley & Webster, 2004; Caposio *et al.*, 2007; Roh *et al.*, 2011). As CE produzem citocinas como fator de crescimento tumoral-beta (TGF-beta), interferon-gama (IFN-gama), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), fator estimulador de colônia (CSF), fator de necrose tumoral (TNF-alfa) (Briones *et al.*, 2001).

A transmigração aumentada de monócitos sanguíneos circulantes através do endotélio vascular é considerada uma contribuição importante na patogênese de doenças inflamatórias, como a sepse (Mattila *et al.*, 1998; Semeraro *et al.*, 2012). Este processo de inflamação vascular requer adesão de leucócitos e migração através do endotélio. Foi demonstrado em monócitos U937 (Charruyer *et al.*, 2005) que microdomínios lipídicos são importantes para a transdução de sinais inflamatórios (Navarrete *et al.*, 2000; Bouillon *et al.*, 2003) e influenciam as funções da membrana concentrando moléculas de sinalização nessas regiões da superfície celular. Proteínas concentradas nessas regiões estão envolvidas no tráfego vesicular (formação e fissão/fusão), bem como na sinalização através de receptores de tirosina quinases, proteína G e regulação de enzimas como adenilato ciclase (AC) e óxido nítrico sintase (NOS) (Sowa, 2012).

A interação entre patógenos e a superfície celular é mediada por numerosas interações de receptores e ligantes, tais como glicoproteínas expostas na superfície de ambos (Araujo-Jorge, 1989; Souza, 2005).

O endotélio vascular contribui consideravelmente para o processo inflamatório, e a magnitude da resposta inflamatória é crucial ao organismo. Assim como a insuficiência nesta resposta (ou imunodeficiência) pode levar à infecção generalizada, a resposta excessiva pode causar prejuízo ao organismo. O equilíbrio homeostático é restabelecido por uma resposta altamente conservada de contra-resposta à inflamação, o processo antiinflamatório (Tizard, 2002; Tracey, 2002; Fallavena *et al.*, 2009).

A célula endotelial da veia umbilical humana (HUVEC) é o modelo celular freqüentemente utilizado para o estudo do papel do endotélio em diversos eventos, por ser de obtenção e manutenção viáveis (Valbuena & Walker, 2006). O modelo de extração e cultivo das HUVEC encontra-se amplamente padronizado em nosso laboratório, de acordo com a técnica descrita por Jaffe e colaboradores (1973).

### **Microdomínios lipídicos - ML**

A composição físico-química e heterogeneidade são características onipresentes das membranas celulares e a presença de regiões denominadas microdomínios lipídicos (ML) enriquecidos em esfingolipídios, glicolipídios, gangliosídeos e esteróis (como o colesterol) tornam essas características ainda mais proeminentes nas membranas plasmáticas

eucarióticas; no entanto, sua natureza exata (tamanho, composição, homogeneidade) em células vivas continua difícil de definir (Cheng *et al.*, 2008; Brian *et al.*, 2014; Sezgin *et al.*, 2015).

A literatura evidencia a presença de regiões na membrana plasmática que apresentavam uma composição distinta (Simons & van Meer, 1988; Simons & Ikonen, 1997): microdomínios enriquecidos em glicoesfingolipídios e colesterol que influenciam profundamente a estrutura e função da membrana (Lingwood & Simons, 2010; Honigsmann & Pralle, 2016) diminuindo sensivelmente a fluidez destas regiões (Sowa *et al.*, 2001; Prinetti *et al.*, 2009). Estudos demonstraram que os ML, correspondiam a uma separação de fase temporária (fase ordenada) na bicamada lipídica fluída (Simons & Ehehalt, 2002; Pike, 2006). Dessa forma, a presença de microdomínios líquidos ordenados nas células transformou o modelo do mosaico fluído em um sistema mais complexo. Os ML formam distintas fases líquidas ordenadas na bicamada lipídica, inseridas em uma matriz líquida desordenada de lipídios insaturados (Schroeder *et al.*, 1994).

Embora não apresentem a composição estrutural totalmente definida, biologicamente essas regiões constituem a base para gerar microdomínios funcionais e especializados que compartimentalizam processos associados à superfície celular. Funcionam como plataformas dinâmicas, exercendo importante papel no tráfego, sinalização e polarização nas membranas celulares (Rajendran & Simons, 2005; Lingwood *et al.*, 2010; Brown, 2002; Gupta & Surolia, 2010; Levental & Veatch, 2016).

Regiões de ML são representadas por áreas de pequeno diâmetro (de 10 a 200 nm) nas membranas eucarióticas, caracterizadas por uma composição química e propriedades físicas únicas (Simons & Ikonen, 1997; Pike, 2006). Ainda que grande parte das proteínas membranares encontram-se dispersas, várias proteínas associadas à membrana plasmática estão especificamente nas regiões de microdomínios atuando como importantes moduladores da estabilidade, estrutura e função dos ML (Sangiorgio *et al.*, 2004; Bauer & Pelkmans, 2006).

Algumas modificações e propriedades das proteínas aumentam sua propensão a associar-se aos microdomínios lipídicos. Verificou-se que a acilação múltipla aumenta a afinidade das proteínas para a fase líquida ordenada da membrana. Por exemplo, as tirosina-cinases da família Src são duplamente aciladas e associadas aos ML (Sargiocomo *et al.*, 1993; Fra *et al.*, 1994; Miester & Tikkanen, 2014). A palmitoilação, um processo reversível que ocorre em resíduos Cys, foi sugerida como reguladora para recrutar ou excluir proteínas de ML (Levental *et al.*, 2010). Em resumo, as proteínas mais exemplificadas são as proteínas

ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Chatterjee & Mayor, 2001), cinases da família Src (Lck, Fyn e Lyn) que são ancoradas na monocamada externa (Simons & Toomre, 2000), proteínas aciladas como flotilinas (Rajendran *et al.*, 2003) e proteínas associadas ao colesterol, como as caveolinas (Kurzchalia&Parton, 1999). Entre as proteínas residentes dos microdomínios será dado destaque às caveolinas e flotilinas e ao gangliosídeo GM1 que são co-expressos em diversos tipos celulares de mamíferos e, portanto, convencionalmente utilizados como biomarcadores.

A partir deste processo de agregação dos diferentes lipídios e proteínas que os constitui, o papel mais importante dos ML seria a sua função na transdução de sinal (Simons & Toomre 2000, Suzuki, 2015), além da mediação de processos biológicos de extrema importância como a apoptose, adesão/migração celular, organização do citoesqueleto, bem como eventos de endocitose e exocitose (Simons & Toomre, 2000; Harris & Siu, 2002; Prag *et al.*, 2007). Esses últimos eventos, em especial, são também utilizados para a invasão e propagação de patógenos virais (Bavari *et al.*, 2002), bacterianos (Fivaz *et al.*, 2000) e parasitas (Denny& Smith, 2004; Goldston *et al.*, 2012).

A invasividade de muitos patógenos microbianos envolve a exploração dos ML com ativação de moléculas sinalizadoras, dentre elas, a fosfatidilinositol3'-cinase (PI3K), uma cinase lipídica encontrada nas regiões dos microdomínios que são ativadas na célula hospedeira após invasão bacteriana (Peres *et al.*, 2003). A via de sinalização PI3K/Akt é uma das mais comumente ativadas em diversos processos infecciosos (Yap, *et al.* 2008). A fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) é um padrão de sinalização fundamental para regulação da proliferação, sobrevivência, migração e metabolismo celular (Cantley, 2002; John *et al.*, 2009). A proteína quinase B (AKT), por sua vez é uma molécula sinalizadora conhecida por aumentar a proliferação e a sobrevivência celular, bem como a síntese de glicogênio e proteína (Blume-Jensen & Hunter, 2001). A via PI3K/AKT pode ser ativada por diferentes mecanismos e os fosfolipídios assim gerados regulam, direta ou indiretamente, a atividade das proteínas alvo, tais como AKT (Bottcher & Niehrs, 2005; Chaves *et al.*, 2011). A enzima PI3K é uma quinase de lipídio altamente conservada que fosforila o grupamento 3-hidroxila do anel inositol para gerar lipídios PtdIns (3,4,5)P<sub>3</sub>. Os lipídios formados servem como sítio de ancoragem para proteínas intracelulares, permitindo sua interação em complexos sinalizadores que transmitem sinais da membrana plasmática para o citosol (Wymann *et al.*, 2003). O protótipo dessas moléculas é a Akt. Tal proteína tem um domínio PH que a direciona para a membrana plasmática quando a PI3K é ativada. Essa reação leva à ativação

de várias vias de sinalização intracelulares que regulam funções celulares diversas como crescimento, sobrevivência e proliferação celular (Engelman *et al.*, 2006; Chaves *et al.*, 2011). A ativação de PI3K e Akt está relacionada com a via de sinalização de receptores de tirosina quinase, receptores acoplados a proteína G, receptores de citocinas e integrinas (Zachary *et al.*, 2001; Serban, *et al.* 2008).

A composição dos ML é bem descrita em sua monocamada externa (Parton & Richards, 2003; Sezgin *et al.*, 2015). Estudos recentes sugerem que a monocamada interna tenha uma organização equivalente à externa, sendo, portanto, rica em fosfolipídios com ácidos graxos saturados e colesterol. A indeterminação persistente até o momento de propriedades fundamentais dos ML é em grande parte resultado da dificuldade metodológica e tecnológica da observação destes microdomínios em células vivas (Lingwood & Simons, 2007; Sezgin *et al.*, 2015). Interações entre ML e componentes citoesqueleto (actina, tubulina, vinculina, filamina entre outras) podem contribuir para a organização e montagem dos microdomínios e também na dinâmica do citoesqueleto (Head *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2011). A associação entre componentes do citoesqueleto e ML já foram descritas anteriormente (Viola & Gupta, 2007; Simons & Gerl *et al.*, 2010) e evidenciam que esta ligação sirva para comunicação com a matriz extracelular (MEC) através de integrinas, caderinas, ocludinas e outras moléculas de adesão celular (CAMs). Além disso, diferentes ML podem se agrupar, sendo este agrupamento dependente de colesterol, esfingolipídios e actina ativa (Goswami *et al.*, 2008; Gowrishankar *et al.*, 2012).

Dependendo da distribuição bioquímica, os microdomínios podem receber diversas nomenclaturas, tais como: membranas enriquecidas de colesterol (*cholesterol-enriched membranes*, ou CEMs), membranas enriquecidas de glicosfingolipídios (*glycosphingolipid-enriched membranes*, ou GEMs), membranas enriquecidas de glicosfingolipídios insolúveis a detergente (*detergent insoluble, glycosphingo lipid-enriched membranes*, ou DIGs) e membranas resistentes a detergentes (*detergent-resistant membranes*, ou DRMs). Sendo os dois últimos termos relacionados à observação de que essas regiões não são solubilizadas por detergentes não iônicos (Pike, 2004). A análise desses microdomínios a partir dessa metodologia tem demonstrado uma similaridade na sua composição entre diferentes tipos celulares, onde a composição abrange lipídios como o colesterol (de 35-50% do total dos ML; esfingomiéline (de 10-15%); glicosfingolipídios, como o gangliosídeo GM1 (de 10-20%); glicerofosfolipídeos incluindo os maiores fosfolipídios da membrana, fosfatidicolina e fosfatidiletanolamina (menos de 30%) (Pike, 2004).

Existem dois tipos principais de ML: o que contém colesterol ligado à proteína caveolina (Cav), constituindo estruturas morfológicamente distintas - as cavéolas, detectáveis na microscopia eletrônica e o que não apresentam esta proteína, os microdomínios planares que carecem de Cav e não são identificáveis pela microscopia (Anderson, 1998; Head & Insel, 2007; Head *et al.*, 2014).

### **Cavéola e Caveolina**

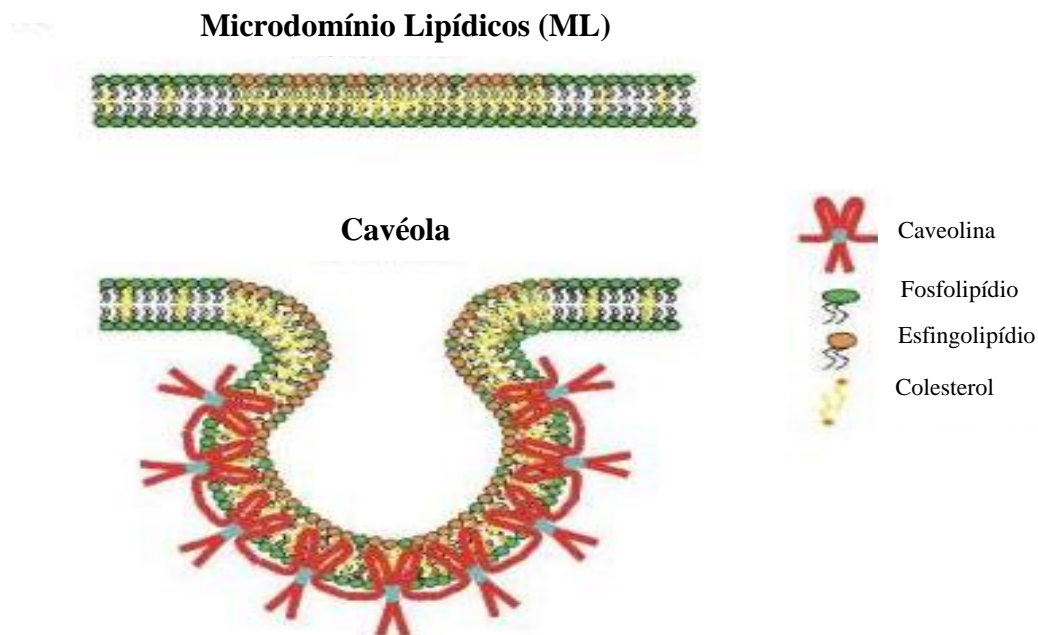
A primeira pesquisa sobre cavéola foi realizada por Yamada e Palade em 1955. A palavra cavéola que significa "pequena caverna" é usada para descrever a invaginação da membrana observada em células epiteliais (Kiss *et al.*, 2002). Em 1992, uma proteína de 22-24 kDa chamada VIP21 foi clonada e identificada (Parton, 1996). VIP21 pode formar a estrutura caveolar quando associada a determinados lipídios, assim, VIP21 foi denominada caveolina (Sargiocomo *et al.*, 1995). Para que se tenha a existência da cavéola é indispensável à coexistência de glicolipídios, esfingolipídios, colesterol e a caveolina na formação do microdomínio (Parton, 1996; Harder & Simons, 1997).

A família caveolina consiste de três membros: caveolina-1, caveolina-2 e caveolina-3 (Okamoto *et al.*, 1998). A composição das cavéolas varia imensamente durante sua existência e ao longo do ciclo de vida da célula devido às moléculas que se movem para o interior e/ou exterior em razão do intenso trânsito caveolar. As cavéolas representam uma das maiores subclasses dos microdomínios, tendo sua estrutura identificável morfológicamente (Kurzchalia & Parton, 1999) por microscopia eletrônica como pequenas invaginações da membrana plasmática da célula de 50 a 100 nm de diâmetro, não revestidas por moléculas de clatrina (Yamada, 1955; Anderson, 1998; Shin & Abraham, 2001).

A molécula de colesterol tem grande importância na formação das cavéolas, pois a caveolina, interage com a membrana plasmática através de uma ligação entre seu N-terminal e o anel de esterol do colesterol, interação essa que possibilita a sua inserção na membrana (Simons & Ikonen, 1997; Anderson, 1998). Além da dependência de colesterol para a manutenção da estrutura caveolar, dados da literatura têm demonstrado que as cavéolas também são cruciais para o funcionamento da maquinaria de transporte do colesterol, uma vez que participam de eventos relacionados ao influxo e efluxo deste lipídio (Fielding & Fielding, 1997). Além do colesterol, a caveolina pode se ligar diretamente a glicoesfingolipídios e a moléculas sinalizadoras modificadas por lipídios (Li *et al.*, 1995; Murata *et al.*, 1995). Quando ligada ao colesterol, a caveolina passa a se apresentar em forma de grampo (*hairpin*

*loop*), estrutura típica dos microdomínios caveolares, o que os tornam propícios aos eventos de endocitose (Scherer *et al.*, 1996).

Figura 1- Esquema representativo da estrutura dos microdomínios lipídicos na membrana plasmática



Fonte : Adaptada a partir de Razani *et al.*, 2002.

Codificada por três genes diferentes, a família da caveolina é representada por três isoformas (Couet *et al.*, 1997; Razani *et al.*, 2002). Todas as isoformas são integrais, porém, não atravessam a membrana plasmática. Tanto a região carboxi, quanto a região amino terminal ficam voltadas para o lado citosólico. Embora mostrem semelhanças em estrutura e função, todas as caveolinas diferem em propriedades específicas e na distribuição nos tecidos (Way & Parton, 1995; Scherer *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1996).

A caveolina-1 ou Cav1 (22 kDa), também conhecida como VIP21 (*vesicular integral membrane protein*) foi a primeira isoforma a ser descoberta e ter sua estrutura extensivamente caracterizada (Parton, 1996). A Cav1 é o principal componente das vesículas, derivadas da rede trans-Golgi (Kurzchalia *et al.*, 1992). Cav1 participa de uma grande variedade de vias de sinalização ao ser fosforilada em resíduos de tirosina por membros da família Src de cinases (Corley *et al.*, 2001). Além disso, a Cav1 apresenta um domínio citosólico em forma de alfa hélice rico em aminoácidos aromáticos denominado de *caveolin-scaffolding domain* que é



crucial para as interações com uma grande diversidade de moléculas, dentre elas, proteínas sinalizadoras, proteínas do citoesqueleto e proteínas de junção celular (Razani, 2002; Williams & Lisanti, 2004). Estas observações sugerem que Cav1 é uma proteína indispensável tanto para a estrutura como para a função caveolar (Fujimoto *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2015). A Cav1 foi dividida em dois subtipos:  $\alpha$  e  $\beta$ , distribuída amplamente em diversos tipos celulares como músculo liso e esqueléticas, fibroblastos, células alveolares de tipo I e células de gordura (Liu *et al.*, 2002). Cav1 também é expressa no cérebro e neurônios da medula espinhal e células gliais (Virgintino *et al.*, 2002).

A caveolina-2 (Cav2) e a caveolina-3 (Cav3) foram identificadas em 1996 usando diferentes métodos experimentais. A Cav2 foi descoberta pelo micro sequenciamento de uma proteína de 18-20 kDa que foi purificada de membranas caveolares derivadas de adipócitos (Scherer *et al.*, 1996). Outras caracterizações revelaram que a Cav2 colocaliza com a Cav1, formando hetero-oligômeros em cavéola e exige a presença da Cav1 para a correta localização na membrana. Embora ocorra a co-localização de Cav2 e Cav1, a expressão das isoformas são reguladas de forma independente. Além disso, algumas pesquisas apontam que a alteração da expressão de Cav2 induz a diferentes quadros clínicos (Hongli *et al.*, 2016).

Em 1996, Tang e colaboradores identificaram pela primeira vez o terceiro membro da família das caveolina, a Caveolina-3 (Cav3), também conhecida como M-caveolina. Uma proteína de 17 kDa expressa principalmente no tecido muscular esquelético e no miocárdio, demonstrando seu papel especial na células musculares (Ockleford *et al.*, 2002; Hongli *et al.*, 2016). Composta de 151 aminoácidos, seu domínio transmembrana consiste de 33 aminoácidos localizados no centro (Kim *et al.*, 2014). As porções N e C terminais são livres no citoplasma (Schmitz *et al.*, 2011). Geralmente, as três moléculas de caveolina exibem a mesma estrutura hidrofílica, mas Cav1 e Cav3 apresentam maior homologia, isto é, as suas sequências de aminoácidos se sobrepõe em cerca de 85% (Hongli *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, foi atribuído a caveolina um papel importante em funções fisiológicas celulares (transporte de colesterol, sinalização, endocitose) e na estrutura caveolar (Schubert *et al.*, 2004). Em estudos subsequentes, os pesquisadores perceberam que esta molécula não era apenas uma proteína importante para mediar à formação de cavéolas, mas sim a proteína chave dessa estrutura. No entanto, algumas células, tais como os neurônios e linfócitos, expressaram Cav, porém não apresentavam cavéolas (Head & Insel, 2007; Stem & Mermelstein, 2010). Evidências demonstraram que a formação caveolar parece depender ainda de uma proteína denominada Cavin (Liu & Pilch, 2008), uma proteína periférica da membrana que se liga à fosfatidilserina dentro das cavéolas. Existem quatro isoformas de

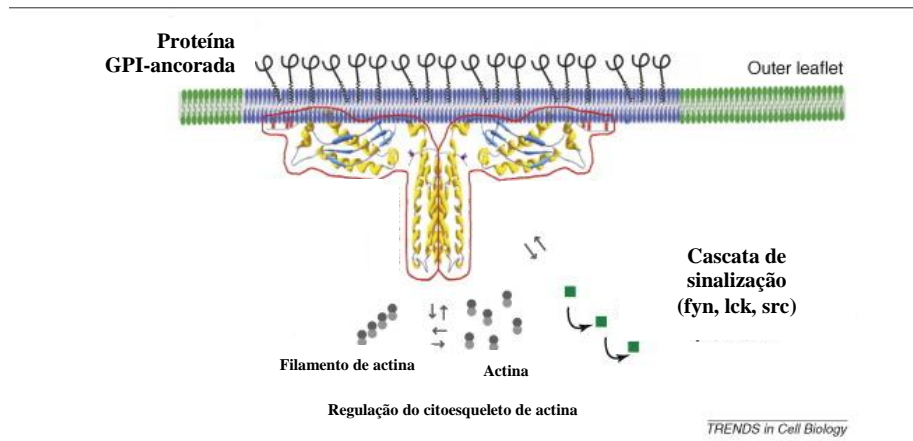
Cavin: Cavin-1, Cavin-2, Cavin-3 e Cavin-4 (Aboulaich *et al.*, 2004). Cavin e Cav existem em uma proporção estequiométrica 1:1 nas cavéolas (Chadda & Mayor, 2008). Cavin parece ser essencial para a formação da invaginação caveolar (Head *et al.*, 2013).

## **Flotilinas**

Uma segunda família de proteínas, a família da flotilina (Flot), também apresenta um papel estrutural na formação dos ML, colaborando com a estabilização destes microdomínios (Rivera-Milla *et al.*, 2006). Duas isoformas da flotilina têm sido caracterizadas: a flotilina-1 (45 kDa) e a flotilina-2 (42 kDa) também conhecidas como Reggie-2 e Reggie-1, respectivamente, devido ao seu envolvimento na regeneração axônica (Bickel *et al.*, 1997; Volonte *et al.*, 1999; Munderloh *et al.*, 2009; Meister & Tikkanen, 2014). A presença da flotilina foi detectada num amplo espectro de vertebrados, são codificadas por dois genes altamente conservados entre espécies (98% de identidade entre as sequências de aminoácidos de flotilina-1 de rato e humano). Em mamíferos, as flotilinas são expressas no sistema nervoso, músculo e tecido adiposo (Bickel *et al.*, 1997; Volonte *et al.*, 1999). Foram originalmente descobertas como proteínas neuronais nas células ganglionares da retina durante regeneração após lesão (Schulte *et al.*, 1997; Lang *et al.*, 1998). As flotilinas são proteínas pertencentes à superfamília SPFH (*Stomatins, Prohibitins, Flotillins, HflK/C*), sendo altamente conservadas evolutivamente e com propensão à oligomerização (Babuke & Tikkanen, 2007; Browman *et al.*, 2007; Solis *et al.*, 2007). Estas proteínas encontram-se associadas à monocamada interna da membrana celular, na qual se ancora por meio de acetilação (Langhorst *et al.*, 2005). A interação entre a flotilina e a monocamada interna ocorre em diferentes pontos hidrofóbicos de sua estrutura alongada, o que colabora para a referida estabilização dos ML mediada por esta proteína.

Sabe-se que caveolinas e flotilinas podem interagir através de hetero-oligomerização *in vitro* (Lisanti *et al.*, 1993; Scherer *et al.*, 1997; Volonte *et al.*, 1999), o mecanismo pelo qual estas proteínas facilitam a formação de vesículas ainda não foi caracterizado. A flotilina-1 foi implicada na organização caveolar juntamente com caveolina (Bickel *et al.*, 1997; Volonte *et al.*, 1999). Originalmente, foi proposto que a flotilina estava associada à cavéola, porém, com o decorrer do tempo, estudos demonstraram claramente que flotilinas participam da formação dos microdomínios não caveolares (Bickel *et al.*, 1997; Volonte *et al.*, 1999).

Figura 2- Esquema representativo da estrutura de microdomínio lipídico linear



Fonte: Adaptada de Stuermer, 2010.

Atualmente, a flotilina é comumente utilizada como proteína marcadora de ML lineares (Glebov *et al.*, 2006; Fernow *et al.*, 2007; Meiestter & Tikkanen, 2014). Os dois tipos de flotilina podem valer-se de diferentes mecanismos de acetilações para seu ancoramento na membrana, sendo a flotilina-1 ancorada por palmitoilização e a flotilina-2 por miristoilização, além de palmitoilização (Li *et al.*, 2012). Devido à sua capacidade de heteroligomerização, cumprem a maior parte das suas funções celulares de uma forma mutuamente dependente nos ML (Bickel *et al.*, 1997). A distribuição celular das flotilinas é altamente diversificada e dinâmica, dependendo do tipo de célula (Browman *et al.*, 2007) e estímulos extracelulares (Neumann-Giesen *et al.*, 2007; Langhorst *et al.*, 2008; Riento *et al.*, 2009). Estão presentes na membrana plasmática, onde se acumulam nas regiões de contato célula-célula e nas projeções de membrana, como lamelipódios (Browman *et al.*, 2007; Guillaume *et al.*, 2013). Os mecanismos que regulam a distribuição dinâmica da flotilina na membrana plasmática ainda são pouco compreendidos. Flotilina 1 e flotilina 2 co-existem para formar os ML lineares e induzem a formação de vesículas intracelulares e invaginações da membrana plasmática, que são distintas de cavéolas e de vesículas revestidas por Clatrina (Lang *et al.*, 1998; Glebov *et al.*, 2006; Frick *et al.*, 2007). Essa observação levanta a hipótese de que a flotilina pode definir uma nova via de endocitose independente (Otto & Nichols, 2011).

Por fim, as flotilinas também se ligam ao colesterol, interagem com moléculas sinalizadoras através de proteínas ancoradas por GPI (Anderson, 1998), regulam a reorganização do citoesqueleto de actina e atuam na adesão e migração celular (Vassilieva *et al.*, 2009). Outros estudos, porém, têm implicado a flotilina-2 na formação de filopódios em células neuronais (Lang *et al.*, 1998; Hazarika *et al.*, 1999).

A forma planar de ML varia de 1-1000 nm de diâmetro, enriquecida em proteínas GPI-ancoradas e em flotillinas. Em contraste, o diâmetro caveolar tem em torno de 70-120 nm (revisto por Head *et al.*, 2013).

### **Gangliosídeo GM1**

O monossialogangliosídeo (GM1) é um esfingolípido presente na monocamada externa da membrana plasmática e enriquecido em ML (Peterson, 2005). É composto por ceramida ligada a uma cadeia de oligossacarídeos (Yu *et al.*, 1988; Yutaka *et al.*, 2016 ). Os números 1, 2 e 3 (por exemplo, GM1, GM2 ou GM3) denotam a migração dos gangliosídeos por cromatografia em camada fina (revisto por Head *et al.*, 2015). A presença de ácido siálico distingue os gangliosídeos dos glicosfingolípídeos. Os gangliosídeos são expressos principalmente, mas não exclusivamente, na face externa da membrana plasmática das células de todos os vertebrados (Yu *et al.*, 1988; Yutaka *et al.*, 2016 ). O GM-1 pode atuar como fator de sobrevivência, além de atuar na estimulação de lipídios bioativos, como SIP (Cavalline *et al.*, 1999; Jin *et al.*, 2002). Este gangliosídeo é parte integrante do maquinário responsável pela endocitose da toxina da cólera (CT).

A CT é uma toxina solúvel liberada pela bactéria *Vibrio cholera*, e formada por uma subunidade A (CTA) (catalítica) e 5 subunidades B (CTB) (Lonroth & Holmgren, 1973; Stratmann, 2015). CTA é responsável pela atividade tóxica e é composta por dois polipeptídeos, A<sub>1</sub> com 22 kDa e A<sub>2</sub> com 5 kDa. CTB representa a porção não tóxica, responsável pela ligação aos receptores celulares (gangliosídeo GM1) e consequente entrada na célula-alvo (Mekalanos *et al.*, 1983; revisto por Fantini *et al.*, 2002; Keegan *et al.*, 2015). A subunidade B se liga com alta afinidade ao gangliosídeo GM1, constitutivamente expresso na superfície de células eucarióticas, principalmente através da galactose terminal (Spangler, 1992; revisto por Fantini *et al.*, 2002; Lencer & Tsai, 2003). Devido à sua afinidade pelo

GM1, a toxina da cólera, vem sendo utilizado como ferramenta de identificação de ML que são enriquecidas neste gangliósídeo.

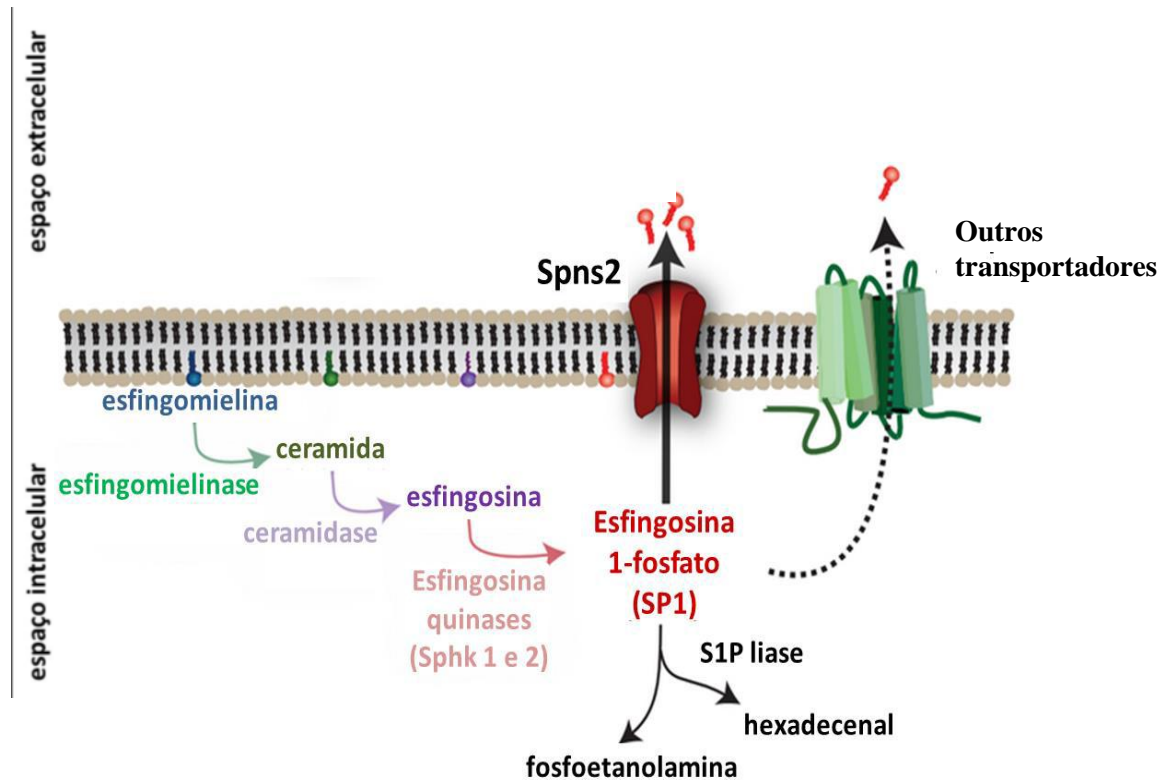
## **Lipídios Bioativos**

Os esfingolipídios eram tidos apenas como constituintes da membrana plasmática (MP), mas a cerca de três décadas passaram a serem considerados como importantes moléculas sinalizadoras presentes nos ML, capazes de modular lipases, cinases e fosfatases (Hawthorne, 1975; Cabral *et al.*, 2007; Coant *et al.*, 2016). Os esfingolipídios tendem a se associar mais firmemente uns aos outros que os fosfolipídios na membrana celular, modulando sua fluidez e formando, juntamente com o colesterol, a base das regiões de ML (revisado por Don *et al.*, 2014; Lemos, 2014).

Esfingolipídios bioativos podem ser gerados a partir de três diferentes vias, via síntese *de novo*, via esfingomielinase e via de degradação (Kitatani *et al.*, 2008). Na via da esfingomielinase, diferentes esfingomielinases e ceramidases catabolizam o metabolismo da esfingomielinina ou da ceramida em diferentes compartimentos celulares (Hannun & Obeid, 2008). Diversos estudos realizados nos últimos anos demonstraram o papel dos diferentes domínios de membrana, ML e as plataformas enriquecidas por Cer, nas respostas intracelulares adequadas ao processo de infecção por patógenos, tais como a indução de apoptose na célula infectada, mediação da proliferação celular, regulação da liberação de citocinas e fusão fagossomos/lisossomos (Riethmuller *et al.*, 2006). Porém, somente dois trabalhos na literatura relacionam o papel de ML em infecção relacionadas ao EGB até o momento.

A enzima ceramidase catalisa a desacetilação da ceramida, seja ela produzida pela via de síntese *de novo* ou via de degradação da esfingomielinina, levando à formação da esfingosina. A esfingosina pode ser reciclada para a síntese de novos esfingolipídios ou servir de substrato para fosforilação por esfingosina quinases (SPHK1 e 2) e formando esfingosina 1-fosfato (S1P) (Hannun & Obeid, 2011; Tirodkar & Voelkel-Johnson, 2012; Lemos, 2014; Coant *et al.*, 2016). A Figura 3 mostra um esquema reduzido da síntese de S1P.

Figura 3 - Representação esquemática da via de síntese de S1P



Fonte: Adaptada de Blaho & Hla (2014) e Lemos, 2014.

A S1P participa de mecanismos reguladores do ciclo celular, entre eles o crescimento, o efeito anti-apoptótico, a angiogênese, proliferação celular, remodelamento do citoesqueleto e liberação de citocinas através de receptores associados à proteína G (An *et al.*, 2000; Spiegel & Milstien, 2002; Eyster, 2007; Zhao *et al.*, 2009). A concentração intracelular de S1P é controlada pela ativação das enzimas envolvidas no seu metabolismo, como a esfingosina quinase e a esfingosina liase (Brinkmann, 2007). Já a concentração extracelular, parece ser mantida principalmente por plaquetas ativadas (Pappu *et al.*, 2007), além de células endoteliais e mastócitos (Brinkmann *et al.*, 2007).

A via de sinalização S1P está relacionada a diversas doenças e distúrbios diferentes, além do seu papel em diversos tipos de infecções, como aquelas causadas por vírus, bactérias e parasitas (Arish *et al.*, 2016; Tiper *et al.*, 2016). S1P é um regulador chave na função da microvasculatura endotelial (Wang *et al.*, 2015). Num quadro de sepse, já foi visto que pacientes, particularmente, aqueles com choque séptico, apresentaram diminuição das concentrações séricas de S1P e que altos níveis séricos deste lipídio bioativo podem excluir o

risco de choque séptico. As concentrações de S1P no soro estão associadas à gravidade da sepse (Winkler *et al.*, 2015). Estudo realizado por Garg e colaboradores (2004) demonstrou a mediação de S1P na atividade micobactericida através da ativação da fosfolipase D e maturação de fagolisossomos em células THP-1. Wang e colaboradores (2016) demonstraram papel fundamental de S1P na invasão de células HMEC por *Escherichia coli*, mediada pela esfingosina quinase 2 e do receptor S1P2/EDG5, visto que após bloqueio dos mesmos a invasão bacteriana não ocorreu. Não há estudos relacionados ao papel de S1P nas infecções ocasionadas por EGB.

A ativação de S1P1 leva à diminuição da concentração intracelular de AMP cíclico (AMPC), ao estímulo de MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), ao aumento da concentração intracelular de cálcio e à ativação da via de fosfatidilinositol 3 (PI3K)/Akt (proteína quinase 3), levando à ativação de eNOS (*endothelial nitric-oxide synthase*) ou à ativação de Rac, uma pequena GTPase da família Rho, através de um mecanismo exclusivamente acoplado à proteína Gi (revisado por Cuvillier, 2012; Lemos, 2014). Dessa forma, está classicamente associado à proliferação, sobrevivência e migração celulares (Lemos, 2014).

A maioria dos trabalhos relacionados ao papel dos esfingolípídeos nas respostas ao estresse celular tem se concentrado nas funções de sinalização de dois esfingolípídeos, ceramida e S1P. Numerosos estudos sobre invertebrados e vertebrados mostraram que os níveis de ceramida são aumentados por uma variedade de estresses celulares e quando os níveis de ceramidas aumentam, a célula pode iniciar o processo de apoptose ou de morte celular programada (Hannun e Obeid, 2008), enquanto o aumento na concentração de S1P geralmente promove sobrevivência e proliferação celular (Hait *et al.*, 2006, Hannun & Obeid, 2008). Assim, o balanço entre os níveis celulares destes dois lipídios interconvertíveis, é conhecido como *sphingolipid rheostat*. (Cuvillier *et al.*, 1996, Hait *et al.*, 2006).

A ceramida, a ceramida 1- fosfato, a esfingosina, bem como a esfingosina 1-fosfato, atuam como segundo mensageiro, ativando a proteína quinase e os demais componentes da rota de sinalização intracelular. Esses lipídios podem agir intracelularmente, como segundo mensageiro, ou extracelularmente, ativando os receptores de S1P (S1P<sub>1-5</sub>/EDG) que estão dispostos na superfície da membrana celular em outros tecidos (Eyster, 2007; Zanin *et al.*, 2008; Nóbrega Jr *et al.*, 2014). S1P induz a ativação de PI3K através da ativação de S1P1/EDG1, S1P2/EDG5 e S1P3/EDG3 (Okamoto *et al.*, 2000).

Estudos demonstram que S1P desempenha um papel crítico na regulação da barreira vascular via S1P1, ligando e recrutando componentes para ML em células endoteliais da

artéria pulmonar humana (Singleton *et al.*, 2005; Garcia *et al.*, 2001), Porém, a desestabilização da fase líquida ordenada, através da remoção do colesterol pela ação da metil- $\beta$ -ciclodextrina (MBCD), inibe esse aumento da barreira vascular induzida por S1P (Singleton *et al.*, 2005).

### **Desorganização dos Microdomínios Lipídicos: depleção de colesterol**

O colesterol é o principal constituinte lipídico da membrana plasmática e essencial para a formação dos diversos microdomínios (Mahammad & Parmryd, 2015). A depleção de colesterol é amplamente utilizada para estudar processos celulares e pode ser realizada ao longo de dias usando inibidores de sua síntese ou ao longo de minutos (min) usando reagentes químicos. Uma das formas de desfazer/desorganizar os microdomínios lipídicos de membrana é através do uso da metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD). As ciclodextrinas (CD) são oligossacáridos cíclicos que têm sido amplamente investigados como solubilizantes para fármacos pouco solúveis (Connors, 1997; Loftsson & Brewster, 2010).

O tipo de CD mais estudado é a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD), moléculas cíclicas compostas por sete unidades de unidades de glicose, que pode formar complexos solúveis em água com pequenas moléculas e partes de grandes compostos (Pitha *et al.*, 1988; Mahammad & Parmryd, 2015). Os derivados  $\beta$ CD de interesse farmacêutico incluem hidroxipropil-p-ciclodextrina (HP $\beta$ CD), metil-p-ciclodextrina (M $\beta$ CD) e outros como o sulfobutil éter-p-ciclodextrina (SBE $\beta$ CD) apenas para citar os mais utilizados (Loftsson & Brewster, 2010, 2012). A M $\beta$ CD é considerada como principal agente depletor de colesterol (Muhammad & Pyramid, 2015). Diferentemente de outros agentes de ligação ao colesterol que se incorporam em membranas, as ciclodextrinas agem estritamente na superfície extraíndo seletiva e rapidamente o colesterol de membrana pela inclusão desta molécula em sua cavidade central hidrofóbica (Zidovetzki & Levitan, 2007). O grau de depleção do colesterol na célula é dependente da concentração da droga, tempo de incubação, temperatura e do tipo celular utilizado no estudo. Essa droga age depletando o colesterol da membrana plasmática e assim desestruturando formações de ML do tipo caveolar ou não e, conseqüentemente, bloqueando processos biológicos dependentes dessas regiões, o que constitui uma importante ferramenta bioquímica para o estudo de funcionalidade desses microdomínios lipídicos (Ilangumaran & Hoessli, 1998).



## Interação EGB/célula hospedeira

A interação de patógenos com células eucarióticas é um processo altamente dinâmico e adaptado pela evolução, sendo este o primeiro passo para o estabelecimento de infecções bacterianas (Molinari & Chhatwal, 1999). O sucesso de infecções por patógenos requer um processo multifatorial que tem início com a adesão às células hospedeiras, colonização dos tecidos, invasão, multiplicação, persistência intracelular e, como resultado final de todo esse processo, a disseminação para outros tecidos (Sakarya & Oncu, 2003; Pizzaro-Cerda & Cossart, 2006).

Frequentemente, a bactéria usa a aderência e a invasão de células susceptíveis não apenas para colonização, mas também para evasão da defesa imune, garantindo assim a sua sobrevivência (Roy & van der Goot, 2003). As bactérias patogênicas utilizam de diversas estratégias para invadir e colonizar células de mamíferos e assim causar doenças como, por exemplo, a meningite. Além do EGB, podemos citar diversos microrganismos, entre eles a *Escherichia coli* (*E. coli*). Estudos revelaram que a interação inicial deste patógeno com a célula do hospedeiro induz uma modificação no citoesqueleto de actina, auxiliando na invasão celular. Esta modificação se dá através da alta fosforilação de proteínas como, por exemplo, a quinase de adesão focal (FAK) e uma subunidade reguladora de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), p85 (Sukumaran, *et al.* 2002). Além disso, foi observado que a PKC é necessária para a invasão de *E. coli* em células endoteliais de microvasculatura de cérebro humano (HBMEC), a qual regula diversos processos celulares como, por exemplo, crescimento celular, proliferação, permeabilidade e apoptose (Sukumaran, *et al.* 2002).

Muitos trabalhos reportam a necessidade dos microfilamentos de actina para a invasão do EGB a célula hospedeira, já que este processo é interrompido quando ocorre intervenção da citocalasina D, um inibidor da polimerização de actina (Ruben, 1992; Gibson *et al.* 1993; Valentin-Weigand *et al.* 1996, 1997; Nizet *et al.* 1997). Em um experimento semelhante, nosso grupo já reportou um aumento na citoaderência de amostras de EGB pertencentes ao sorotipo III a HUVEC (25% para a amostra 90356, retirada de líquido de recém-nascido e, 75% para a amostra 90186, coletada de sangue) (Santos *et al.* 2009).

Muitos são os fatores de virulência que contribuem para a virulência do EGB, porém os mecanismos envolvidos no dano celular permanecem desconhecidos. A descoberta sobre a transdução de sinais que envolvem a patogênese do EGB é de extrema importância para o tratamento da sepse, por exemplo, causada por este microrganismo (Oliveira, 2015).

Diversos trabalhos demonstram a grande capacidade do EGB em aderir e invadir diversas células eucarióticas como macrófagos (murinos e humanos), neutrófilos, células epiteliais, endoteliais e fibroblastos, inclusive dados de nosso grupo (Gibson *et al.*, 1993; Tamura *et al.*, 1994; Albanyan & Edwards, 2000; Teixeira *et al.*, 2001; Tyrrel *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2003; Monteiro *et al.*, 2004; Lione *et al.*, 2005, Costa *et al.*, 2011). Adesinas produzidas pelo EGB tais como as proteínas FbsA, Lmb e ScpB se ligam, respectivamente, ao fibrinogênio, à laminina e à fibronectina, desempenhando importante papel na invasão epitelial e endotelial (Spellerberg *et al.*, 2000; Beckman *et al.*, 2002; Schubert *et al.*, 2002). Algumas moléculas como citoqueratina 8,  $\beta 1$  integrina e ICAM-1 (molécula de adesão intercelular 1) têm sido sugeridas como receptor para o EGB (Spellerberg *et al.*, 2000; Tamura & Nittayajarn, 2000; Beckman *et al.*, 2002; Gutekunst *et al.*, 2004; Lione *et al.*, 2005). Contudo, o mecanismo de interação celular do EGB com células eucarióticas permanece pouco conhecido.

O EGB também é capaz de realizar transcitose em monocamadas confluentes de células epiteliais de córion e células endoteliais de microvasculatura do cérebro humano (HBMEC). Esta habilidade pode promover o acesso do patógeno à placenta humana e à barreira hematoencefálica, constituindo um passo essencial para a corioamnionite e meningite (Nizet *et al.*, 1997; Winram *et al.*, 1998).

Outra habilidade relacionada ao EGB é a sobrevivência por prolongados períodos no interior de fagolisossomas de macrófagos e células endoteliais. Alguns ensaios demonstraram a sobrevivência de mais de 20h no interior de células endoteliais de microvasculatura cerebral (BMEC) e 24h em ECV304 (células endoteliais imortalizadas da veia umbilical humana) e HUVEC (células endoteliais da veia umbilical humana). Além disso, a sobrevivência de amostras pertencentes aos sorotipos Ia e III no interior de macrófagos foi observada por 24h e 48h, respectivamente (Nizet *et al.*, 1997; Cornacchione *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2003; Lione *et al.*, 2005).

Dados do nosso laboratório evidenciaram que amostras dos sorotipos III e V ativam a enzima NADPH-oxidase em vacúolos fagocíticos de macrófagos humanos, desencadeando o burst oxidativo (Teixeira *et al.*, 2001). Outros estudos demonstraram que o EGB se manteve viável dentro de vacúolos ácidos endoteliais, e estes adquiriram marcadores endossomais Rab7 e LAMP-1 (Lione *et al.*, 2010).

Muitos patógenos microbianos induzem a morte e/ou apoptose de células do hospedeiro (Haalas *et al.*, 2004). A capacidade desses patógenos de promoverem apoptose pode ser importante para o início da infecção bacteriana, sobrevivência e escape da resposta

imune do hospedeiro. Portanto, a apoptose pode ser uma estratégia vantajosa por evitar o desencadeamento e recrutamento de mecanismos de defesa não específicos (Cohen, 1993; Chen & Zychlinsky, 1994). Um trabalho recentemente publicado por nosso grupo investigou o papel de uma metaloprotease sensível a fosforamidon durante o processo de indução de apoptose em HUVEC infectadas com EGB. Neste trabalho observamos que o EGB foi capaz de induzir apoptose em HUVEC infectadas, regulando a expressão de Bcl-2 e aumentando a expressão de Bax (molécula pró-apoptótica), o que sugere o envolvimento da via intrínseca da apoptose. Além disso, também foi demonstrado que em HUVEC infectadas por EGB ocorreu a fragmentação de pró-caspase 3, a qual foi inibida após o tratamento com fosforamidon, inibindo assim a indução de apoptose nesta interação (Santos *et al.* 2013). Metaloproteases podem ser expressas em patógenos como fatores de virulência, já que podem causar danos diretos ao tecido durante uma infecção ou inativar moléculas endógenas que podem estar envolvidas na regulação da resposta do hospedeiro (Supuran *et al.* 2002). Dados obtidos em nosso laboratório sugerem que o EGB seja capaz de expressar componentes na sua superfície ou secretar moléculas, como as metaloproteases, que podem atuar no processo de indução de apoptose em células endoteliais (Santos *et al.* 2013).

Dados na literatura demonstram que a infecção por EGB é capaz de induzir morte celular por apoptose em células neuronais de camundongos, macrófagos murinos e humanos, microglia, trofoblastos, fibroblastos humanos (Leib *et al.*, 1996; Fettucciare *et al.*, 2000; Ulett *et al.*, 2003; Ulett *et al.*, 2005; Lehnardt *et al.*, 2006 e Kaplan *et al.*, 2008) e epitélio respiratório (Costa *et al.*, 2011).

A colonização do tecido pelo patógeno é mediada por adesinas da superfície bacteriana que interagem especificamente a uma grande variedade de receptores celulares, incluindo resíduos de açúcar como manose, lipídios como gangliosídeos ou proteínas como a fibronectina (Tamura *et al.*, 1994, Koneman *et al.*, 1997). Logo, regiões que concentram uma gama de receptores disponíveis como os ML podem ser alvos desse patógeno. A capacidade invasiva de muitos micro-organismos tem sido relacionada com a exploração desses ML (Rosenberger *et al.*, 2000; Manes *et al.*, 2003). Estudos realizados por Pier e colaboradores em 2004 demonstraram que os ML estão criticamente envolvidos na internalização de *P. aeruginosa*, bem como na indução do processo de apoptose após a infecção. Pouco se conhece sobre o envolvimento dos ML no processo de infecção ocasionado pelo EGB, somente dois trabalhos relatam o papel dos ML na patogenicidade desse micro-organismo em células *Ishikawa* (Goluszko *et al.*, 2008) e células dendríticas (Lemire *et al.*, 2012). Porém,

até o presente estudo não foram relatados a utilização dos ML durante a infecção do EGB em células endoteliais.

A interação entre bactéria e células hospedeiras invariavelmente resulta na ativação de vias de sinalização, e o resultado deste evento, depende principalmente da natureza da bactéria e da célula envolvida, sendo assim o estudo sobre ML e o envolvimento destas estruturas em importantes eventos celulares torna particular o interesse na sua caracterização em células como a HUVEC, bem como a relação desses microdomínios no processo de infecção pelo EGB, além da verificação da ocorrência de ativação de lipídios bioativos.

## 1 OBJETIVOS

O EGB é um importante patógeno responsável por diversas infecções invasivas, dentre elas a sepse e a meningite com alto índice de morbidade e mortalidade em neonatos e adultos. Poucos estudos relatam o papel dos Microdomínios Lipídicos na patogenicidade do EGB e seu papel na interação com a célula hospedeira. Sendo assim, o presente trabalho teve por principal objetivo descrever o papel dos microdomínios lipídicos na aderência e invasão deste patógeno com células endoteliais. Assim, temos como objetivos específicos:

- a) Analisar a influência da metil-beta-ciclo-dextrina (M $\beta$ CD), na aderência e viabilidade intracelular do EGB em células HUVEC;
- b) Analisar a ativação da via de sinalização PI3K/Akt durante a interação EGB-HUVEC;
- c) Verificar a presença o gangliosídeo GM1 e das proteínas Cav-1, Cav-2, Flot-1, Flot-2 na superfície de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC);
- d) Analisar a distribuição dos microdomínios lipídicos na membrana das HUVEC infectadas com EGB;
- e) Quantificar a produção de esfingosina-1 fosfato durante a interação do EGB com HUVEC.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Amostra bacteriana

Para a realização dos experimentos a amostra de EGB utilizada foi a 90356, pertencente ao sorotipo III, isolada de líquido de paciente. Esta amostra foi cedida pelo Dr. Leslie C. Benchetrit, Laboratório de Cocos Patogênicos, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro. A grupagem e a sorotipagem desta cepa foi realizada conforme descrito por Lancefield (1933).

As culturas bacterianas foram armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  em alíquotas de meio líquido “Brain Heart Infusion” (BHI; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) contendo 20% de glicerol. Para a realização dos experimentos, as bactérias foram crescidas em BHI e padronizadas para uma densidade ótica (D.O.) de 0.4 em comprimento de onda de 540 nm ( $\sim 1 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias por mililitro ([UFC/mL]).

A quantificação do número de UFC foi obtida após plaqueamento em meio sólido de ágar sangue contendo 5% de hemácias de carneiro (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) (Peotta *et al.*, 2001).

### 2.2 Cultura de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC)

Células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) foram extraídas e cultivadas de acordo com a técnica descrita por Jaffe *et al* (1973) com modificações. Cordões umbilicais foram adquiridos no Hospital Maternidade Carmela Dutra (CEP/Protocolo de pesquisa nº 74/10 – CAAE: 0086.0.314.325-10; Anexo I), até 24 horas (h) após o parto e mantidos em tampão fosfato salina 0,1 M (PBS) estéril + glicose 0,1 M, pH 6,5 (PBS-glicose), acrescido de penicilina 500 U/mL, estreptomicina 40 µg/mL (ambas Gibco, BRL, Grand Island, NY, EUA) e fungizona 2,5 µg/mL (Bristol Myers Squibb Brasil, SP, Brasil) até o momento da cultura.

As HUVEC foram obtidas da veia de cordões umbilicais humanos a partir do tratamento com 0,1% colagenase II (Sigma Cehm Co, St Louis, EUA) diluída em PBS-glicose com o cordão submerso por 10 min em salina 0,9% a  $37^{\circ}\text{C}$ . A reação foi paralisada com a

adição de meio 199 (M199 - Sigma Chem Co., St Louis, EUA) contendo 20% de soro fetal bovino (SFB - Cultilab, Campinas, Brasil), L-glutamina 2 mM, bicarbonato de sódio 0,026 mM, fugizona 2,5 µg/mL, penicilina 500 U/mL, estreptomicina 40 µg/mL (M199 suplementado). A suspensão resultante foi centrifugada (120 x g por 10 min.) e o sedimento contendo as células foi ressuspensão em M199 suplementado e semeado em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> previamente cobertas com gelatina 2% e mantido em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C até atingirem a confluência.

A partir das culturas primárias foram realizados subcultivos até no máximo a segunda passagem, onde as monocamadas confluentes de HUVEC foram lavadas duas vezes com PBS-glicose, tratadas com solução de 0,025% tripsina (Sigma Cehm Co, St Louis, EUA) feita em 0,025%, NaCl 0,14 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 9 mM, KCl 3 mM, vermelho de fenol 0,02% e ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) 0,02% até o descolamento das células. A reação foi paralisada com M199 suplementado, seguida de uma nova centrifugação (120 x g por 10 min) e a suspensão do sedimento celular feita em M199 suplementado para cultivo em garrafas 75 cm<sup>2</sup> ou placas de 24 poços cobertas com gelatina 2% para realização dos experimentos (Santos *et al.*, 2005).

### **2.3 Tratamento das HUVEC com Metil-β-ciclodextrina (MβCD) e/ou LY294002**

Monocamadas confluentes de HUVEC foram lavadas duas vezes com tampão PBS-glicose (tampão fosfato salina 0,1 M (PBS) estéril + glicose 0,1 M, pH 6,5) e tratadas com MβCD (Sigma-Aldrich- Merck) (2 mM/ml) por 1 h e/ou com LY294002 (Sigma) (5 µM) por 15 min para posterior infecção com amostra 90356-líquor.

### **2.4 Anticorpos e marcadores fluorescentes**

Os anticorpos primários utilizados foram anti caveolina-1 (anti-mouse; Invitrogen), anti caveolina-2 (anti-mouse; Invitrogen), anti flotilina-1 (anti-mouse; Invitrogen), anti flotilina-2 (anti-mouse; Invitrogen) e anti EGB (anti-coelho; AbCAM). Os marcadores secundários utilizados foram o Alexa 488 (anti-mouse; Invitrogen) e Alexa 546 (anti-coelho;

Invitrogen), além do marcador DAPI (4,6-Diamino-2-phenylindole dihydrochloride) (Molecular Probes). Também foi utilizado o marcador CTxB (subunidade B da Toxina do cólera) específico para a marcação do gangliosídeo GM1 (conjugado a FITC- Sigma).

## **2.5 Determinação da viabilidade celular por MTT**

A determinação da viabilidade celular pelo método do MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazólio brometo) foi realizada conforme descrito por Reilly e colaboradores em 1998. Segundo o princípio do método, as células viáveis e metabolicamente ativas reduzem o sal de tetrazólio, formando cristais de formazan solúveis em isopropanol. Monocamadas de HUVEC em placas de 24 orifícios ( $2 \times 10^5$  células por poço; Nunc) foram tratadas ou não com M $\beta$ CD nas concentrações de 2 mM- 5 mM em meio 199 durante 1, 2 ou 4 h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Para análise da viabilidade as células foram incubadas com MTT (1mg/mL) por 1 h a 37 °C. A seguir o excesso de MTT foi removido e adicionado isopropanol para lise celular e dissolução dos cristais de formazan e posteriormente adicionados 100  $\mu$ L da preparação por poço para leitura. A absorbância do extrato foi lida em 595 nm em leitor de placas de ELISA, utilizando-se o isopropanol como branco. A porcentagem de células vivas foi estimada de acordo com o seguinte cálculo: densidade óptica das células tratadas (com meio condicionado ou meio contendo bactérias)/células não tratadas (com M199 puro) x 100. A viabilidade de 100% foi determinada para as células cultivadas em meio de crescimento (Calvin Ho & Oliver, 1997; Reilly).

## **2.6 Ensaios de interação de EGB com HUVEC tratada ou não com M $\beta$ CD e/ou LY294002**

Monocamadas confluentes de HUVEC em placas de 24 orifícios ( $2 \times 10^5$  células por poço) foram lavadas duas vezes com tampão PBS-glicose antes dos ensaios de interação. Após as lavagens, as monocamadas foram tratadas ou não com MCD $\beta$  e/ou LY294002 de acordo com o item 2.3 e, posteriormente, infectadas com a amostra bacteriana ( $10^7$  UFC/mL) em meio 199 puro na proporção de 1 célula eucariótica para 100 células bacterianas (1:100).



A incubação foi realizada em diferentes intervalos de tempo (0, 0.5, 1, 2 e 4 h) a 37°C em ambiente de 5% de CO<sub>2</sub>. Após cada período de incubação foi realizada a lavagem das HUVEC infectadas com solução salina estéril 0,9% para remoção dos micro-organismos não aderidos.

Para análise do número total de bactérias interagidas (aderidas e internalizadas), as HUVEC foram lisadas com tampão de lise contendo Tris 25 mM pH 7,5, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM e Igepal 1% (Sigma Chem Co., St Louis, EUA). O lisado foi diluído em salina 0,9% e plaqueado em meio agar sangue para a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

Paralelamente, em outra série de poços, para a quantificação da invasão do EGB nas HUVEC, após lavagens com salina 0,9% foi feita administração de gentamicina (100 µg/mL) e penicilina (5 µg/mL) por 2 h a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> para eliminar as bactérias aderidas. Após esta etapa foi realizada a lavagem da monocamada com salina 0,9% e posterior lise da célula eucariótica com o mesmo tampão de lise descrito acima. O lisado foi diluído em solução salina e plaqueado em meio agar sangue para a obtenção do número de bactérias intracelulares viáveis (Peotta *et al.*, 2001).

A quantificação de EGB aderido foi realizada através da subtração do número total de bactérias interagidas pelo número de bactérias intracelulares viáveis (Santos *et al.*, 2003).

## 2.7 Microscopia de fluorescência

As células HUVEC ( $10^5$  células/poço) foram cultivadas sobre lamínulas de plástico Aclar 22 mm (Pro-Plastics Inc., USA) previamente revestida com colágeno tipo IV durante 24 h e infectadas com EGB ( $5 \times 10^7$ ). As células foram lavadas três vezes em PBS e fixadas em paraformaldeído a 4% (Sigma-Aldrich) em PBS durante 10 min em temperatura ambiente. Após as células foram permeabilizadas com Triton X 0,5% em PBS por 30 min. Solução semelhante foi utilizada nos demais passos de lavagem. As células foram incubadas com anticorpo primário (Cav-1 ou Cav-2 ou Flot-1 e anti EGB, nas condições de interação) por 1 h a 37°C. Após incubação, as células foram lavadas por 30 min com Triton-X100 0,5% em PBS e incubadas com anticorpos secundários (Alexa Fluor 488 e Alexa Fluor 546 nas condições de interação) por 1 h a 37°C. Após, as células foram lavadas com Triton X 0,5% em PBS por 30 min e uma vez com NaCl 0,9%. O núcleo foi marcado com DAPI (0,1 µg/ml em 0,9%

NaCl) por 5 min. As lâminas foram montadas em meio de montagem e visualizadas no microscópio ótico de fluorescência Axiovert 100 (Carl Zeiss, Germany), usando filtros seletivos para cada fluorocromos, as imagens foram capturadas com a câmera integrada C2400i (Hamamatsu, Photonics, Shizuoka, Japan) e processador de imagem Argus 20 (Hamamatsu) (Possidonio *et al.*, 2011). As lâminas também foram submetidas a visualização em Microscópio Confocal Leica TCS SP5 com AOBS, usando filtros seletivos para cada fluorocromos.

## 2.8 Dosagem de proteína

Garrafas confluentes de HUVEC (75 cm<sup>2</sup>) tratadas ou não com M $\beta$ CD e/ou LY de acordo com o item 2.3 foram lavadas com M199 puro e infectadas ou não com a amostra 90356 (10<sup>7</sup> UFC/mL) por diferentes intervalos de tempo: 0 h, 5 min, 15 min, 30 min, 1 h e 2h em ambiente 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após o tempo de interação as garrafas foram lavadas com tampão PBS-glicose e raspadas em 200  $\mu$ L de tampão de extração contendo: Tris-HCl 50mM (pH 7,6), 0,4 mM Na<sub>3</sub>Vo<sub>4</sub>, 1 mM NaF, 1% Triton X-100, 100  $\mu$ M de *phenylethylsulphonyl fluoride* (PMSF), 40  $\mu$ M de leupeptina e 2 mM de EDTA. A suspensão foi homogeneizada e a dosagem de proteínas foi realizada a partir do método descrito por Lowry e colaboradores (1951), utilizando SDS 5%, reagente de Folin fenol e BSA como padrão.

## 2.9 Western Blotting

A concentração de 20  $\mu$ g foi padronizada e analisada em gel de poliacrilamida (12%) em sistema *Mini Protean* (Biorad). Todas as condições (HUVEC não infectada, HUVEC infectada com EGB, HUVEC tratada com M $\beta$ CD, HUVEC tratada M $\beta$ CD e infectada com EGB, HUVEC tratada com LY294002, HUVEC tratada com LY294002 e infectada com EGB e HUVEC tratada M $\beta$ CD+LY e infectada com EGB) foram diluídas na proporção de 1:9 em tampão de amostra (TRIS-HCl 0,5 M, pH 6,8, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,02% e SDS 2%), fervidas durante 5 min e aplicadas no volume de 20 $\mu$ L.

As proteínas foram separadas por peso molecular sob a voltagem de 120 A pelo período de aproximadamente 50 min e comparadas ao padrão de peso molecular entre 10-180 kDa (BenchMark; Invitrogen Laboratories). Logo em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose através do sistema mini TRANS-BLOT para mini gel da Biorad. O sistema foi montado em cuba contendo tampão de transferência e colocado sob a voltagem de 350 V por 1h 30 min a 4 °C.

Em seguida a membrana foi saturada com TBS + Tween 20 0.1% (TBS-T) contendo 5% de BSA durante 1 h e incubada com anticorpo primário para a detecção da p-PI3K (1:1000; Cell Signaling), PI3K (1:1000; Cell Signaling), e p-Akt (1:1000; Cell Signaling) e Akt (1:1000) proteína Akt (Cell Signal) por mais 1 h. Após lavagens com TBS-T, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário equivalente conjugado a peroxidase 1:5000 (Amersham) em TBS-T por 1 h. Posteriormente, foram realizadas cinco lavagens sucessivas de 3 min com TBS-T para posterior revelação utilizando Luminata (Millipore) e o sistema ChemiDoc XRS (Bio-rad).

## 2.10 Ensaios de fosforilação e extração de lipídios

Após obtenção de extrato e dosagem de proteína (item 2.8), foram realizados os ensaios de fosforilação de lipídios. A fosforilação foi quantificada pela incorporação de  $^{32}\text{P}_i$ , método adaptado de Einecker-Lamas e colaboradores (2003). Então 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de proteína do extrato celular foram incubados em 1 ml de meio de reação (Mes Tris 30 mM (pH 7,0),  $\text{MgCl}_2$  5 mM,  $\text{NaN}_2$  1 mM, ouabaína 1mM, EGTA 500  $\mu\text{M}$ ). Para medida da atividade da esfingosina cinase (SK) foi acrescentado esfingosina (Sph) a esse meio de reação e realizada a quantificação de esfingosina -1-fosfato (S1P). A reação foi iniciada com a adição de ATP ( $[\gamma^{32}\text{p}]$  ATP 1 mM,  $10^8$  cpm/ml). Após 20 min de incubação a 37°C, a reação foi parada pela adição de 4 ml de solução clorofórmio : metanol : HCl (2: 1: 0,075, v/v). A extração de lipídios foi realizada como descrito em Horowitz & Perlman (1987). Depois de parada a reação, foram adicionados 1 ml de HCl (0,6 M) aos tubos, que após agitação foram centrifugados por 10 min. A fase aquosa (superior) foi removida e a fase orgânica adicionou-se 1 ml de clorofórmio: metanol : HCl (3: 48: 47, v/v). Novamente os tubos foram centrifugados por 10 min e a fase aquosa descartada. A fase orgânica foi evaporada em fluxo

constante de N<sub>2</sub>, deixando os lipídios secos no tubo. Estes tubos foram ressuspensos em 90 µl de clorofórmio: metanol : água (75: 25: 2, v/v) e aplicados em cromatoplasmas de sílica gel (Merck, Germany). Os lipídios foram separados por cromatografia de camada fina (TLC) em corrida unidimensional, realizada em solvente clorofórmio: acetona: metanol: ácido acético: água (80: 30: 26: 24: 16 v/v, em 264 ml finais). Após secagem das placas, as mesmas foram expostas à malha de 'Phosphor Screen' e a imagem revelada no Phosphor Imager Storm 860 (Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech). As bandas correspondentes aos fosfolipídios de interesse foram marcadas nas placas, raspadas e colocadas em *vials* contendo solução de cintilação (POPOP 0,1 g/l em tolueno). A radioatividade foi medida em um contador de cintilação líquida (Packard Tri-Carb 2100 TR).

### 2.11 Análise densitométrica

As bandas proteicas obtidas foram quantificadas em unidades densitométricas através do programa (Image J) e os dados obtidos analisados estatisticamente.

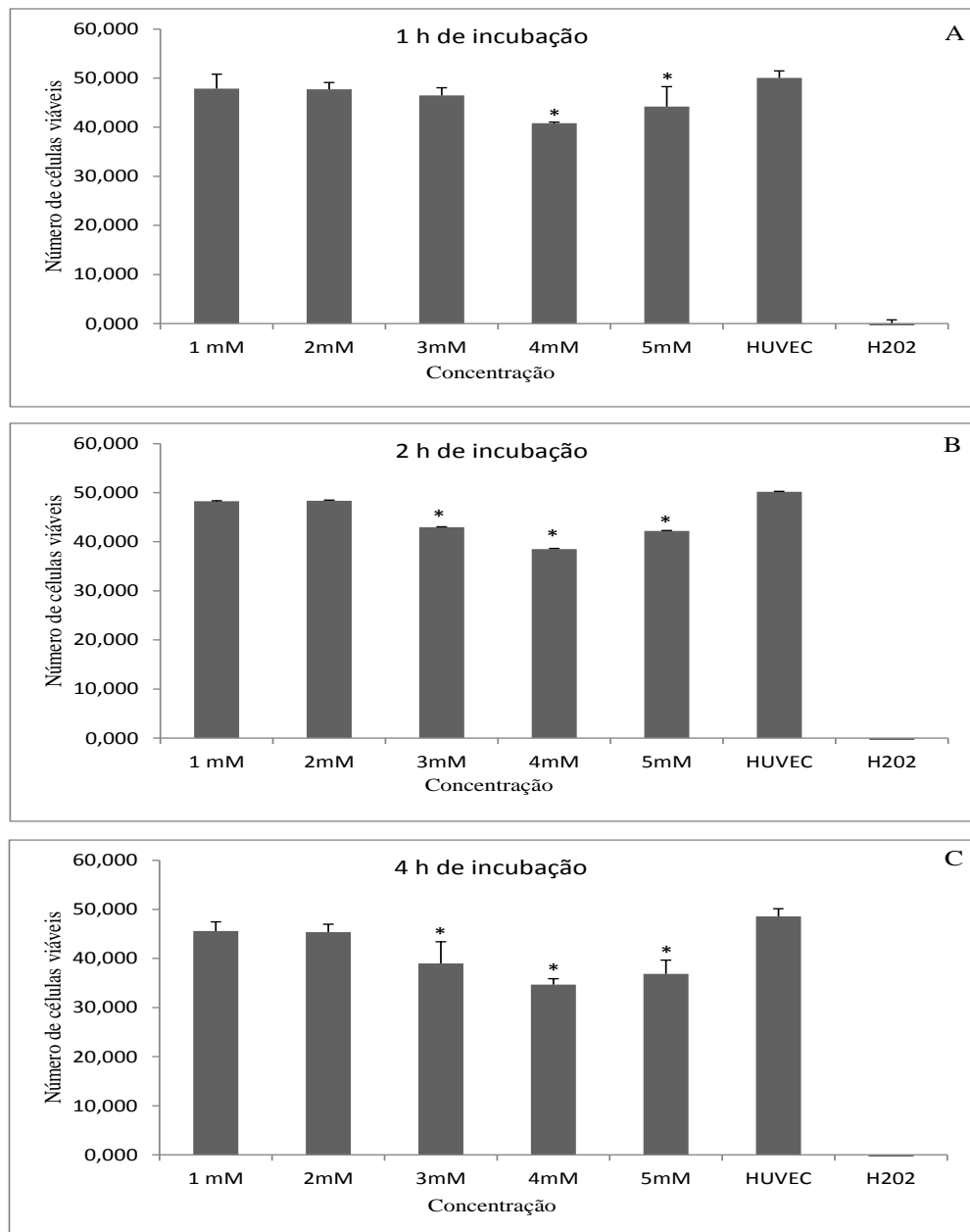
### 2.12 Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste *t* de Student. Foram consideradas significativas as diferenças com valores de  $P \leq 0,05$ .

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Efeito da Metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) nas HUVEC

O efeito de citotoxicidade da M $\beta$ CD (agente depletor de colesterol) nas HUVEC foi obtido através do ensaio de MTT e os resultados estão representados na Figura 4. O tratamento das HUVEC com diferentes concentrações (1mM – 5mM) de M $\beta$ CD foi realizado nos tempos de 1 h, 2 h e 4 h de incubação (Figura 4A-C). A concentração de 3mM mostrou-se citotóxica a partir de 2 h de tratamento ( $P=9,7 \times 10^{-3}$ ; Figura 4B). As concentrações de 4 mM e 5 mM foram citotóxicas em todos os tempos de tratamento ( $P<3,41 \times 10^{-5}$ ; Figura 4A) em comparação às HUVEC controle. Desta forma, a concentração de escolha utilizada nos experimentos seguintes foi a de 2 mM, maior concentração testada que não foi citotóxica em nenhum dos tempos analisados.

Figura 4- Citotoxicidade da M $\beta$ CD em HUVEC

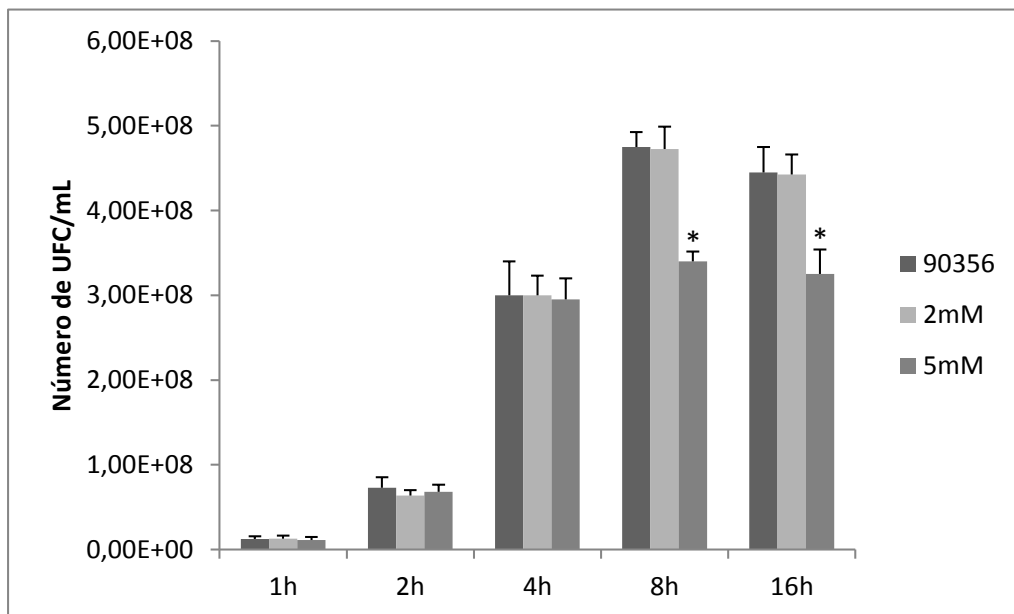
Legenda: Células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) foram incubadas com M $\beta$ CD em diferentes concentrações (1 mM – 5 mM) pelos tempos de 1 h (A), 2 h (B) e 4 h (C). Após incubação, as HUVEC foram tratadas com MTT (1 mg/mL). Cada resultado corresponde à média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos em triplicata. \*Diferenças significativas em relação ao controle  $P \leq 0,05$  através do teste  $t$  de Student.

Fonte: A autora, 2017.

### 3.2 Efeito da M $\beta$ CD no crescimento bacteriano

A análise do efeito citotóxico da M $\beta$ CD sobre o crescimento da amostra de EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) está representada na Figura 5. Foi verificado que a concentração de 2 mM não alterou o crescimento bacteriano de forma significativa em nenhum dos tempos testados quando comparada ao controle. A concentração de 5 mM foi citotóxica a partir de 8 h de tratamento ( $P < 1,19 \times 10^{-3}$ ; Figura 5). Associado ao resultado anterior de citotoxicidade da M $\beta$ CD em HUVEC, a concentração utilizada para a realização dos experimentos seguintes foi definida em 2 mM.

Figura 5 - Curva de crescimento da amostra de EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) na presença de M $\beta$ CD



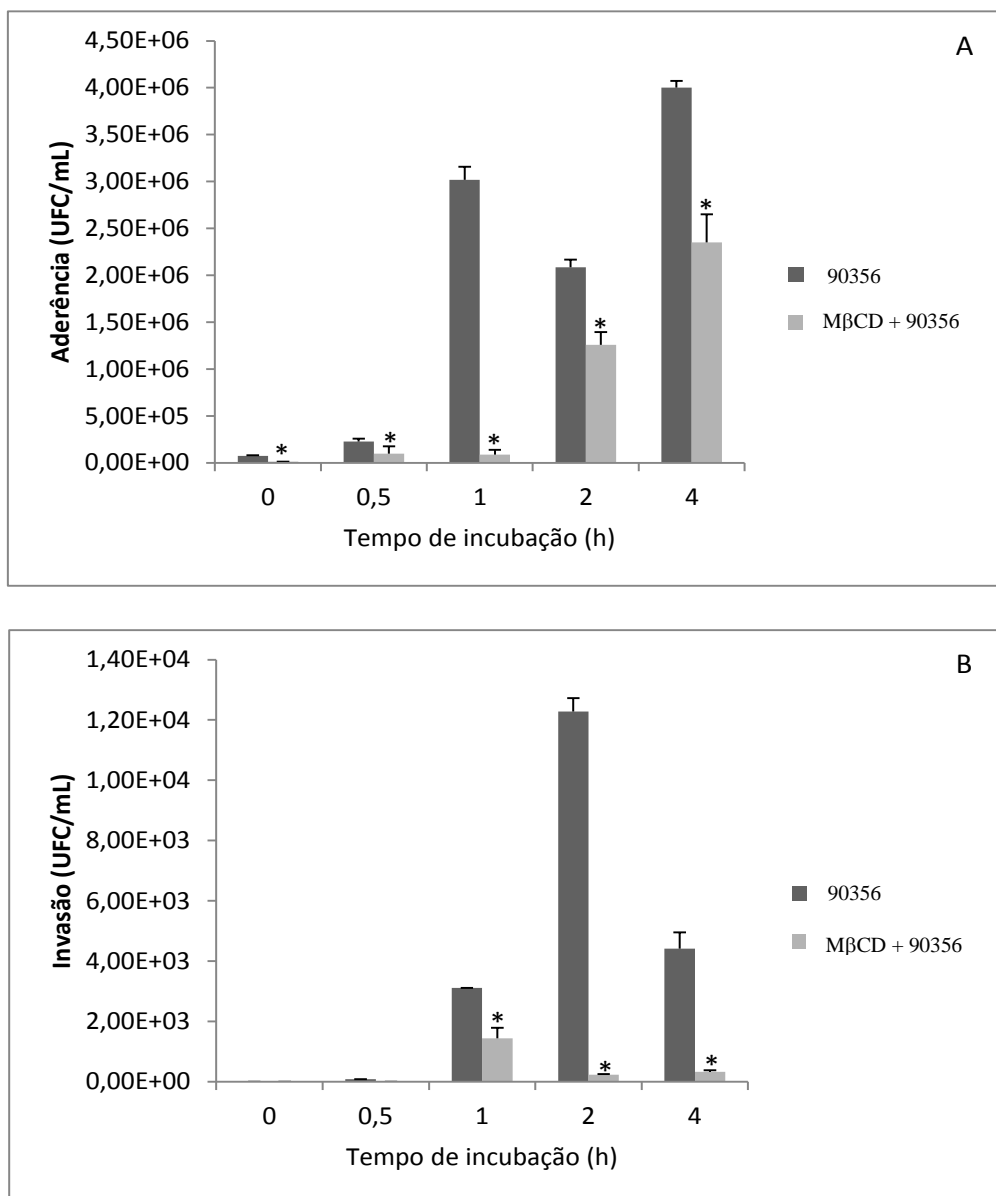
Legenda: Amostra de EGB 90356 (tipo capsular III - líquido) foi tratada com M $\beta$ CD nas concentrações de 2 mM e 5 mM pelos tempos de 1 h, 2 h, 4 h, 8 h e 16 h. Controle: amostra EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) crescida em meio 199 puro. Cada resultado corresponde à média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos em triplicata. \*Diferenças significativas em relação ao controle  $P \leq 0,05$  através do teste *t* de Student.

Fonte: A autora, 2017.

### 3.3 Interação da amostra de EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) com HUVEC na presença ou ausência da MβCD

Os resultados da cinética de aderência e invasão da amostra de EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) com HUVEC estão representados na Figura 6. A amostra bacteriana demonstrou uma diminuição no perfil de aderência às células HUVEC tratadas com MβCD ( $P < 6,4 \times 10^{-3}$ ; Figura 6A) em todos os tempos de incubação (0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h e 4 h). Com relação à invasão, os dados demonstraram uma expressiva diminuição bacteriana nas HUVEC tratadas com a MβCD após 1 h ( $5,9 \times 10^{-11}$ ), 2 h ( $1 \times 10^{-41}$ ) e 4 h ( $1,8 \times 10^{-32}$ ) de incubação quando comparadas ao controle (Figura 6B).

Figura 6 - Interação da amostra de EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) com HUVEC na presença ou ausência de MβCD





Legenda: Cinética de aderência (A) e invasão (B) da amostra de EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) com células HUVEC na presença ou ausência de M $\beta$ CD. Cada resultado corresponde à média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos em triplicata. \*Diferenças significativas em relação ao controle  $P \leq 0,05$  através do teste  $t$  de Student.

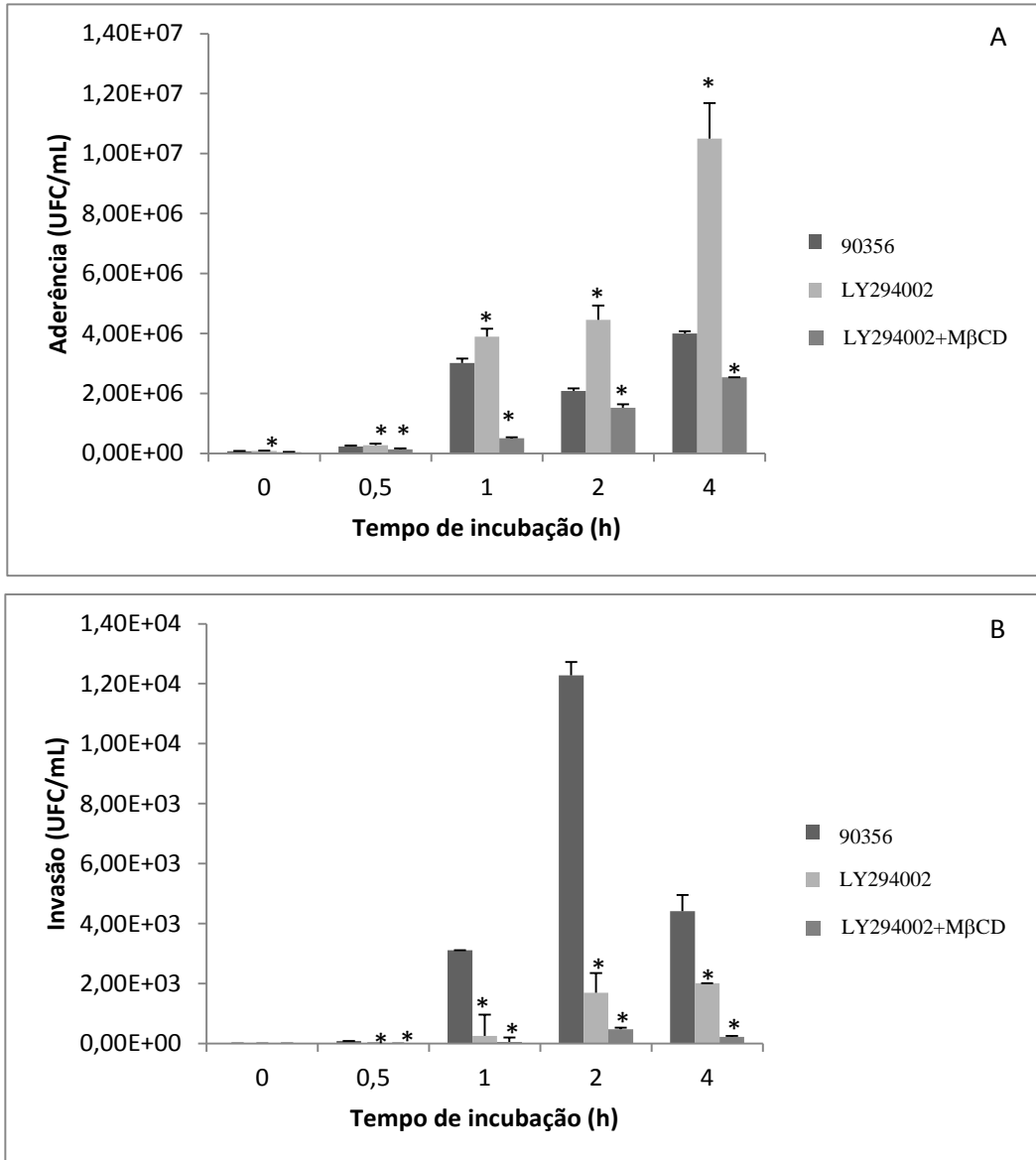
Fonte: A autora, 2017.

### **3.4 Interação da amostra de EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) com HUVEC na presença do inibidor de PI3K (LY294002) associado ou não ao tratamento com M $\beta$ CD**

Os resultados da cinética de aderência e invasão da amostra de EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) com HUVEC tratadas com LY294002 ou LY294002+M $\beta$ CD estão representados na Figura 7. A amostra bacteriana aumentou significativamente o perfil de aderência em HUVEC tratadas com o inibidor LY294002, sendo o pico de aderência observado após 4 h de infecção ( $P=4,7 \times 10^{-27}$ ; Figura 7A). Contudo, ocorreu uma diminuição significativa da aderência do EGB nas HUVEC tratadas com LY294002+M $\beta$ CD após 0,5 h ( $P < 1,2 \times 10^{-6}$ ) (Figura 7A).

Com relação à invasão bacteriana (Figura 7B), houve diminuição em todos os tempos testados nas HUVEC tratadas com LY294002 ou LY294002+M $\beta$ CD quando comparados ao controle ( $P < 2,1 \times 10^{-3}$ ).

Figura 7 - Interação EGB-HUVEC na presença ou ausência do inibidor de PI3K e M $\beta$ CD



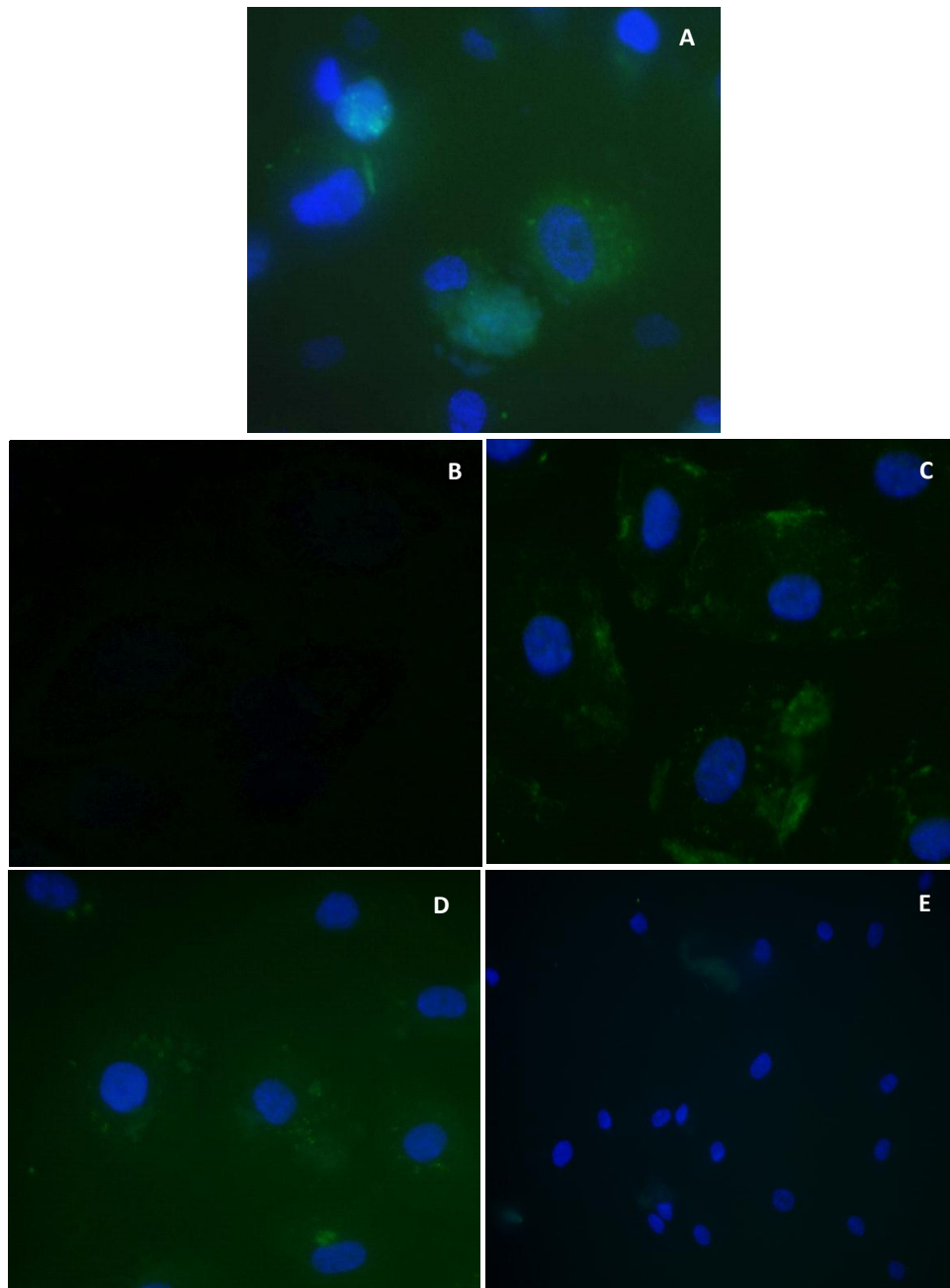
Legenda: Cinética de aderência (A) e invasão (B) da amostra de EGB 90356 (tipo capsular III - líquido) com células HUVEC na presença ou ausência de LY294002 ou LY294002+M $\beta$ CD (MbCD). Cada resultado corresponde à média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos em triplicata. \*Diferenças significativas em relação ao controle  $P \leq 0,05$  através do teste *t* de Student.

Fonte: A autora, 2017.

### 3.5 Presença de moléculas marcadoras de microdomínios lipídicos (ML) na superfície das HUVEC

A identificação das regiões de ML se caracteriza, principalmente, pela presença do gangliosídeo GM1 e das proteínas caveolinas (Cav-1 e Cav-2) e flotilinas (Flot-1 e Flot-2). Os resultados demonstraram a presença dos principais marcadores de ML nas HUVEC (Figura 8). Através da técnica de microscopia de fluorescência, as HUVEC apresentaram marcações para a molécula GM1 (Figura 8A) e para as proteínas Cav-1 (Figura 8B), Cav-2 (Figura 8C), Flot-1 (Figura 8D) e Flot-2 (Figura 8E) dispersas na superfície celular.

Figura 8 - Moléculas marcadoras de ML na superfície das HUVEC



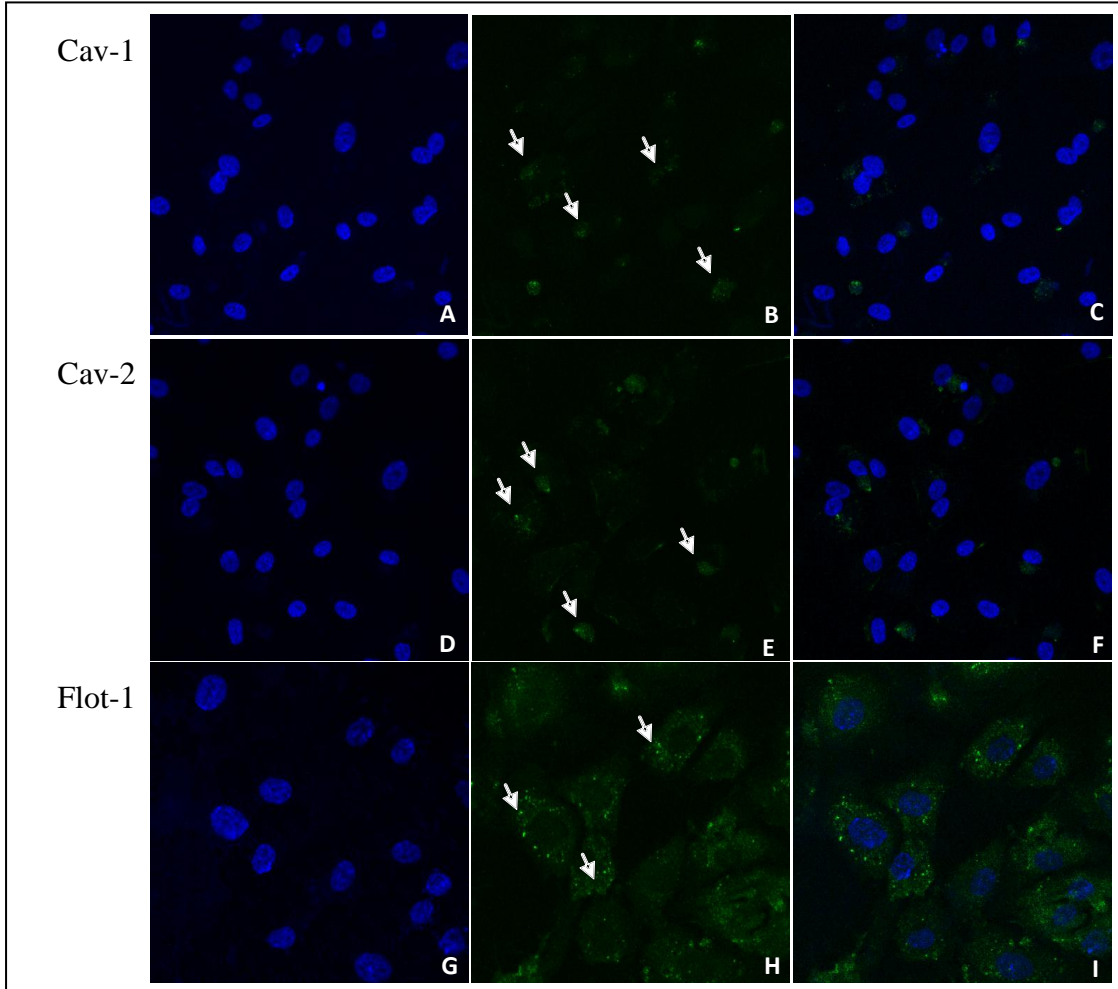
Legenda: Presença de moléculas marcadoras de microdomínios lipídicos (ML) na superfície das HUVEC. (A) HUVEC+antiGM1, (B) HUVEC+antiCav-1, (C) HUVEC+antiCav-2; (D) HUVEC+antiFlot-1 e (E) HUVEC+antiFlot-2. As proteínas Cav-1, Cav-2, Flot-1, Flot-2 e o lipídio GM1 foram marcados em verde com anticorpo secundário Alexa 488 e o núcleo em azul com DAPI. Aumento de 63x.

Fonte: A autora, 2017.

### **3.6 Distribuição das proteínas marcadoras de ML na superfície das HUVEC quiescentes através de microscopia de fluorescência confocal a laser**

Após identificação da presença das proteínas marcadoras de ML por epifluorescência, a caracterização das mesmas tornou-se necessária por microscopia confocal a laser. O padrão de distribuição das Cav-1, Cav-2 e Flot-1 na superfície das HUVEC está demonstrado na Figura 9. A análise da distribuição de Cav-1 e Cav-2 na superfície das HUVEC quiescentes demonstrou um padrão similar, onde as duas proteínas apresentaram-se concentradas em determinadas regiões da membrana (Figura 9B e 9E). Em contraste, a proteína Flot-1 demonstrou um padrão diferente de distribuição, pois apresentou-se distribuída por toda a superfície celular (Figura 9H). A proteína Flot-2 apresentou marcação muito fraca (dados não mostrados).

Figura 9 - Proteínas marcadoras de ML na superfície das HUVEC por microscopia confocal a laser



Legenda: Distribuição das proteínas marcadoras de ML na superfície das HUVEC quiescentes através de microscopia de fluorescência confocal a laser. Proteínas presentes nas HUVEC: Caveolina-1 (Cav-1), Caveolina-2 (Cav-2) e Flotilina-1 (Flot-1). Núcleo marcado em azul com DAPI (A, D, G), as proteínas foram marcadas em verde com anticorpo secundário Alexa 488 (B, E, H) e após realizado o *overlay* das imagens (C, F, I). Aumento de 63x.

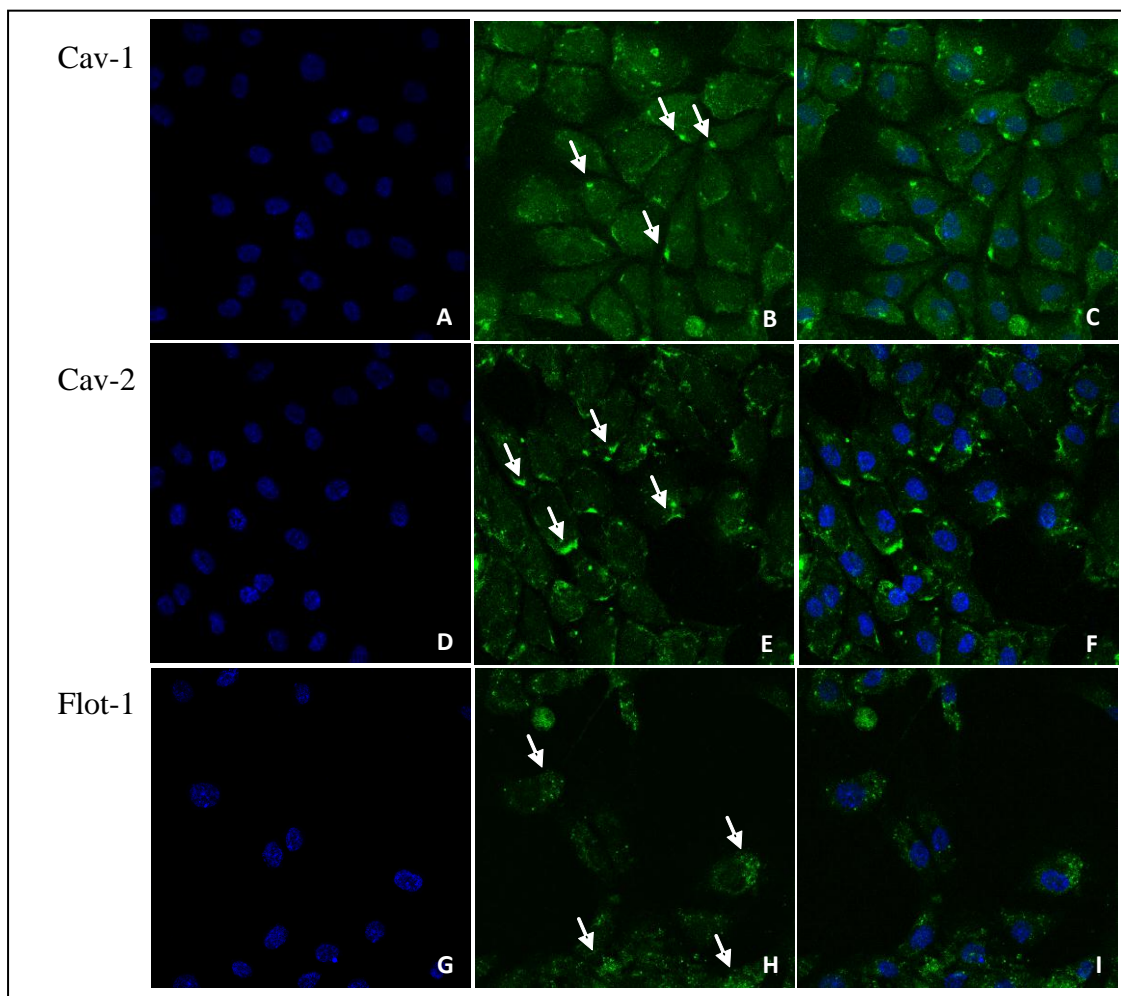
Fonte: A autora, 2017.

### 3.7 Modulação da distribuição das proteínas marcadoras de ML na superfície das HUVEC após tratamento com M $\beta$ CD

Através da microscopia confocal a laser foi demonstrada a modulação da distribuição das proteínas marcadoras de ML na superfície da célula endotelial após tratamento com M $\beta$ CD por 1 h. As proteínas Cav-1, Cav-2 e Flot-1 demonstraram alteração no perfil de distribuição na membrana celular após tratamento das HUVEC com M $\beta$ CD (Figura 10). As

proteínas Cav-1 (Figura 10B) e a Cav-2 (Figura 10E) foram visualizadas concentradas na periferia da membrana após o tratamento das células com M $\beta$ CD, enquanto a proteína Flot-1 demonstrou discretas concentrações na superfície (Figura 10H).

Figura 10 - Modulação da distribuição das proteínas de ML na superfície das HUVEC após tratamento com M $\beta$ CD por microscopia confocal a laser



Legenda: Distribuição das proteínas marcadoras de ML na superfície das HUVEC tratadas com M $\beta$ CD através de microscopia de fluorescência confocal. Proteínas presentes nas HUVEC: Caveolina-1 (Cav-1), Caveolina-2 (Cav-2) e Flotilina-1 (Flot-1). Núcleo marcado em azul com DAPI (A, D, G), as proteínas foram marcadas em verde com anticorpo secundário Alexa 488 (B, E, H) e após realizado o *overlay* das imagens (C, F, I). Aumento de 63x.

Fonte: A autora, 2017.

### 3.8 Modulação da distribuição das proteínas de superfície das HUVEC após infecção com a amostra de EGB 90356 (tipo capsular III-líquor)

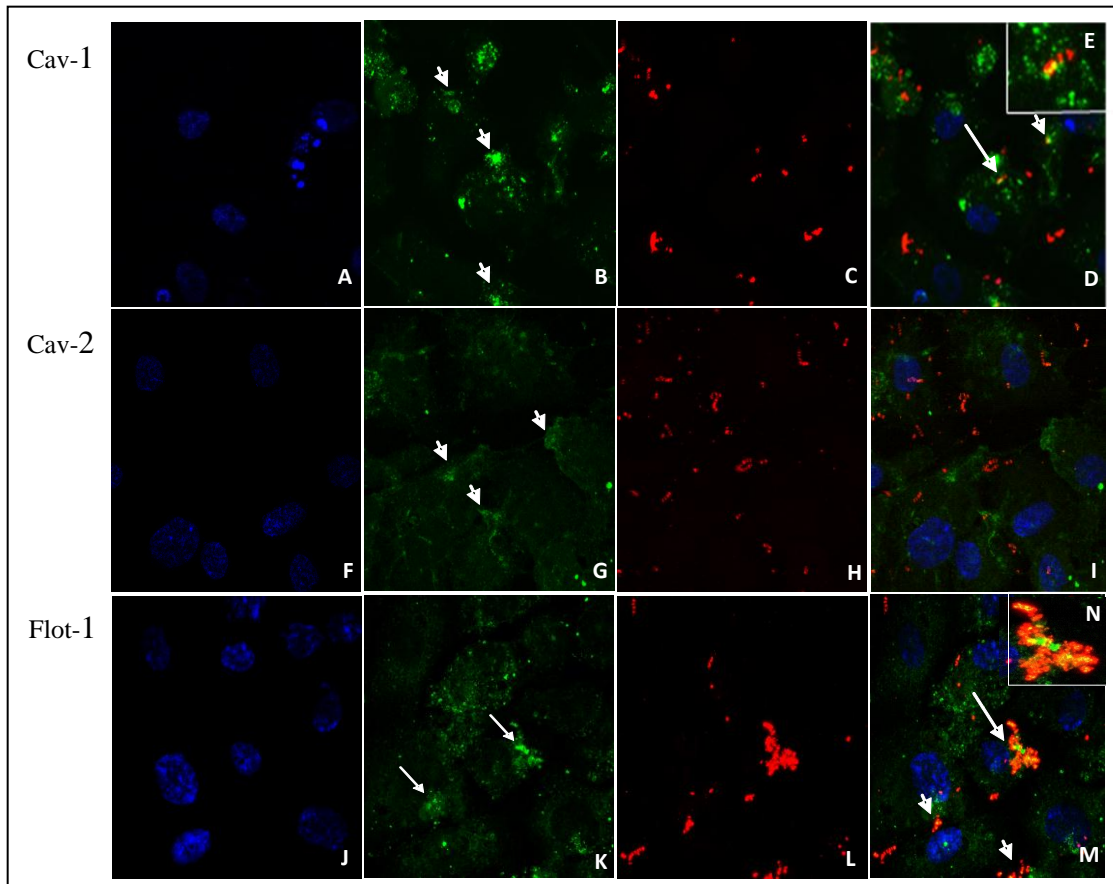
Para avaliar a modulação da distribuição de proteínas de superfície das células endoteliais após interação com o EGB, as HUVEC foram infectadas com a amostra de EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) por 1h (marcada com o anticorpo secundário Alexa 546 vermelho).

O padrão de distribuição das proteínas Cav-1 (Figura 11B) e Cav-2 (Figura 11G) após a infecção com a amostra EGB 90356 mostrou-se similar ao perfil demonstrado anteriormente nas HUVEC tratadas com M $\beta$ CD (Figura 10). Houve a formação de aglomerados na marcação da proteína Cav-1 (Figura 11B), bem como a proximidade das bactérias com as regiões mais demarcadas (Figura 11D). No aumento presente na imagem de *overlay* foi possível visualizar a co-localização da bactéria com a proteína Cav-1 (Figura 11E).

Para a Cav-2 foi verificada a marcação mais presente na periferia da célula endotelial, porém com poucas e sutis concentrações da proteína (Figura 11G). Não foi possível visualizar pontos de co-localização da proteína Cav-2 com amostras de EGB testada (Figura 11I).

A proteína Flot-1 demonstrou um perfil de distribuição por toda a superfície e a presença de agregados na superfície da célula endotelial após infecção com a amostra de EGB (Figura 11K). Houve ligação preferencial da amostra EGB 90356 pelos sítios de aglomeração da proteína (Figura 11M). Na imagem *overlay* da proteína Flot-1 foi possível demonstrar a co-localização da amostra bacteriana (Figura 11N).

Figura 11 - Modulação da distribuição das proteínas de superfície das HUVEC após infecção com EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) por microscopia confocal a laser



Legenda: HUVEC infectadas com EGB 90356 (tipo capsular III-líquor). Proteínas presentes nas HUVEC: Caveolina-1 (Cav-1), Caveolina-2 (Cav-2) e Flotilina-1 (Flot-1). Núcleo marcado em azul com DAPI (A, F, J); proteínas foram marcadas em verde com anticorpo secundário Alexa 488 (B, G, K); EGB marcado em vermelho com anticorpo secundário Alexa546 (C, H, L) e *overlay* das imagens (D, I, M). Regiões ampliadas demonstrando co-localização (E, N). Aumento de 63x.

Fonte: A autora, 2017

### 3.9 Modulação da distribuição das proteínas de membrana marcadoras de ML nas HUVEC após tratamento com M $\beta$ CD e infecção com EGB 90356 (tipo capsular III-líquor)

Para avaliar a modulação da distribuição das proteínas Cav-1, Cav-2 e Flot-1 nas células endoteliais após o tratamento com a M $\beta$ CD por 1 h, as HUVEC foram lavadas com

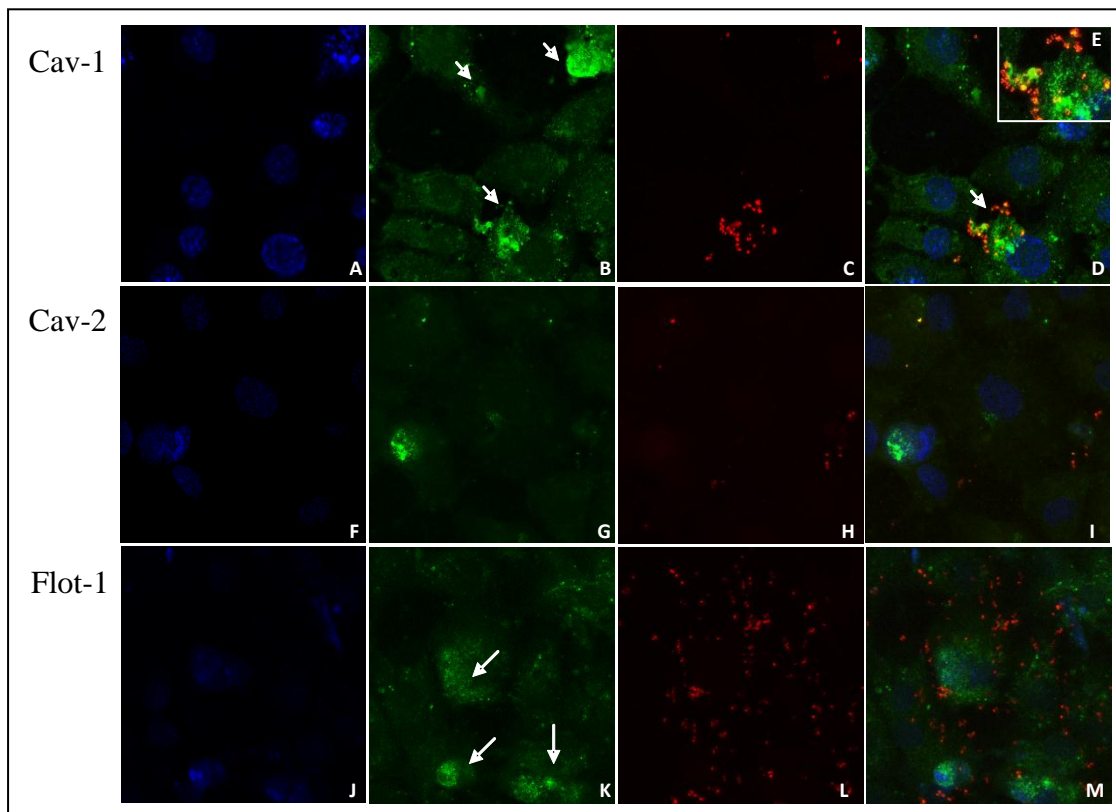


M199 e posteriormente realizada a interação com o EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) por 1 h.

A proteína Cav-1 (Figura 12B) apresentou um padrão similar ao anterior (Figura 11) onde ocorrem pequenas concentrações dessa proteína na membrana, porém bem localizadas, sendo toda superfície celular mais homogênea na distribuição da fluorescência. A localização das bactérias nesta condição também foi verificada nas regiões de maior localização dessa proteína (Figura 12C-D). A proteína Cav-2 demonstrou um padrão de distribuição menor que a proteína Cav-1, apresentando poucos agregados na superfície celular (Figura 12F).

A proteína Flot-1 apresentou alguns agregados próximos à membrana celular, porém com distribuição mais homogênea na superfície (Figura 12K). Não foi visualizada concentração bacteriana nessas regiões, estando às mesmas bem distribuídas por toda a superfície (Figura 12M).

Figura 12 - Distribuição das proteínas marcadoras de ML nas HUVEC após tratamento com a M $\beta$ CD e infecção com EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) por microscopia confocal a laser



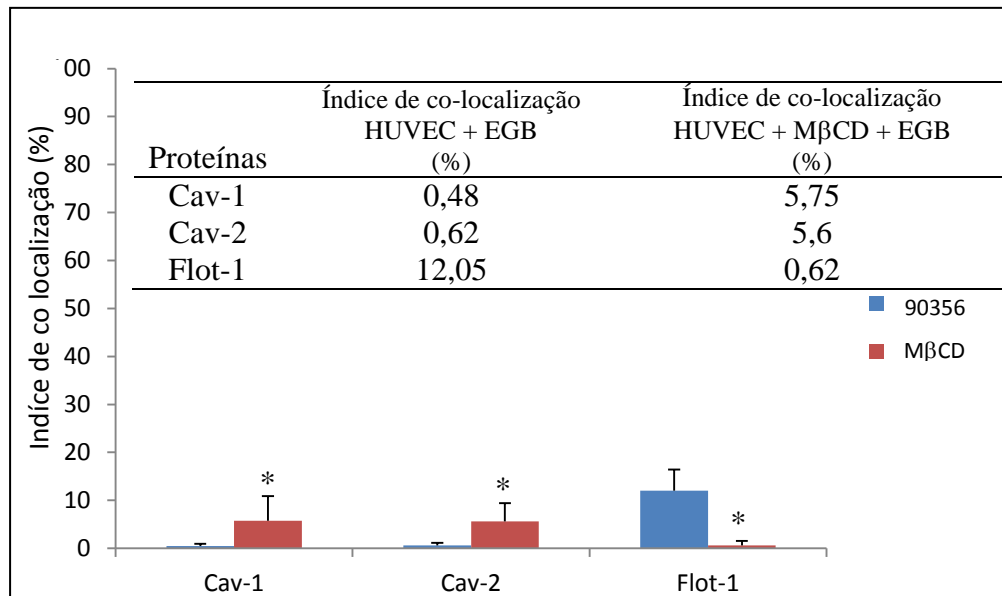
Legenda: HUVEC tratadas com M $\beta$ CD infectadas com EGB 90356 (tipo capsular III-líquor). Proteínas presentes nas HUVEC: Caveolina-1 (Cav-1), Caveolina-2 (Cav-2) e Flotilina-1 (Flot-1). Núcleo marcado em azul com DAPI (A, F, J); proteínas foram marcadas em verde com anticorpo secundário

Alexa 488 (B, G, K); EGB marcado em vermelho com anticorpo secundário Alexa546 (C, H, L) e *overlay* das imagens (D, I, M). Região ampliada demonstrando co-localização (E). Aumentos de 63x.  
Fonte: A autora, 2017.

### 3.10 Índice de co-localização EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) com ML em HUVEC

O índice de co-localização do EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) com as proteínas relacionadas ao ML está demonstrado na Figura 13. O maior índice de co-localização da bactéria com HUVEC foi demonstrado para a proteína Flot-1. Contudo, nas células HUVEC tratadas com M $\beta$ CD o maior índice de co-localização do EGB passou a ser com as proteínas Cav-1 e Cav-2.

Figura 13 - Índice de co-localização da amostra EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) com proteínas de ML na superfície das HUVEC



Legenda: Índice de co-localização amostra EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) com proteínas de ML na superfície das HUVEC tratadas ou não com MβCD. Cada resultado corresponde à média ± desvio padrão de 3 experimentos em triplicata. \*Diferenças significativas em relação ao controle  $P \leq 0,05$  através do teste *t* de Student.

Fonte: A autora, 2017

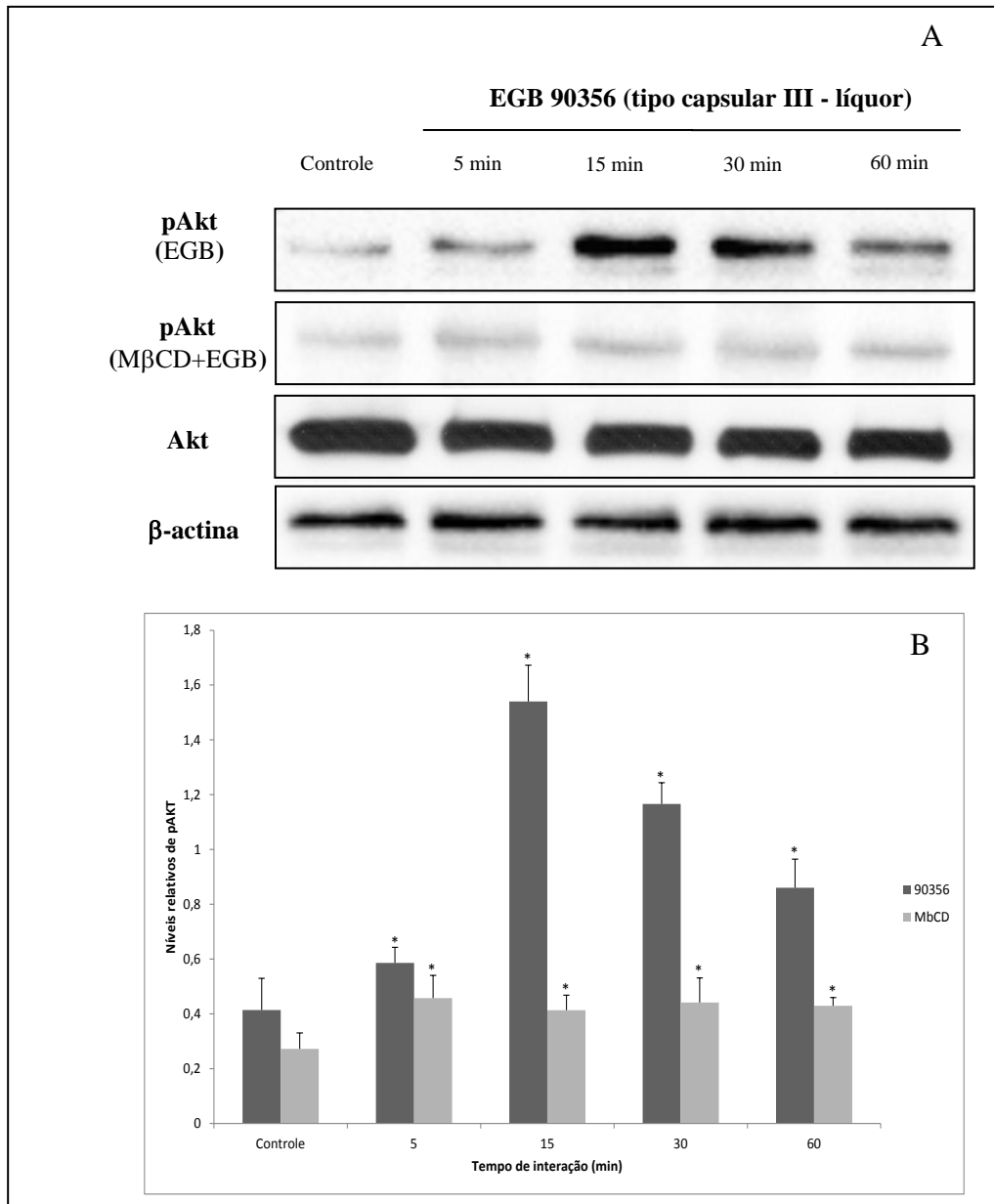
### 3.11 Perfil de fosforilação da proteína Akt durante interação EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) com HUVEC na presença ou ausência de MβCD

Os resultados da avaliação da fosforilação da proteína Akt durante a interação EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) com HUVEC tratadas ou não com MβCD estão representados na Figura 14.

HUVEC não tratadas com MβCD e infectadas com a amostra 90356 demonstrou aumento significativo na expressão de Akt fosforilada em todos os tempos analisados ( $P < 0,001$ ), tendo pico de fosforilação após 15 min de incubação ( $P < 4,5 \times 10^{-10}$ ) quando comparadas ao controle (Figura 14B).

Após o tratamento das HUVEC com MβCD e posterior infecção com a amostra 90356 ocorreu redução da fosforilação de Akt em relação ao controle ( $P < 0,001$ ).

Figura 14 - Fosforilação da proteína Akt durante interação EGB 90356 (tipo capsular III-líquor)-HUVEC na presença ou ausência de M $\beta$ CD



Legenda: Análise do perfil de expressão da proteína pAkt e Akt durante a interação da amostra EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) com HUVEC tratadas ou não com M $\beta$ CD (M $\beta$ CD). (A) Imagem das bandas referentes a cada tempo de interação das HUVEC com EGB. (B) Análise densitométrica da relação dos níveis de pAkt pelos níveis de Akt total em cada tempo de interação. Controle: HUVEC não infectadas com EGB. Cada resultado corresponde à média de 3 experimentos. \*P<0,05.

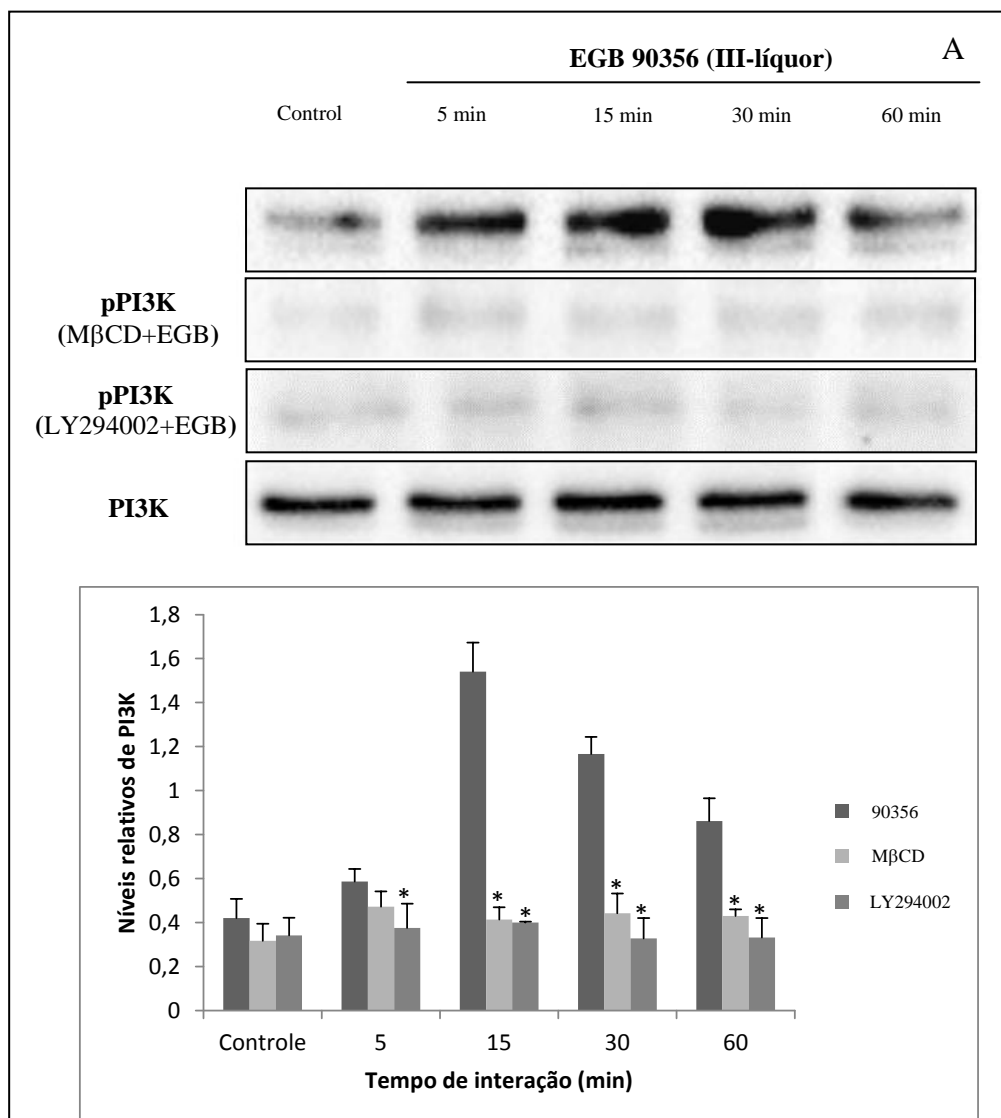
Fonte: A autora, 2017.

### 3.12 Perfil de fosforilação da proteína PI3K durante a interação EGB 90356 (tipo capsular III-líquor)- HUVEC na presença ou não de M $\beta$ CD.

Os resultados da avaliação da fosforilação da proteína PI3K durante a interação EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) com HUVEC na presença ou não de M $\beta$ CD e LY 294002 estão representados na Figura 15. Após interação do EGB com as HUVEC ocorreu aumento na fosforilação de PI3K a partir dos 5 min de interação, tendo como pico de fosforilação o tempo de 15 min de incubação ( $P < 0,0015$ ), através da análise densitométrica das bandas quando comparadas ao controle.

Os tratamentos das HUVEC com M $\beta$ CD e LY 294002 demonstraram expressiva diminuição na fosforilação de PI3K em todos os tempos de interação ( $P < 0,0005$ ), através da análise densitométrica das bandas quando comparadas ao controle.

Figura 15 - Perfil de fosforilação da proteína PI3K durante a interação EGB 90356 (tipo capsular III-líquor)-HUVEC na presença ou não de M $\beta$ CD e LY294002



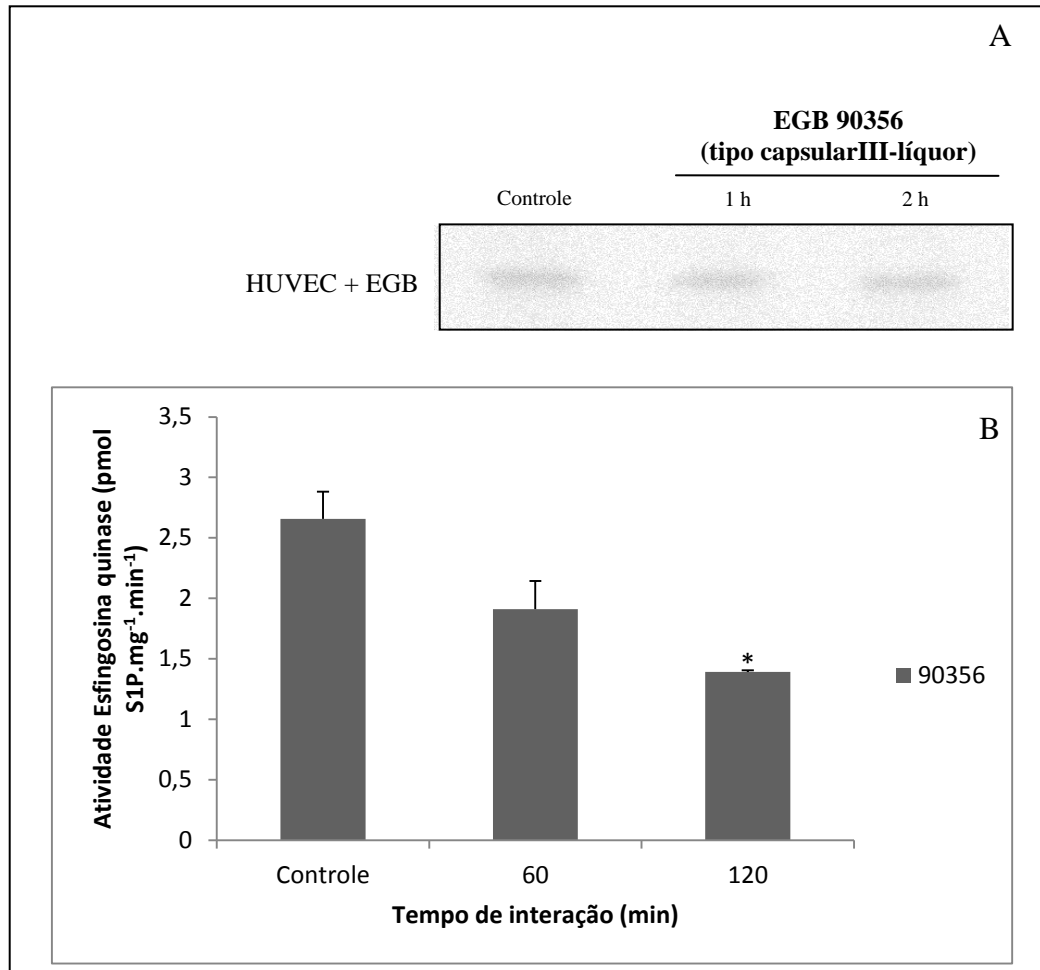
Legenda: Perfil de expressão da proteína pPI3K e PI3K durante a interação da amostra EGB 90356 (tipo capsular III-líquor) com HUVEC tratadas ou não com M $\beta$ CD (MbCD) ou LY294002 através da técnica de *western blotting*. (A) Imagem das bandas referentes a cada tempo de interação das HUVEC com EGB. (B) Análise densitométrica da relação dos níveis de pPI3K pelos níveis de PI3K total em cada tempo de interação. Controle: HUVEC não infectadas com EGB. Cada resultado corresponde à média de 3 experimentos \*P<0,05.

Fonte: A autora, 2017.

### **3.13 Atividade da esfingosinaquinase durante a interação EGB 90356 (tipo capsular III - líquido)- HUVEC**

Na via dos esfingolípídeos, foi avaliada a atividade da esfingosinacinaase (SK), pela quantificação de esfingosina 1-fosfato (S1P) após interação EGB 90356- HUVEC nos tempos de 1 h e 2 h na presença ou ausência de M $\beta$ CD (Figura 16). Os resultados demonstraram que a infecção de EGB em HUVEC promoveu uma diminuição significativa no nível de S1P apenas no tempo de 2 h de incubação.

Figura 16- Análise da atividade da esfingosinaquinase na interação de EGB 90356 (tipo capsular III-líquor)-HUVEC na presença ou não de M $\beta$ CD



Legenda: Atividade da esfingosinaquinase na interação EGB 90356 (III-líquor)-HUVEC. (A) Imagem representativa obtida por cromatografia para identificação e quantificação da formação de S1P. (B) Representação gráfica da atividade da esfingosina quinase calculada a partir da formação de S1P.

Fonte: A autora, 2017.

## 4 DISCUSSÃO

A patogênese da infecção por EGB em humanos está relacionada com a capacidade desse micro-organismo em invadir e atravessar barreiras anatômicas como epitélio e o endotélio, sendo responsáveis por infecções severas e invasivas em neonatos, gestantes e indivíduos imunocomprometidos (Goluszko *et al.*, 2008). Diversos trabalhos já demonstraram a capacidade do EGB em aderir, invadir e colonizar diferentes tipos celulares como, células endoteliais, epiteliais e macrófagos (Gibson *et al.*, 1993 ; Greco *et al.*, 1995 ; Valentin-Weigand *et al.*, 1996 , 1997; Nizet *et al.*, 1997 ; Lalonde *et al.*, 2000 ; Tyrrell *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2006 ; Lione *et al.* 2014; Korir *et al.* 2014; Fettucciari *et al.* 2015). Contudo, os mecanismos de transdução de sinais envolvidos na patogênese causada pelo EGB ainda são pouco compreendidos.

Dentre os processos requeridos pelo EGB para invadir a célula hospedeira, o rearranjo do citoesqueleto é um dos mais importantes (Garcia *et al.*, 2005), permitindo a entrada de nutrientes, lipídios e nanopartículas, principalmente no rearranjo induzido pelos microdomínios lipídicos (ML) (Goldston *et al.*, 2012).

Diversos trabalhos sugerem que micro-organismos bacterianos interagem com ML para conseguir invadir e sobreviver na célula hospedeira (Manes *et al.*, 2003; Hawkes & Mak, 2006). A ativação, ligação, rompimento de membrana e a sinalização para desencadear a fagocitose bacteriana estão envolvidos com componentes de ML (Lafont & van der Goot, 2005). Foram postuladas duas vantagens no processo de invasão bacteriana via ML: (1) evitar a via degradativa intracelular e (2) desencadear as cascatas de sinalização que levam ao rearranjo do citoesqueleto (Manes *et al.*, 2003).

Diferentes ML podem coexistir, como por exemplo os caveolares (contém caveolina) e os não caveolares (lineares enriquecidos em flotilina). Os ML correspondem a pequenas regiões (10-200 nM) altamente dinâmicas e enriquecidas em colesterol, glicosíngolípido e fosfolípido de sinalização, que compartimentalizam diversos processos celulares na membrana plasmática (Vieira *et al.*, 2010; Eierhoff *et al.*, 2014). Essas regiões desempenham papéis cruciais na transdução de sinais, fagocitose e secreção, bem como no processo de aderência/internalização de patógenos, podendo ser exploradas como plataformas de sinalização e invasão na célula alvo (Zhang *et al.*, 2009; Vieira *et al.*, 2010; Amiya, 2016). Diversos trabalhos sugerem a participação de ML (caveolar e não caveolar) em patogêneses



bacterianas, parasitárias e virais, sendo a sua interação com componentes do citoesqueleto um ponto crucial no processo de endocitose (Huang *et al.*, 2011; Goldston *et al.*, 2012).

Até a presente data somente dois trabalhos publicados na literatura demonstram a relação de ML no processo de infecção relacionada ao EGB. Por esta razão, a maioria das justificativas apresentadas nesta discussão será baseada em dados publicados que utilizaram diferentes micro-organismos e tipos celulares. Foi demonstrado que o EGB é capaz de explorar ML em células dendríticas e endometriais, utilizando amostras de EGB pertencentes aos tipos capsulares Ia e III, respectivamente (Goluzsko *et al.*, 2008; Lemire *et al.*, 2012). Entretanto, não existem dados até o momento que demonstrem que amostras de EGB pertencentes ao sorotipo III explorem ML em células endoteliais (HUVEC), justificando, portanto, a importância deste trabalho para o melhor entendimento deste processo.

A associação de ML como ponto de ligação e entrada de bactérias é evidenciada para organismos Gram-positivos e Gram-negativos (Zaas *et al.*, 2005; Riethmuller *et al.*, 2006; Toleddo & Benach, 2016). *Streptococcus pneumoniae* utiliza uma grande variedade de fatores para invadir eritrócitos humanos, dentre eles a exploração de ML e o rearranjo do citoesqueleto de actina (Yamaguchi *et al.*, 2013). Van der Goot e Harder (2001) demonstraram que a invasão de *Escherichia coli* na célula hospedeira também é mediada por microdomínios ricos em colesterol (Nikolaeva *et al.*, 2013).

Diversos trabalhos que avaliam o papel de ML nos mais diferentes processos celulares utilizaram um eficiente método, que é a depleção do colesterol, pelo uso ciclodextrinas (Schnitzer *et al.*, 1994; Luker *et al.*, 2000). As ciclodextrinas são oligômeros cíclicos de glicose, solúveis em água, que depletam o colesterol da membrana (Doherty & McMahon, 2009). Esta metodologia foi escolhida para ser seguida neste trabalho e baseia-se na teoria de que o colesterol atua como um "adesivo" dinâmico, que mantém a estrutura dos ML, cuja remoção da membrana resulta na dispersão de lipídios e proteínas associadas a essa região (Manes *et al.*, 2003; Mak, 2006).

Foi visto que a M $\beta$ CD remove o colesterol de células cultivadas *in vitro* (Ohtani *et al.*, 1989, Kilsdonk *et al.*, 1995, Klein *et al.*, 1995) e influencia na função de várias proteínas de sinalização como, *receptor do fator de crescimento epidermal* (EGF-R), ErbB2 humano (Jans *et al.*, 2004), ERK (Kabouridis *et al.*, 2000; Jans *et al.*, 2004), p38 (Tuluc *et al.*, 2003; Jans *et al.*, 2004), Src (Qi *et al.*, 2009) e p-catenina (Mermelstein *et al.*, 2007), podendo induzir a hemólise e citotoxicidade em altas concentrações (Motoyama *et al.*, 2009).

Os trabalhos realizados com as HUVEC visaram analisar o papel dos ML durante os processo de inflamação (Pan, 2016), ativação do fator XII de coagulação (Schousboe *et al.*,

2004) e efeito proliferativo (Li *et al.*, 2014), utilizando diferentes concentrações e tempos de incubação. Não foi encontrado nenhum artigo publicado que tenha analisado o papel dos ML em HUVEC com patógenos. Li (2014) e Pan (2016) descrevem a utilização da M $\beta$ CD em HUVEC na concentração de 10 mM durante 1 h de incubação, enquanto trabalho realizado por Schousboe e colaboradores (2004) a concentração de escolha foi de 1 mM por 30 min de incubação. Para outros tipos celulares essas concentrações e tempos de incubação de M $\beta$ CD também foram variáveis, por exemplo, para células endometriais a utilização da concentração de 5mM por 1 h foi descrita por Goluszko e colaboradores (2008), enquanto para células dendríticas a concentração de escolha foi de 5 mM e 10 mM por 30 ou 15 min, respectivamente (Lemire *et al.*, 2012).

Diante de tantas informações controversas e da citotoxicidade relacionada a M $\beta$ CD, o primeiro passo deste trabalho foi avaliar a concentração de escolha e o efeito da mesma sobre a viabilidade celular nas HUVEC e no crescimento bacteriano (Figuras 4 e 5).

Os dados obtidos neste trabalho demonstraram que concentrações de M $\beta$ CD acima de 3 mM foram citotóxicas às HUVEC em comparação ao controle a partir de 1 h de incubação. Após 2 h de incubação a concentração de 3 mM também demonstrou-se citotóxica à célula endotelial. Desta forma, a concentração de escolha utilizada nos experimentos seguintes foi de 2 mM que não apresentou citotoxicidade em nenhum dos tempos testados de incubação com as HUVEC.

Foram realizados testes de citotoxicidade também em relação à amostra bacteriana 90356 (III-líquor), onde foi constatado que a concentração de 2 mM não interferiu no crescimento bacteriano em nenhum dos tempos analisados, já que a amostra crescida em meio contendo M $\beta$ CD obteve perfil de crescimento semelhante ao da amostra controle.

A infecção de células eucarióticas com agentes bacterianos inclui a aderência do patógeno aos receptores lipídicos localizados na superfície (ML) da célula. O processo de ligação pode continuar com o recrutamento de proteínas para o local de entrada, o que por sua vez pode auxiliar na remodelação da membrana e no desenvolvimento da transdução de sinal necessária para a internalização do patógeno (tal como a polimerização de actina) (Toledo & Benach, 2015).

O processo invasivo de diversos patógenos envolve a exploração de ML (Rosenberger *et al.* 2000; Simons *et al.* 2000; Manes *et al.* 2003), relacionados com sinalização e outros processos biológicos fundamentais (Simons&Toomre, 2000), como agrupamento de receptores e proteínas (GPI ancoradas e lipoproteínas) (Brown & Rose, 1992), endocitose,

exocitose e formação de vesículas (Huttner & Zimmerberg, 2001; Nichols, 2003; Salaun *et al.*, 2004; Toledo & Benach, 2015).

A aderência e invasão do EGB às células hospedeiras envolvem inúmeras interações, mas o entendimento destes eventos moleculares é apenas um dos estágios para a caracterização do processo de interação. A modulação dos microfilamentos de actina pelo EGB é essencial para que o processo invasivo ocorra (Tyrrell *et al.* 2002). Dados do nosso grupo demonstraram que HUVEC tratadas com citocalasina D, inibidor de polimerização de actina, promoveu a diminuição na citoaderência de amostras de EGB (Santos *et al.* 2009). Contudo, não são encontrados dados na literatura que demonstrem a utilização de ML durante a interação EGB-HUVEC.

Sendo assim, a caracterização do papel dos ML durante a infecção EGB-HUVEC torna-se necessária. Como ponto inicial dessa caracterização, foi avaliada a importância dos ML no processo de interação EGB-HUVEC, utilizando a M $\beta$ CD como droga depletores de colesterol para analisar a relação do processo de infecção desse patógeno com as regiões de ML.

Nossos resultados demonstraram uma diminuição de aproximadamente 60% no processo de aderência e invasão (Figura 6A) do EGB ao endotélio após incubação com M $\beta$ CD quando comparamos ao controle, sugerindo que a desorganização dos ML pela M $\beta$ CD pode ter afetado a exposição de receptores utilizados pela bactéria, promovendo a diminuição da aderência. Após 2 h e 4 h ocorreu um aumento da aderência bacteriana nas células tratadas com M $\beta$ CD em relação ao tempo anterior de 1 h. Porém nestes mesmos tempos de 2 h e 4 h foi verificada a diminuição da invasão bacteriana nas células tratadas. Como a depleção do colesterol da membrana celular afeta a integridade estrutural dos ML, bem como o comprometimento a ligação direta dessas regiões com o citoesqueleto celular, podemos sugerir que o aumento da aderência bacteriana em 2 h e 4 h possa estar relacionado com a diminuição da invasão do EGB na célula hospedeira tratada.

Os resultados de aderência e invasão do EGB em HUVEC obtidos neste trabalho estão de acordo com estudo realizado por Goluszko e colaboradores (2008), onde os autores concluíram que a aderência do EGB às células endometriais não foi afetada e a invasão bacteriana em células endometriais foi praticamente abolida após utilização da M $\beta$ CD. Outra pesquisa demonstrou que o pré-tratamento de células dendríticas com M $\beta$ CD também afetou significativamente (diminuição em torno de 40%) o processo de internalização do EGB (Lemire *et al.*, 2012).

O estreptococos do grupo A (*Streptococcus pyogenes*), embora tradicionalmente visto como patógeno extracelular é capaz de aderir e invadir diversos tipos de células eucarióticas (Dombek *et al.*, 1999, Molinari *et al.*, 2000, Cywes & Wessels, 2001; Rohde *et al.*, 2003). O pré-tratamento de células HEp-2 com M $\beta$ CD resultou na inibição da invasão de estreptococos do grupo A, demonstrando o papel importante dos ML durante o processo de invasão deste patógeno (Rohde *et al.*, 2003). Van der Goot e Harder (2001) demonstraram que a invasão de *E. coli* na célula hospedeira foi mediada por ML ricos em colesterol (Nikolaeva *et al.*, 2013).

Vários estudos evidenciaram ML como locais de entrada e posterior internalização de *Chlamydia trachomatis* na célula alvo, visto que este processo foi prejudicado após a utilização de M $\beta$ CD. *Chlamydia psittaci* e *C. pneumoniae* também utilizaram ML para aderir e invadir células hospedeiras (Jutras *et al.*, 2003; Subtil *et al.*, 2004; Korhonen *et al.*, 2012; Toledo & Benach, 2016).

*Brucella spp.* bactérias gram-negativas de importância médica e veterinária utilizaram ML para invadir macrófagos murinos, porém tal processo foi interrompido após o uso M $\beta$ CD (Naroeni & Porte, 2002). A utilização de ML também foi verificada em *Leishmania donovani* (Pucadyl *et al.*, 2004) e *Leishmania chagasi* (Rodriguez *et al.*, 2006) em macrófagos murinos.

Aparentemente, o processo de sinalização não ocorre aleatoriamente sobre a superfície celular, parece estar frequentemente integrada a regiões de ML (Mollinedo & Gajate, 2015). Os ML presente na membrana compartimentalizam e aglomeram moléculas sinalizadoras na superfície da célula. Tal agrupamento está relacionado a eventos como a amplificação, *cross-talk*, especificidade e regulação da sinalização celular (Simon & Ikonen, 1997; Simons & Toomre, 2000; Baker *et al.*, 2015). PI3K é uma quinase lipídica conhecida por ser compartimentalizada em ML e ativada em células hospedeiras invadidas por patógenos bacterianos (Peres *et al.* 2003; Head *et al.*, 2013). O papel da PI3K na patogênese bacteriana vem sendo cada vez mais abordado, devido ao seu envolvimento na reorganização do citoesqueleto (Goluszko *et al.*, 2008). A formação de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>) a partir de fosfatidilinositol 3,4-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) por PI3K leva ao recrutamento de Akt para a membrana da célula hospedeira e subsequente fosforilação e ativação (Bruhn, 2013).

Dentre os primeiros inibidores descritos para PI3K considerados como relativamente específicos está o LY294002, derivado de flavonóidequercitina, considerado uma ferramenta valiosa para estudar a via (Vlahos *et al.*, 2004; Gharbi *et al.*, 2007) e indicado por diversos artigos como inibidor específico em diversos tipos celulares, incluindo as células endoteliais

(Blommaar, 1997; Strassheim *et al.* 2004; Dilshara *et al.* 2014; Li *et al.* 2014; Wang *et al.* 2015).

A partir destas informações, utilizamos durante a interação EGB-HUVEC o inibidor de PI3K, LY294002 (concentração e tempo de tratamento já estabelecido no laboratório) e ainda a associação do mesmo com a M $\beta$ CD, os dados obtidos estão demonstrados na Figura 7.

O inibidor de PI3K, LY294002, promoveu aumento significativo (33%) na taxa de aderência do patógeno às HUVEC nos tempos de 0 h a 4 h de infecção (Figura 7A). Entretanto, ocorreu diminuição de 80% na invasão do EGB em HUVEC após 0,5 h a 4 h de infecção em relação ao controle (Figura 7B). Além disso, o tratamento conjunto do inibidor de PI3K (LY294002) e o depletor de colesterol (M $\beta$ CD) causou diminuição no perfil de aderência e de invasão de cerca de 47% e 95%, respectivamente (Figura 7B), demonstrando que a integridade de ML e a ativação de PI3K são requeridos no processo de invasão do EGB nas células endoteliais HUVEC.

Goluszko e colaboradores (2008) demonstraram que células Ishikawa (endometriais) tratadas com inibidores de PI3K apresentaram diminuição na invasão por EGB. Os autores também relataram que o uso da M $\beta$ CD resultou na dissociação de fosfoinosítídeos dos ML e afetou a reorganização do citoesqueleto celular. Processos estes que não interferiram na aderência bacteriana, mas desorganizaram as forças motoras necessárias para a invasão do EGB nas células endometriais.

Outro estudo utilizando células HeLa tratadas com LY294002 durante a interação com EGB, demonstrou inibição da internalização do EGB, confirmando dados prévios que sugeriram o envolvimento de PI3K na invasão do EGB às células epiteliais (Burnham *et al.* 2007).

Resultado similar também foi visto no pré-tratamento de células MH-S com LY294002, resultando no bloqueio do processo de invasão de *Klebsiella pneumoniae* (Cano *et al.*, 2015). Outros estudos demonstram que a ativação da via PI3K/Akt possui um papel importante na invasão de *Toxoplasma gondii* ao hospedeiro pelo rápido acúmulo de PIP3 nas células em resposta a taquizoítos (MacLaren *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2010). PI3K tem sido descrita como importante molécula sinalizadora para invasão do hospedeiro por outros patógenos como estreptococos do grupo A (Purushothaman *et al.* 2003), *Helicobacter pylori* (Kwok *et al.*, 2002), *Chlamydia pneumoniae* (Coombes *et al.*, 2002) e *Listeria monocytogenes* (Ireton *et al.*, 1999).

Relatos na literatura relacionam o uso da M $\beta$ CD na via PI3/Akt. Kultti e colaboradores (2010) que o tratamento com M $\beta$ CD resultou na diminuição da ativação de Akt em células MCF-7. Outra publicação também descreveu essa relação após demonstrar que o derivado de M $\beta$ CD, 2,6-di-O-M $\beta$ CD suprimiu a sinalização PI3K-Akt em macrófagos (Motoyama *et al.*, 2009).

Até o momento não existem dados que relacionem o envolvimento de ML e da via PI3K/Akt durante a interação EGB-HUVEC, o que torna os dados descritos pela primeira vez, contribuindo para o conhecimento cada vez maior sobre o mecanismo de interação deste micro-organismo.

Os ML são enriquecidos em glicoesfingolípídeos (GSLs) e colesterol (Pike, 2003), além de proteínas integradas como caveolinas e flotilinas. As caveolinas são proteínas ligadas ao colesterol (Yu *et al.*, 2005) que formam invaginações na membrana, denominadas cavéolas (ML caveolares) (Rothberg *et al.*, 1992). As flotilinas, também chamadas de *reggie*, são encontradas em diferentes microdomínios de membrana (ML lineares) (Glebov *et al.*, 2006). As cavéolas são particularmente abundantes nas células endoteliais e estão envolvidas em muitos processos celulares, incluindo homeostase do colesterol, endocitose e transcitose de macromoléculas (Parton & Richards, 2003; Betz *et al.*, 2011).

No presente trabalho foi demonstrada a presença das principais moléculas marcadoras de ML na superfície das HUVEC por microscopia eletrônica (Figura 8). A marcação de Flot-2 demonstrou-se muito baixa em relação às outras marcações, por isso decidimos continuar com as três primeiras proteínas (Cav-1, Cav-2 e Flot-1). Não existem dados na literatura que demonstrem a relação direta/preferencial de ML (caveolar ou não caveolar) em HUVEC durante sua interação com EGB. Sendo assim, através da microscopia confocal a laser, analisamos a distribuição das proteínas características de ML na superfície das HUVEC, bem como a co-localização do EGB durante o processo de interação.

Após tratamento das HUVEC com a M $\beta$ CD houve mudança no perfil de distribuição dessas proteínas na membrana celular quando relacionadas à distribuição das mesmas em HUVEC quiescente (controle), confirmando o papel da droga como depletora de colesterol e, conseqüentemente desorganizadora dos ML. Após infecção da HUVEC com EGB (Figura 11) houve co-localização bacteriana com a proteína Flot-1 (12,05%), através análise gráfica do índice de co-localização (média calculada a partir do coeficiente de *Pearson*) relacionado ao EGB/proteína marcadora de ML. Estes dados sugerem que a Flot-1 (ML linear) atue durante a etapa inicial de interação EGB-HUVEC. Em contraste, após tratamento das HUVEC com

M $\beta$ CD foi observada co-localização para Cav-1 (5,75%) e Cav-2 (5,6%), sugerindo que a desorganização da estrutura caveolar (envaginação), torne esse ML mais acessível à ligação com EGB. Dado este que vai de encontro ao relatado por Orlandi e Fishman (1998) que descreveram que a utilização de agentes depletos de colesterol, componente principal de ML caveolares, promoveu o rompimento da estrutura deste microdomínio formando então complexos planares. A desorganização da estrutura dos ML também foi observada em células Ishikawa marcadas com a sonda GFP-Akt-PH, específica para o gangliosídeo GM1 (Goluszko *et al.*, 2008). Em células dendríticas, a proteína Cav-1 foi encontrada na superfície celular e como aglomerados citoplasmáticos próximos ao núcleo (distribuição perinuclear, Golgi) (Liu *et al.*, 2002). Nas células infectadas por EGB, a Cav-1 foi encontrada em estreita associação com EGB na membrana celular ou em sítios perinucleares, contudo, não foi observada formação de vesículas enriquecidas por Cav-1 em torno do EGB. Em conjunto, estes resultados descrevem pela primeira vez a co-localização da amostra EGB (tipo III-líquor) com o ML em HUVEC.

Rohde e Muller (2003) demonstraram por microscopia eletrônica que cavéolas são os sítios preferenciais para aderência e invasão por estreptococos do grupo A em células epiteliais e endoteliais. A entrada mediada por cavéola também foi vista para vírus SV40 (Pelkmans *et al.* 2001). O recrutamento de proteína Cav-1 no processo de invasão também foi mostrado para outros patógenos (Shin *et al.*, 2000, Guignot *et al.*, 2001). O tráfego intracelular da toxina Shiga (STEC), produzida por *E.coli*, foi dependente de Flotilina (Pust *et al.*, 2010). A dinâmica dos ML enriquecidos em Flotilina depende do citoesqueleto de actina. As Flotilinas regulam a atividade de proteínas do citoesqueleto, como a miosina II. Estudos recentes fornecem evidências mais concretas de que as Flotilinas estão diretamente envolvidas na endocitose, além do seu papel como plataformas de sinalização (Cano *et al.*, 2015). É possível que, neste contexto, os ML não caveolares ou lineares (enriquecidos em Flotilina) desempenhem seu papel na sinalização através da endocitose e de suas interações com o citoesqueleto.

Com base nos dados obtidos até o momento, podemos sugerir que o processo de interação deste micro-organismo com as células endoteliais é via ML e que a ativação da via PI3K/Akt pode se dar a partir destes domínios, sendo este processo complexo e multifatorial.

Nossos resultados demonstraram que durante a interação EGB-HUVEC ocorreu aumento significativo na fosforilação de Akt a partir de 5 min de interação, com fosforilação máxima em 15 min de interação. Entretanto, quando as células foram tratadas com M $\beta$ CD ocorreu diminuição significativa na fosforilação de Akt, cuja fosforilação mais significativa

foi após 5 min de interação. Desta forma, os resultados representados na Figura 14 sugerem que a via PI3K/Akt seja requerida durante o processo invasivo de EGB em HUVEC.

Burnham e colaboradores (2007) demonstraram a fosforilação de Akt em células HeLa, induzida por EGB, a partir 5 min de interação. Ensaios utilizando inibidores de Akt indicaram que PI3K é necessário para uma invasão por EGB eficiente em células HeLa. Entretanto, existem relatos de que o processo invasivo induzido por EGB não necessita da ativação da via PI3K/Akt em células Ishikawa. Essas células exibiram um nível basal de ativação de PI3K, mas não aumentaram os níveis de Akt fosforilada após infecção com EGB. Isso pode ser atribuído a uma mutação no gene que codifica a proteína PTEN, já reportada neste tipo celular (Gagnon *et al.* 2004; Jin *et al.* 2004).

A diminuição da invasão do EGB nas HUVEC após tratamento com LY294002 e a demonstração da ativação de Akt durante o processo de interação sugerem que a transdução de sinal para ativação da via Akt seja através de PI3K. Os resultados demonstraram que durante a interação EGB-HUVEC ocorreu aumento na fosforilação de PI3K a partir dos 5 min, com fosforilação máxima em 15 min de interação. A utilização dos inibidores M $\beta$ CD e LY294002 induziu uma diminuição expressiva da fosforilação de PI3K, confirmando a fosforilação de Akt em decorrência da ativação via PI3K. Esses dados também demonstraram a importância da integridade de ML na ativação da via PI3K/Akt durante a interação, pois o uso de M $\beta$ CD diminuiu a fosforilação de Akt e PI3K.

A importância dos ML ainda pode ser vista ainda como ponto central de ativação de outra importante via de sinalização, a dos lipídios bioativos. Além da importância central na formação e manutenção dos microdomínios, certos lipídios ainda desempenham um papel chave em eventos de sinalização celular, dentre eles mencionamos os esfingolipídios que sabidamente funcionam como mensageiros celulares (Pike & Casey, 1996; Razani *et al.*, 2002) e parecem se concentrar em cavéolas assim como as enzimas envolvidas na sua metabolização. Como exemplo dessa via podemos citar a produção de SpH e S1P, importantes segundos mensageiros celulares (Shaul & Anderson, 1998; Overduin *et al.*, 2001).

A esfingosina 1-fosfato (S1P) é considerada como reguladora chave de vários processos críticos de sinalização celular, incluindo manutenção da estabilidade vascular (Garcia *et al.*, 2001; Camerer *et al.*, 2009), apresentação de antígenos (Cinamon *et al.*, 2008), sobrevivência celular (Oliveira *et al.*, 1999), proliferação (Harada *et al.*, 2004), desenvolvimento (Meng *et al.*, 2011), saída e migração de linfócitos (Schwab *et al.*, 2005), produção de citocinas (Teijaro *et al.*, 2011), ativação de fosfolipase C, aumento da



concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, regulação da adenilato ciclase, ativação da via das MAPK, PI3K/Akt e da cascata de Rho (Murata *et al.*, 2000; Okamoto *et al.*, 2000). S1P é produzida através da fosforilação da esfingosina, que é catalisada por duas esfingosina cinases, SphK1 e SphK2 (Maceyka & Spiegel, 2014; Hemdan *et al.*, 2016). A manutenção da integridade da barreira endotelial é sugerida como uma nova opção terapêutica para a sepse (Rodrigues & Granger, 2015). S1P estabiliza a barreira endotelial (Garcia *et al.*, 2001; Camerer *et al.*, 2009), provavelmente mediada por S1P1 através da indução do rearranjo do citoesqueleto (Garcia *et al.*, 2001).

Os agentes patogênicos intracelulares utilizam diversas estratégias para contornar a atividade bactericida e interromper a maturação do fagossoma em macrófagos, dentre elas, a manipulação dos níveis de S1P (Custodio *et al.*, 2016). Verificou-se que a infecção de células eucarióticas com o patógeno humano *Legionella pneumophila* desencadeia uma alteração no metabolismo de esfingolípido da célula hospedeira e afeta especificamente os níveis de esfingosina (Rolando & Scoll, 2016)

Dados na literatura demonstram a participação de S1P como importante molécula sinalizadora durante o curso de infecção. Entretanto, não há dados que relacionem a sinalização de S1P no processo de infecção ocasionado pelo EGB na célula alvo, tornando este trabalho de grande importância. Nossos resultados demonstraram que durante a interação do EGB com as HUVEC ocorreu uma diminuição significativa no nível de S1P no tempo de 2 h de infecção (Figura 16). Dados semelhantes foram descritos para *Shigella flexneri* (Kim *et al.*, 2014) e *B. pertussis* que inibiu a sinalização de S1P, reduzindo a função da barreira endotelial vascular pulmonar (Hemdan *et al.*, 2016).

*M. Tuberculosis* inibe a esfingosina quinase e modula a S1P, bloqueando assim o aumento no  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico dependente de S1P e prejudicando a maturação do fagossoma (Malik *et al.*, 2003). Rolando e colaboradores (2016) demonstraram que a infecção de macrófagos com *L. pneumophila* leva a uma redução global de esfingolípido bioativos como esfingomiélin, mostrando que a infecção por *L. pneumophila* afeta o metabolismo de esfingolípido da célula hospedeira.

Estudos ressaltam o papel da S1P como um importante segundo mensageiro nas interações patógeno-hospedeiro, com micro-organismos empregando diferentes estratégias para subverter a via S1P e promover a sobrevivência e virulência intracelular (Rolando *et al.*, 2016),

Com base nos dados obtidos até o momento, nossos resultados demonstram pela primeira vez que o processo de interação EGB 90356 (tipo capsular III-líquor)-HUVEC

ocorre via ML requerendo a ativação da via PI3K/Akt. Além disso, foi verificado que o patógeno é capaz de afetar o nível de SIP, como segundo mensageiro deste processo complexo e multifatorial. Concluindo, estes dados contribuíram para o melhor entendimento, a nível molecular, da patogênese ocasionada por EGB podendo auxiliar para novas estratégias terapêuticas e profiláticas, principalmente com lipídios bioativos atuando como novos alvos para quimioterapia.

## CONCLUSÕES

- a) A amostra de EGB (tipo capsular III-líquor) foi capaz de aderir e invadir as células endoteliais da veia umbilical humana;
- b) O uso da M $\beta$ CD (depletor de colesterol) foi capaz reduzir a aderência e invasão de EGB em HUVEC através da desorganização dos ML;
- c) O inibidor LY294002 foi capaz reduzir a invasão e aumentar a aderência de EGB em HUVEC através da inibição da via PI3K;
- d) Associação preferencial do EGB com ML lineares (enriquecidos pela proteína Flotilina) durante a interação EGB-HUVEC;
- e) Maior associação as ML caveolares (enriquecidos com a proteína Caveolina) durante a interação EGB-HUVEC após tratamento com M $\beta$ CD;
- f) Durante a interação EGB-HUVEC ocorreu um aumento significativo da fosforilação das proteínas PI3K e Akt após 15 min de interação celular;
- g) Ocorreu diminuição no perfil de fosforilação das proteínas PI3K e Akt após tratamento com M $\beta$ CD;
- h) A infecção de HUVEC com EGB promoveu diminuição significativa do nível de esfingosina-1 fosfato (S1P).

## REFERÊNCIAS

- Aboulaich N., Vainonen J.P., Strålfors P., Vener A.V. Vectorial proteomics reveal targeting, phosphorylation and specific fragmentation of polymerase I and transcript release factor (PTRF) at the surface of caveolae in human adipocytes. *Biochem J.* v. 383(Pt 2) p. 237-48, 2004.
- Adams-Chapman., I., Stoll, B. J. Neonatal infection and long-term neuro developmental outcome in the preterm infant. *Current Opinion in Infectious Diseases.*, v. 19, n. 3, p. 290-297, 2006.
- Adriaanse A. H., Lagendijk I., Muijtjens H.L., Nijhuis J.G., Kollée L. A. Neonatal early onset group B streptococcal infection. A nine-year retrospective study in a tertiary care hospital. *J. Perinat. Med.*, v. 24, n. 5, p. 531-538, 1996.
- Aird W. C. Endothelium as an organ system. *Crit. Care. Med.*, v. 32, p. S271–S279, 2004.
- Albanyan, E. A. & Edwards, M. S. Lectin site interaction with capsular polysaccharide mediates nonimmune phagocytosis of type III group B *Streptococci*. *Infect. Immun.*, v. 68, p. 5794-5802, 2000.
- Amin A., Abdulrazzaq Y. M., Uduman S. Group B streptococcal serotype distribution of isolates from colonized pregnant women at the time of delivery in United Arab Emirates. *J Infect.*, v. 45 p. 42-6, 2002.
- Amiya E. Interaction of hyperlipidemia and reactive oxygen species: Insights from the lipid-raft platform. *World J Cardiol.*, v. 8(12) p. 689-694, 2016.
- Anderson-Berry, A. L., Bellig, L. L., Ohning, B. L. Neonatal Sepsis. University of Nebraska Medical Center, Omaha, 2006.
- Apgar B. S., Greenberg G., Yen G. Prevention of group B streptococcal disease in the newborn. *Am. Fam. Physician.*, v. 71, n. 5, p. 903-910, 2005.
- Areschoug, T., Stalhammar-Carlemalm, M., Larsson, C., Lindahl, G. Group B streptococcal surface proteins as targets for protective antibodies: identification of two novel proteins in strains of serotype V. *Infect. Immun.*, v. 67, p. 6350-6357, 1999.
- Ashkar A.A., Santo J. P. D. and Croy B. A. Interferon-g contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J. Exp.Med.*, v. 192, p. 259-269, 2000.
- Baker, C. J., Paoletti, L. C., Wessels, M. R., Guttormsen, H. K., Rench, M. A., Hickman, M. E., Kasper, D. L. Safety and immunogenicity of capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccines for group B streptococcal types Ia and Ib. *J. Infect. Dis.*, v. 179, n. 1, p. 142-150, 1999.
- Baker N., Sohn J., Tuan RS. Promotion of human mesenchymal stem cell osteogenesis by PI3-kinase/AKT signaling and the influence of caveolins-1/cholesterol homeostasis. *Stem Cell Res Ther.*, v.6 p. 238, 2015.

Baron J. M., Bolduc G. R., Goldberg M. B., Auperin T. C. and Madoff L. C. Alpha C protein of group B Streptococcus binds host cell surface glycosaminoglycan and enters cells by an actin-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.*, v. 279, p. 24714–24723, 2004.

Baron M. J., Filman D. J., Prophete G. A., Hogle J. M., Madoff L. C. Identification of a glycosaminoglycan binding region of the  $\alpha$ C protein that mediates entry of Group B Streptococci into host cells. *J. Biol. Chem.*, v. 282, p. 10526–10536, 2007.

Basset, C., Holton, J., O'Mahony, R. & Roitt, I. Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine*, v. 21, p. 12-23, 2003.

Bazzoni G. and Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol. Rev.*, v. 84, p. 869-901, 2004.

Beigverdi R., Jabalameli F., Mirsalehian A. Virulence factors, antimicrobial susceptibility and molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women. *Acta Microbiol Immunol Hung.*, v. 61 p. 425-34, 2014.

Benchetrit, L. C., Fracalanza, S. E. L., Peregrino, H., Camelo, A. A. & Sanches, L. A. L. R. Carriage of *Streptococcus agalactiae* in women and neonates and distribution of serological types: a study in Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, v. 15, n. 5, p. 787-790, 1982.

Berti F., Campisi E., Toniolo C., Morelli L., Crotti S., Rosini R., Romano MR., Pinto V., Brogioni B., Torricelli G., Janulczyk, R., Grandi, G., Margarit, I. Structure of the type IX group B Streptococcus capsular polysaccharide and its evolutionary relationship with types V and VII. *J Biol Chem.*, v. 289(34) p. 23437-48, 2014.

Bertini G., Dani C., Cianciulli D., Rubaltelli F. F., Nicoletti P. J. A trial of preventing early and late onset Group B streptococcal sepsis with combined intrapartum chemoprophylaxis and universal neonatal screening. *Perinat. Med.*, v. 34, n. 5, p. 420-4, 2006.

Betz, J., Bielaszewska, M., Thies, A., Humpf, H.U., Dreisewerd, K., Karch, H., Kim, K.S., Friedrich, A.W., Betzet, J.M. Shiga toxin glycosphingolipid receptors in microvascular and macrovascular endothelial cells: differential association with membrane lipid raft microdomains. *J Lipid Res.*, v. 52(4) p. 618–634, 2011.

Bickel, P. E., Scherer, P. E., Schnitzer, J. E., Oh, P., Lisanti, M. P. and Lodish, H. F. Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J. Biol. Chem.*, v. 272 p. 13793–13802.

Bisharat, N., Crook, D. W., Leigh, J., Harding, R. M., Ward, P. N., Coffey, T. J., Maiden, M. C., Peto, T., Jones, N. Hyperinvasive neonatal group B *Streptococcus* has arisen from a bovine ancestor. *J. Clin. Microbiol.*, p. 2161-2167, 2004.

Blume-Jensen P. & Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature.*, v. 411(6835) p. 355-365, 2001.

Böttcher, R.T. & Niehrs, C. Fibroblast Growth Factor signaling during early vertebrate development. *Endocrinology Reviews.*, v. 26(1) p. 63-77, 2005.

Bouillon, M., El Fakhry, Y., Girouard, J., Khalil, H., Thibodeau, J., Mourad W. Lipid raft-dependent and -independent signaling through HLA-DR molecules. *J Biol Chem.*, v. 278(9) p. 7099–107, 2003.

Brian P. Head, Hemal H. Patel, Paul A. Insel. Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: Membrane/Lipid Rafts, Mediators of Cytoskeletal Arrangement and Cell Signaling. *Biochim Biophys Acta.*, v. 1838(2) p. 10.1016, 2016.

Briones, M.A.; Phillips, D. J.; Renshaw, M.A. & Hooper, W.C. Expression of chemokine by human coronary-artery and umbilical vein endothelial cells and its regulation by inflammatory cytokines. *Coron. Artery. Dis.*, v. 12, p. 179-186, 2001.

Brown D. Structure and function of membrane rafts. *Int J Med Microbiol.*, v. 291(6–7) p. 433–437, 2002.

Brown, C.K.; Gu, Z. Y.; Matsuka, Y.V.; Purushothaman, S. S.; Winter, L. A.; Cleary, P.P.; Olmsted, S.B.; Ohlendorf, D.H.; Earhart; C.A. Structure of the *Streptococcal* cell wall C5a peptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 102, p. 18391-18396, 2005.

Browman, D.T., Hoegg, M.B. and Robbins, S.M. The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers. *Trends Cell Biol.*, v. 17 p. 394–402, 2007.

Brzywczy-Wloch M., Gosiewski T. and Bulanda M. Multilocus sequence types of invasive and colonizing neonatal group B streptococci in Poland. *Med. Princ. Pract.*, v. 23 p. 323 and 330, 2014.

Blommaert, E.F., Krause, U., Schellens, J.P., Vreeling-Sindelárová, H., Meijer, A.J. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem.*, v. 243 p. 240-6, 1997

Brown, D.A., and J.K. Rose. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell.*, v. 68 p. 533–544, 1992.

Burnham, C.A., Shokoples, S.E., Tyrrell, G.J. Invasion of HeLa cells by group B streptococcus requires the phosphoinositide-3-kinase signalling pathway and modulates phosphorylation of host-cell Akt and glycogen synthase kinase-3. *Microbiology.*, v. 153(Pt 12) p. 4240-52, 2007.

Camerer, E., Regard, J. B., Cornelissen, I., Srinivasan, Y., Duong, D. N., Palmer, D., Pham, T. H., Wong, J. S., Pappu, R. and Coughlin, S. R. Sphingosine-1-phosphate in the plasma compartment regulates basal and inflammation-induced vascular leak in mice. *J. Clin. Invest.*, v. 119 p. 1871-1879, 2009.

Cano V., March C., Insua J.L., Aguiló N., Llobet E., Moranta D., Regueiro V., Brennan G.P., Millán-Lou M.I., Martín C., Garmendia J., Bengoechea JÁ., *Klebsiella pneumoniae* survives within macrophages by avoiding delivery to lysosomes. *Cell Microbiol.*, v. 17(11) p. 1537-60, 2015.

- Cantley, L.C. The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science*. 296(5573): 1655-1657, 2002.
- Caposio, P., Gugliese, F., Zanneti, C., Sponza, S., Mondini, M., Medico, E., Hiscott, J., Young, H.A., Gribaudo, G., Gariglio, M. and Landolfo, S. A novel role of the interferon-inducible protein IFI16 as inducer of proinflammatory molecules in endothelial cells. *J. Bio. Chem.*, v. 282, p. 33515-33529, 2007.
- Calhoun, W.I., Shipley G.G. Sphingomyelin-lecithin bilayers and their interaction with cholesterol. *Biochemistry*. v. 18(9) p. 1717-22, 1979 *apud* Amir M., Farnoud A.M.T., Konopka J.B., Del Poeta M., London E. Raft-Like Membrane Domains in Pathogenic Microorganisms. *Curr Top Membr.*, 2016.
- Carlin, A. F., Uchiyama, S., Chang, Y. C., Lewis, A. L., Nizet, V., Varki, A. Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response. *Blood.*, v. 113, p. 3333–3336, 2009.
- Chadda R. and Mayor S. PTRF triggers a cave in. *Cell*. v. 132(1) p. 23-4, 2008.
- Chaffin, D. O., Mentele, L. M., Rubens, C. E. Sialylation of group B streptococcal capsular polysaccharide is mediated by *cpsK* and is required for optimal capsule polymerization and expression. *J. Bacteriol.*, v. 187, p. 4615-4626, 2005.
- Chang, Y.C., Olson, J., Beasley, F.C., Tung, C., Zhang, J., Crocker, P.R., Varki, A., Nizet, V. Group B Streptococcus engages an inhibitory Siglec through sialic acid mimicry to blunt innate immune and inflammatory responses *in vivo*. *PLoS Pathog.*, v. 10 (1) p. 1003846, 2014.
- Charruyer, A., Grazide, S., Bezombes, C., Muller, S., Laurent, G., Jaffrezou, J.P. UV-C light induces raft-associated acid sphingomyelinase and JNK activation and translocation independently on a nuclear signal. *J Biol Chem.*, v. 280(19) p. 19196–204, 2005.
- Chaves, R.N., Lima, I.M.T., Duarte, A.B.G., Buratini, Jr J. and Figueiredo, J.R. Structural Characterization of the Fibroblast Growth Factor-10 (FGF-10) and its Role in Ovarian Follicular Physiology. *Acta Scientiae Veterinariae.*, v. 39(4) p. 990, 2011.
- Cheng, Q., Carlson, B., Pillai, S., Eby, E.L., Olmsted, S.B. & Cleary, P. Antibody against surface-bound C5a peptidase is opsonic and initiates macrophage killing of group B streptococci. *Infect. Immun.*, v. 69, p. 2302-2308, 2001.
- Cheng, Q., Stafslin, D., Purushothaman, S. S. and Cleary, P. The group B *Streptococcal* C5a peptidase is both a specific protease and an invasin. *Infect. Immun.*, v. 70, n. 5, p. 2408-2413, 2002.
- Christie, R., Atkins, N. E. & Munch-Petersen, E. A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, v. 22, p. 197–200, 1944.
- Cieslewicz, M. J., Chaffin, D., Glusman, G., Kasper, D., Mandan, A., Rodrigues, S., Fahey, J., Wessels, M. R., Rubens, C. E. Structural and Genetic Diversity of Group B Streptococcus Capsular Polysaccharides. *Infect. Immun.*, v. 73, n. 5, p. 3096-3103, 2005.

Cinamon, G., Zachariah, M. A., Lam, O. M., Foss, F. W., Jr. and Cyster, J. G. Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nat. Immunol.*, v.9 p. 54-62, 2008.

Cines, D. B., Pollak, E.S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P., Pober, J. S., Wick, T.M., Konkle, B. A., Schwartz, B.S. Barnathan, E. S., McCrae, K. R., Hug, B. A. Schmidt, A.M. and Stern, D. M. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *J. Am. Soc. Hemat.*, v. 91, n. 10, p. 3527-3561, 1998.

Coant N, Sakamoto W., Mao C, Hannun Y.A. Ceramidases, roles in sphingolipid metabolism and in health and disease. *Adv Biol Regul.* v. S2212-4926(16) p. e30058-6. 2016.

Cohen, J. J. Apoptosis. *Immunol. Today.*, v. 14, p. 126, 1993.

Connors, A.K. The stability of cyclodextrin complexes in solution. *Chem. Rev.*, v. 97 p. 1257-1325, 1997.

Cornacchione, P., Scaringi, L., Fettucciari, K., Rosati, E., Sabatini, R., Orefici, G., von Hunolstein, C., Modesti, A., Modica, A., Minelli, F. & Marconi, P. Group B *Streptococci* persist inside macrophages. *Immunol.*, v. 93, p. 86-95, 1998.

Costa A. F., Pereira C. S., Santos G. da S., Carvalho T. M., Hirata R. Jr., De Mattos-Guaraldi A. L., Rosa A. C., Nagao P. E. Group B *Streptococcus* serotypes III and V induce apoptosis and necrosis of human epithelial A549 cells. *Int. J. Mol. Med.*, v. 27, n. 5, p. 739-44, 2011.

Costa, A. L. R., Lamy Filho, F., Chein, M. B. C. Prevalência de colonização por *Streptococcus* do grupo B em gestantes atendidas em maternidade pública da região Nordeste do Brasil. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, v. 30, n. 6, p. 274-280, 2008.

Cox F., Taylor L., Eskew E. K. and Mattingly S. J. Prevention of group B streptococcal colonization and bacteremia in neonatal mice with topical vaginal inhibitors. *J. Infect. Dis.*, v. 167, p. 1118-1122, 1993.

Coombes, B.K., Johnson, D.L., Mahony, J.B. Strategic targeting of essential host-pathogen interactions in chlamydial disease. *Curr Drug Targets Infect Disord.*, v. 2(3) p. 201-16, 2002.

Custódio, R., McLean, C.J., Scott, A.E., Lowther, J., Kennedy, A., Clarke, D.J., Campopiano, D.J., Sarkar-Tyson, M., Brown, A.R. Characterization of secreted sphingosine-1-phosphate lyases required for virulence and intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei*. *Mol Microbiol.*, v. 102(6) p. 1004-1019, 2016.

Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P.G., Coso, O.A., Gutkind, S., Spiegel, S. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature.*, v. 381 p. 800-803, 1996.

Cunha, V., Davies, M.R., Douarre, P.E. *Streptococcus agalactiae* clones infecting humans were selected and fixed through the extensive use of tetracycline, *Nat. Commun.*, v. 5 p. 4544, 2014.



Cywes, C., Wessels, M.R. Group A Streptococcus tissue invasion by CD44-mediated cell signalling. *Nature.*, v. 414(6864) p. 648-52, 2001.

Davidson, S.M. Endothelial mitochondria and heart disease. *Cardiovasc Res.*, v. 88 p. 58–66, 2010.

Deshmukh, H.S., Liu, Y., Menkiti, O.R. The microbiota regulates neutrophil homeostasis and host resistance to *Escherichia coli* K1 sepsis in neonatal mice. *Nat Med.*, v. 20 p. 524–30, 2014.

Dilshara, M.G., Lee, K.T., Jayasooriya, R.G., Kang, C.H., Park, S.R., Choi, Y.H., Choi, I.W., Hyun, J.W., Chang, W.Y., Kim, Y.S., Lee HJ, Kim GY. Downregulation of NO and PGE2 in LPS-stimulated BV2 microglial cells by trans-isoferulic acid via suppression of PI3K/Akt-dependent NF- $\kappa$ B and activation of Nrf2-mediated HO-1. *Int Immunopharmacol.*, v. 18(1) p. 203-11, 2014

Doherty, G.J. and McMahon, H.T. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem.*, v. 78 p. 857-902, 2009.

Dombek PE, Cue D, Sedgewick J, Lam H, Ruschkowski S, Finlay BB, Cleary PP. High-frequency intracellular invasion of epithelial cells by serotype M1 group A streptococci: M1 protein-mediated invasion and cytoskeletal rearrangements. *Mol Microbiol.*, v. 31(3) p. 859-70, 1999.

Dogan, B., Schukken, Y. H., Santisteban, C. Distribution of serotypes and antimicrobial resistance genes among *Streptococcus agalactiae* isolates from bovine and human hosts. *J Clin Microbiol.*, v. 43 p. 5899-906, 2005.

Doran, K. S., Engelson, E. J., Khosravi, A., Maisey, H. C., Fedtke, I., Equils, O., Michelsen, K. S., Arditi, M., Peschel, A. and Nizet, V. Blood-brain barrier invasion by group B Streptococcus depends upon proper cell surface anchoring of lipoteichoic acid. *J. Clin. Invest.*, v. 115, p. 2499-2507, 2005.

Doran, K. S., Fulde, M., Gratz, N., Kim, B. J., Nau, R., Prasadarao, N., Unkmeir, A.S., Tuomanen, E. I. and Weigand, P. V. Host–pathogen interactions in bacterial meningitis. *Acta Neuropathol.*, v. 131, p. 185–209, 2016.

Doran, K. S., Liu, Y. & Nizet, V. Group B *Streptococcal*  $\beta$ -hemolysin/cytolysin activates neutrophil signaling pathways in brain endothelium and contributes to development of meningitis. *J. Clin. Invest.*, v. 112, p. 736-744, 2003.

Doran, K. S., Nizet, V. Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy. *Mol. Microbio.*, v. 54, n. 1, p. 23-31, 2004.

Edmond, K.M., Kortsalioudaki, C., Scott S., Schrag, S.J., Zaidi A.K., Cousens S., Heath P.T. Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta-analysis. *Lancet.*, v. 379, p. 547–556, 2012.

- Edwards, M. S. & Baker, C. J. *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*). In: *Principles and practice of infectious diseases*. 5 ed. Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, p. 2156-2167, 2001.
- Edwards, M. S. and Baker, C. J. Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin. Infect. Dis.*, v. 41, p. 839-847, 2005.
- Eierhoff, T., Bastian, B., Thuenauer, R., Madl, J., Audfray, A., Aigal, S., Juillot, S., Rydell, G.E., Müller, S., de Bentzmann, S., Imberty Fleck, C., Romer, W. A lipid zipper triggers bacterial invasion. *Proc Natl Acad Sci.*, v. 111(35) p. 12895-900, 2014.
- Emaneni, M., Mirsalehian, A. and Beigvierdi, R. High Incidence of Macrolide and Tetracycline Resistance among *Streptococcus agalactiae* Strains Isolated from Clinical Samples in Tehran, Iran, *Maedica (Buchar)*, v. 9 p. 157-61, 2014.
- Engelman, J.A., Luo, J. and Cantley, L.C. The evolution of PI3K as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*. v. 7(8) p. 606-619, 2006.
- Farley, M. M. Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clin. Infect. Dis.*, v. 33, p. 556-561, 2001.
- Fehrenbach, F. J., Schmidt, C. M., Sterizik, B., Jürgens, D., Alouf J. E., Fehrenbach, F. J., Freer, J.H and Jeljaszewicz, J. (Eds.). *Bacterial Protein Toxins*. San Diego: Academic Press. p. 317-324, 1984.
- Fettucciari, K. *et al.* Macrophage induced gelsolin in response to Group B Streptococcus (GBS) infection. *Cell Microbiol.* v. 17, n. 1, p. 79-104, 2015.
- Fielding, C.J., Fielding, P.E. Intracellular cholesterol transport. *J. Lipid Res.*, v. 38 p. 1503-1521, 1997.
- Fiolo, K., Zanardi, C.E., Salvadego, M. Infection rate and *Streptococcus agalactiae* serotypes in samples of infected neonates in the city of Campinas (São Paulo), Brazil. *Rev Bras Ginecol Obstet.*, v. 34 p. 544-9, 2012.
- Fluegge, K., Supper, S., Siedler, A., Berner, R. Serotype distribution of invasive group B streptococcal isolates in infants: results from a nationwide active laboratory surveillance study over 2 years in Germany. *Clin. Infect. Dis.*, v. 40, p. 760-763, 2005.
- Fra, A.M., Williamson, E., Simons, K., Parton, R.G. Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae. *J Biol Chem.*, v. 269(49) p. 30745-8, 1994.
- Franquelim, H.G., Schwille, P., Trauner, D., Frank, J.A. Optical Control of Lipid Rafts with Photoswitchable Ceramides. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 8(3) p.185-94, 2016.
- Frey, M.N., Ioppi, A.E., Bonamigo, R.R., Prado, G.P. *Streptococcus agalactie* involved in the etiology of Sexually Transmitted Diseases. *An Bras Dermatol.* v. 86 p.1205-7, 2011.

- Frick, M., Bright, N.A., Riento, K., Bray, A., Merrified, C. and Nichols, B.J. Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding. *Curr. Biol.*, v. 17 p. 1151–1156, 2007.
- Garcia, M.V., Monteiro, A.C., Szabó, M.P.J., prette, N., Bechara, G.H. Mechanism of infection and colonization of *Rhipicephalus sanguineus* eggs by *Metharhizium anisopliae* as revealed by scanning electron microscopy and histopathology. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.36, p. 368-372, 2005.
- Gagnon, V., St-Germain, M.E., Parent, S., Asselin, E. Akt Activity in Endometrial Cancer Cells: Regulation of Cell Survival Through cIAP-1. *Int J Oncol.*, v 23 (3) p. 803-810, 2003.
- Galley, H. F. & Webster, N. R. Physiology of the endothelium. *Br. J. Anaesth.*, p. 1-9, 2004.
- Gharbi, S.I., Marketa, J. Zvelebil, Stephen, J. Shuttleworth, Tim Hancox, NahidSaghir, John F. Timms, Michael D. Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *Biochem.*, v. 404 (1) p. 15-21, 2007.
- Garcia, J. G., Liu, F., Verin, A. D., Birukova, A., Dechert, M. A., Gerthoffer, W. T., Bamberg, J. R. and English, D. Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J. Clin. Invest.*, v.108 p. 689-701, 2001.
- Garg, S.K., Volpe, E., Palmieri, G. Sphingosine 1-Phosphate Induces Antimicrobial Activity Both *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Infectious Diseases.*, v. 189 p. 2129-38, 2004.
- Gase, K., Ozegowski, J. & Malke, H. The *Streptococcus agalactiae hylB* gene encoding hyaluronate lyase: completion of the sequence and expression analysis. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1398, p. 86-98, 1998
- Gibbs, R. S., Schrag, S., Schuchat, A. Perinatal infections due to Group B streptococci. *Obstet. Gynecol.*, v. 104, p. 1062-1076, 2004.
- Gibson, R. L., Lee, M. K., Soderland, C., Chi, E. Y. & Rubens, C. E. Group B *Streptococci* invade endothelial cells: Type III capsular polysaccharide attenuates invasion. *Infect. Immun.*, v. 61, p. 478-485, 1993.
- Glebov, O.O., Bright, N. A. and Nichols, B. J. Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.*, v. 8 p. 46–54, 2006.
- Goswami, D., Gowrishankar, K., Bilgrami, S., Ghosh S., Raghupathy, R., Chadda, R., Vishwakarma, R., Rao M., Mayor, S. Nanoclusters of GPI-anchored proteins are formed by cortical actin-driven activity. *Cell.*, v. 135(6) p. 1085-97, 2008.
- Goldston, A. M., Powell, R. R., Koushik, A. B., Temesvari, L. A. Exposure to Host Ligands Correlates with Colocalization of Gal/GalNAc Lectin Subunits in Lipid Rafts and Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphate Signaling in *Entamoeba histolytica*. *Eukaryotic Cell.*, v. 11(6) p. 743–751, 2012.

Goluszko, P., Popov, V., Wen, J., Jones, A., Yallampalli, C. Group B streptococcus exploits lipid rafts and phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway to invade human endometrial cells. *Am J Obstet Gynecol.*, v. 199(5) p. 548, 2008.

Gowrishankar, K., Ghosh, S., Saha, S.C.R., Mayor, S., Rao, M. Active remodeling of cortical actin regulates spatiotemporal organization of cell surface molecules. *Cell.*, v. 149(6) p. 1353-67, 2012.

Greco, R., De Martino, L., Donnarumma, G., Conte, M.P., Seganti, L., Valenti, P. Invasion of cultured human cells by *Streptococcus pyogenes*. *Res Microbiol.*, v. 146(7) p. 551-60, 1995 .

Grimwood, K., Stone, P. R., Gosling I. A., Green, R., Darlow, B. A., Lennon, D. R. Late antenatal carriage of group B *Streptococcus* by New Zealand women. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.*, v. 42, n. 2, p. 182-6, 2002.

Guignot, J., Bernet-Camard, M.F., Poüs, C., Plançon, L., Le Bouguenec, C., Servin, A.L. Polarized entry of uropathogenic Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* strain IH11128 into human epithelial cells: evidence for  $\alpha 5\beta 1$  integrin recognition and subsequent internalization through a pathway involving caveolae and dynamic unstable microtubules. *Infect Immun.*, v. 69(3) p.1856-68, 2001.

Guillaume, E., Comunale, F., Do Khoa, N., Planchon, D., Bodin, S. and Gauthier-Rouvière, C. Flotillin microdomains stabilize cadherins at cell-cell junctions. *J. Cell Sci.*, v. 126, 2013.

Gupta, G. and Surolia, A. Glycosphingolipids in microdomain formation and their spatial organization. *FEBS Lett.*, v. 584 p.1634–1641, 2010.

Gutekunst, H., Eikmanns, B. J. & Reinscheid, D. J. The novel fibrinogen-binding protein FbsB promotes *Streptococcus agalactiae* invasion into epithelial cells. *Infect. Immun.*, v. 72, p. 3495-3504, 2004.

Haalas, O., Liabakk, N. B., Vik, R.; Beninati, C., Henneke, P., Sundan, A. and Espevik, T. Interferons release tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Scand. J. Immun.*, v. 60, p. 74-81, 2004.

Hait, N.C., Oskeritzian, C.A., Paugh, S.W., Milstien, S., Spiegel, S. Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1758 p. 2016–2026, 2006.

Hakansson, S., Källén, K. Impact and risk factors for early-onset group B streptococcal morbidity: analysis of a national, population-based cohort in Sweden 1997-2001. *BJOG.*, v. 113, n. 12, p. 1452-1458, 2006.

Han, B., Tiwari, A., Kenworthy, A.K. Tagging strategies strongly affect the fate of overexpressed caveolin-1. *Traffic.*, v. 16(4) p. 417–438, 2015.

Hannun, Y.A., Obeid, L.M. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, v. 9 p. 139–150, 2008.

Harada, J., Foley, M., Moskowitz, M. A. and Waeber, C., Sphingosine-1-phosphate induces proliferation and morphological changes of neural progenitor cells. *J Neurochem.*, v. 88 p.1026-1039, 2004.

Harrison, L. H., Elliott, J. A., Dwyer, D. M. Serotype distribution of invasive group B streptococcal isolates in Maryland: implications for vaccine formulation. Maryland Emerging Infections Program. *J. Infect. Dis.*, v. 177, p. 998-1002, 1998.

Hawthorne, J.N. A note on the life of J.L.W. Thudichum (1829-1901). *Biochemical Society transactions.*, v. 3(5) p. 591, 1975.

Hawkes, D.J., Mak, J. Lipid membrane; a novel target for viral and bacterial pathogens. *Curr Drug Targets.*, v. 7(12) p. 1615-21, 2006.

Head, J.R., Gacoch, L., Pennisi, M., Meyers, J.R. Huttner & Zimmerberg, Activation of canonical Wnt/ $\beta$ catenin signaling stimulates proliferation in neuromasts in the zebra fish posterior lateral line. *Dev Dyn.*, v. 242(7) p. 832-46, 2001.

Head, B.P., Patel, H.H., Roth, D.M., Murray, F., Swaney, J.S., Niesman, I.R., Farquhar, M.G., Insel, P.A., Microtubules and actin microfilaments regulate lipid raft/caveolae localization of adenylyl cyclase signaling components. *J Biol Chem.*, v. 281(36) p. 26391-9, 2006.

Head, B.P., Patel, H.H., and Insel, P.A. Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: Membrane/Lipid Rafts, Mediators of Cytoskeletal Arrangement and Cell Signaling. *Biochimica et Biophysica Acta.*, v. 1838(2) p. 10.1016, 2013.

Hellerqvist, C. G, Sundell, H., Gettins, P. Molecular basis for group B beta-streptococcal disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 84, n. 1, p. 51-5, 1987.

Hellerqvist, C. G., Rojas, J., Green, R. S., Sell, S., Sundell, H., Stahlman, M. T. Studies on group B beta-hemolytic Streptococcus. I. Isolation and partial characterization of an extracellular toxin. *Pediatr. Res.*, v. 15, n. 6, p. 892-8, 1981.

Hellerqvist, C., DeVore, R., Thurman, G., Wamil, B., Zhang, M., Wakefield, G., Sundell, H, Carter, C., Yan, H., Johnson, D. Cytokine production in cancer patients receiving the anti-neovascularization drug CM-101. *ASCO Annual Meeting.*, n. 1592, 1995.

Hemdan, N.Y., Weigel, C., Reimann, C.M., Graler, M.H. Modulating sphingosine 1-phosphate signaling with DOP or FTY720 alleviates vascular and immune defects in mouse sepsis. *Eur J Immunol.*, v.46 (12) p. 2767-2777, 2016.

Henneke, P., Morath, S., Uematsu, S., Weichert, S., Pfitzenmaier, M., Takeuchi, O., Muller, A., Poyart, C., Akira, S., Berner, R., Teti, G., Geyer, A., Hartung, T., Trieu-Cuot, P., Kasper, D.L and Golenbock, D. T. Role of lipoteichoic acid in the phagocyte response to group B streptococcus. *J. Immunol.*, v. 174, p. 6449-6455, 2005.

Hickman, M., Rench, M., Ferrierie, P., Baker, C. Changing epidemiology of group B streptococcal colonization. *Pediatr.*, v. 104, p. 203-209, 1999.

- Honigsmann, A. and Pralle, A. Compartmentalization of the cell membrane. *J Mol Biol.*, v. 428p. 4739, 2016.
- Huang, F.C. Plasma membrane cholesterol plays a critical role in the Salmonella-induced anti-inflammatory response in intestinal epithelial cells. *Cell Immunol.*, v. 271(2) p. 480-7, 2011.
- Huttner, W.B., and Zimmerberg, J. Implications of lipid microdomains for membrane curvature, budding and fission. *Curr. Opin. Cell Biol.*, v. 13 p. 478–484, 2001.
- Ireton, K, Payrastra, B, Cossart, P. The *Listeria monocytogenes* protein InlB is an agonist of mammalian phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem.*, v. 11;274(24) p. 17025-32, 1999.
- Jackson, L. A., Hilsdon, R., Farley, M. M., Harrison, L.H., Reingold, A.L., Plikaytis, B. D., Wenger, J. D., Schuchat, A. Risk factors for group B streptococcal disease in adults. *Ann. Intern. Med.*, v. 123, p. 415-420, 1995.
- Jaffe, E. A.; Nachman, R. L.; Becker, C. G. & Minick, R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification of morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.*, v. 221, p. 281-283, 1973.
- Jaffe, E.A. Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol.*, v. 18 p. 234–239, 1987.
- Jans, R., Atanasova, G., Jadot, M., Poumay, Y. Cholesterol depletion upregulate involucrin expression in epidermal keratinocytes through activation of p38. *J Invest Dermatol.*, v. 123(3) p. 564-73, 2004.
- Jin, X. *et al.* Inhibition of AKT survival pathway by a small molecule inhibitor in human endometrial cancer cells. *Br J Cancer.* v. 91 p. 1808-12, 2004.
- Jiang, J. H., Chiu, N. C., Huang, F. Y., Kao, H. A., Hsu, C. H., Hung, H. Y., Chang, J. H., Peng, C. C. Neonatal sepsis in the neonatal intensive care unit: characteristics of early versus late onset. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection.*, v. 37, n. 5, p. 301-306, 2004.
- John, G.B., Shidler, M.J., Besmer, P. and Castrillon, D.H. Kit signaling via PI3K promotes ovarian follicle maturation but is dispensable for primordial follicle activation. *Developmental Biology.*, v. 331(2) p. 292-299, 2009.
- Johri, A.K., Lata, H., Yadav, P., Dua, M., Yang, Y., Xu, X., Homma, A., Barocchi, M.A., Bottomley, M.J., Saul, A., Klugman, K.P. and Black, S. Epidemiology of Group B Streptococcus in developing countries. *Vaccine.*, v. 31, p. D43–D45, 2013.
- Johri, A. K., Paoletti, L. C., Glaser, P., Dua, M., Sharma, P. K., Grandi, G., Rappuoli, R. Group B Streptococcus: global incidence and vaccine development. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 4, n. 12, p. 932-942, 2006.
- Junqueira, L. C. & Carneiro J. *Histologia Básica*. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

Jürgens, D., Sterzik, B. and Fehrenbach, F. J. Unspecific binding of group B streptococcal cytolyisin (CAMP-factor) to immunoglobulins and its possible role in pathogenicity. *J. Exp. Med.*, v. 165, p. 720-732, 1987.

Jutras, I., Abrami, L., Dautry-Varsat, A. Entry of the lymphogranuloma venereum strain of *Chlamydia trachomatis* into host cells involves cholesterol-rich membrane domains. *Infect Immun.*, v. 71 p. 260–266, 2003.

Kabouridis, P.S., Janzen, J., Magee, A.L., Ley, S.C. Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *Eur J Immunol.*, v. 30(3) p. 954-63, 2000

Kaplan, A., Chung, K., Kocak, H., Bertolotto, C., Uh, A., Hobel, C. J., Simmons, C. F., Doran, K., Liu, G. Y. and Equils, O. Group B *Streptococcus* induces trophoblast death. *Microb. Pathog*, v. 45, p. 231-235, 2008.

Kim, J. H., Peng, D., Schleich, J. P., Hadziselimovic, A., Sanders, C. R. Modest effects of lipid modifications on the structure of caveolin-3. *Biochemistry*, v.53(27), p.4320–4322, 2014.

Kilsdonk, E. P., Yancey, P. G., Stoudt, G. W., Bangerter, F. W., Johnson, W. J., Phillips, M. C., Rothblat, G. H. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J Biol Chem*, v.270(29), p.17250-17256, 1995.

Kiss, A. L., Aacute, T. G., Müller, N., Kántor, O., Botos, E. Caveolae and caveolin isoforms in rat peritoneal macrophages. *Micron*, v. 33(1), p.75–93, 2002.

Kitatani, K., Idkowiak-Baldys, J., Hannun, Y.A. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell. Signal*, v.20 p.1010–1018, 2008.

Klein, C. Towards Structure-based Drug Design: Crystal Structure of a Multisubstrate Adduct Complex of Glycinamide Ribonucleotide Transformylase at 1.96 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*, v. 249, p. 26, 1995.

Koenig, J. M., and Keenan, W. J. Group B *Streptococcus* and early-onset sepsis in the era of maternal prophylaxis. *Pediatr. Clin. North. Am.*, v.56, p.689-708, 2009.

Kogan, G., Uhrin, D., Brison, J. R., Paoletti, L. C., Blodget, A. E., Kasper, D. L. and Jennings, H. J. Structural and immunochemical characterization of type VIII group B *Streptococcus* capsular polysaccharide. *J. Biol. Chem*, v.271, p.8786-8700, 1996.

Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C. and Winn, W. C. Jr. The gram-positive cocci: Part II: *Streptococci*, *Enterococci*, and the “*Streptococci-like*” Bacteria. In: *Diagnostic Microbiology*. 5 ed. USA: ED Lippincott, p. 577-603, 1997.

Kong, F., Lambertsen, L. M., Slotved, H. C., Ko, D., Wang, H., Gilbert, G. L. Use of phenotypic and molecular serotype identification methods to characterize previously nonserotypeable group B streptococci. *J. Clin. Microbiol*, v.46, p.2745-2750, 2008.

Korhonen, J. T., Puolakkainen, M., Haveri, A., Tammiruusu, A., Sarvas, M., Lahesmaa, R. Chlamydia pneumoniae entry into epithelial cells by clathrin-independent endocytosis. *MicrobPathog*, v.52, p.157–164, 2012.

Korir, M. L., Knupp, D., LeMerise, K., Boldenow, E., Loch-Caruso, R., Aronoff, D. M. and Manning, S.D. Association and virulence gene expression vary among serotype III group B streptococcus isolates following exposure to decidual and lung epithelial cells. *Infect Immun*. v. 82, p. 4587-4595, 2014.

Kultti, A., Kärnä, R., Rilla, K., Nurminen, P., Koli, E., Makkonen, K. M., Si, J., Tammi, M. I., Tammi, R. H. *J BiolChem.*, v.285(30), p.22901–22910, 2010.

Kwok T., Backert, S., Schwarz, H., Berger, J., Meyer, T. F. Specific entry of *Helicobacter pylori* into cultured gastric epithelial cells via a zipper-like mechanism. *Infect. Immun*, v.70, 2002.

Kwak, D. J., Augustine, N. H., Borges, W. G., Joyner, J. L., Green, W. F. and Hill, H. R. Intracellular and extracellular cytokine production by human mixed mononuclear cells in response to group B streptococci. *Infect. Immun*, v.68, p.320-327, 2000.

Kwok, T., Backert, S., Schwarz, H., Berger, J., Meyer, T. F. Specific entry of *Helicobacter pylori* into cultured gastric epithelial cells via a zipper-like mechanism. *Infect. Immun*, v.70, p. 2108–2120, 2002.

Kwon, H., Lee, J., Jeong, K., Jang, D., Pak, Y. A novel actin cytoskeletondependent noncaveolar microdomain composed of homo-oligomeric caveolin-2 for activation of insulin signaling. *Biochim Biophys Acta.*, v. 1833(10). p. 2176–2189, 2013.

Lachenauer, C. S., Kasper, D. L., Shimada, J., Ichiman, Y., Ohtsuka, H., Kaku, M., Paoletti L. C., Ferrieri P., Madoff L. C. Serotypes VI and VIII predominate among group B streptococci isolated from pregnant Japanese women. *J. Infect. Dis*, v.179, p.1030-1033, 1999.

Lafont, F., van der Goot, F. G. Bacterial invasion via lipid rafts. *Cell Microbiol*. v.7, p.613–620, 2005.

Lalonde, M., Segura, M., Lacouture, S., Gottschalk, M. Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines. *Microbiology.*, v. 146(Pt 8), p.1913–1921, 2000.

Lancefield, R. C. A serological differentiation of specific types of bovine hemolytic streptococci (group B). *J. Exp. Med*, v.59, p.441-458, 1934.

Lang, D. M., Lommel, S., Jung, M., Ankerhold, R., Petrusch, B., Laessing, U., Wiechers, M. F., Plattner, H., Stuermer, C. A. Identification of reggie-1 and reggie-2 as plasmamembrane-associated proteins which cocluster with activated GPI-anchored cell adhesion molecules in non-caveolar micropatches in neurons. *J Neurobiol*, v.37(4), p.502-523, 1998.

Lang, S. and Palmer, M. Characterization of *Streptococcus agalactiae* CAMP factor as a pore-forming toxin. *J. Biol. Chem*, v.278, p.38167-38173, 2003.



- Lang, S., Xue, J., Guo, Z., Palmer, M. *Streptococcus agalactiae* Camp factor binds to GPI-anchored proteins. *Med. Microbiol. Immunol*, v.196, p.1-10, 2007.
- Langhorst, M.F., Reuter, A., Jaeger, F.A., Wippich, F.M., Luxenhofer, G., Plattner, H. and Stuermer, C. A. Trafficking of the microdomain scaffolding protein reggie-1/flotillin-2. *Eur. J. Cell Biol*, v.87, p.211–226, 2008.
- Law, M. R., Palomaki, G., Alfirevic, Z., Gilbert, R., Heath, P., McCartney, C., Reid, T. and Schrag, S. The prevention of neonatal group B streptococcal disease: a report by a working group of the Medical Screening Society. *J. Med. Screen*, v.12, p.60-68, 2005.
- Leib, S. L., Kim, Y. S., Chow, L. L., Sheldon, R. A., Täuber M. G. Reactive oxygen intermediates contribute to necrotic and apoptotic neuronal injury in an infant rat model of bacterial meningitis due to group B streptococci. *J. Clin. Invest*, v.98, p.2632-2639, 1996.
- Lemire, P., Houde, M., Lecours, M. P., Fittipaldi, N., and Segura, M. Role of capsular polysaccharide in Group B *Streptococcus* interactions with dendritic *Microbes Infect*, v.14, p.1064-1076, 2012.
- Lemire, P., Houde, M., Segura, Mariela. Encapsulated group B *Streptococcus* modulates dendritic cell functions via rafts and clathrin-mediated endocytosis. *Cell Microbiol*, v. 14, p. 11, p. 1707-1719, 2012.
- Lemos, J. P. Papel do receptor 1 de esfingosina-1-fosfato nos distúrbios de migração celular intratímica em camundongos NOD. 2014. 89f. Dissertação - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.
- Lencer, W. I. and Tsai B. The intracellular voyage of cholera toxin: going retro. *Trends Biochem Sci*, v.28(12), p.639-645, 2003.
- Levental, I., Grzybek, M., Simons, K. Greasing their way: lipid modifications determine protein association with membrane rafts. *Biochemistry*, v.49(30), p.6305-6316, 2010.
- Levental, I., Veatch, S. L. The continuing mystery of lipid rafts. *J Mol Biol*, v.08, p.022, 2016.
- Li, S. and Jedrzejewski, M. J. Hyaluronan binding and degradation by *Streptococcus agalactiae* hyaluronate lyase. *J. Biol. Chem*, v.276, p. 41407–41416, 2001.
- Lingwood, D. and Simons, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, v. 327 p. 46–50, 2010.
- Lin, B., Hollingshead, S. K., Coligan, J. E., Egan, M. L., Baker, J. R. and Prithard, D. G. Cloning and expression of the gene for group B *Streptococcal* hyaluronate lyase. *J. Biol. Chem*, v.269, p.30113-30116, 1994.
- Lindhal, G., Stalhammar-Carlemalm, M. and Areschoug, T. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. *Clin. Microb. Rev*, v. 18, p. 102-127, 2005.

Lione, V. O. F., Santos, G. S., Júnior, R. H., Mattos-Guaraldi, A. L. and Nagao, P. E. Involvement of intercellular adhesion molecule-1 and  $\beta$ 1 integrin in the internalization process to human endothelial cells of group B *Streptococcus* clinical isolates. *Int. J. Mol. Med.*, v. 15, p. 153-157, 2005.

Lione, V. O. *et al.* Interferon- $\gamma$  inhibits group B *Streptococcus* survival within human endothelial cells. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.109, p.940-943, 2014.

Liu, G. Y., Doran, K. S., Lawrence, T., Turkson, N., Puliti, M., Tissi, L. and Nizet, V. Sword and shield: Linked group B *Streptococcal*  $\beta$ -hemolysin/cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defense. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.101, p. 14491-14496, 2004.

Liu, G.Y. and Nizet, V. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trend. Microb.*, v. 17, p. 406-413, 2009.

Liu P., Rudick, M., Anderson, R. G. Multiple functions of caveolin-1. *J Biol Chem*, v.277(44), p.41295–41298, 2002.

Loftsson, T., Brewster, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.62, p.1607–1621, 2010.

Loftsson, T., Brewster, M. E., Cyclodextrins as functional excipients: methods to enhance complexation efficiency. *J Pharm. Sci.*, v.101, p.3019–3032, 2012.

Luan, S. L., Granlund, M. and Sellin, M. Multilocus sequence typing of Swedish invasive group B streptococcus isolates indicates a neonatally associated genetic lineage and capsule switching. *J. Clin. Microbiol.* v. 43, p.3727-3733, 2005.

Luker, G. D., Pica, C. M., Kumar, A. S., Covey, D. F. and Piwnicka-Worms, D. Effects of cholesterol and enantiomeric cholesterol on P-glycoprotein localization and function in low-density membrane domains. *Biochemistry*, v. 39, p.8692, 2000.

Maceyka, M. and Spiegel, S., Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature*, v. 510, p. 58-67, 2014.

Mahammad, S. and Parmryd, I. Cholesterol depletion using methyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Methods Mol Biol.*, v. 1232 p. 91-102, 2015.

Mai, J., Virtue, A., Shen, J., Wang H. and Xiao-Feng, Y. An evolving new paradigm: endothelial cells – conditional innate immune cells. *Hematol Oncol.*, v. 6, p. 61, 2013.

Maisey, H. C., Doran, K. S., and Nizet, V. Recent advances in understanding the molecular basis of group B *Streptococcus* virulence. *Expert Rev. Mol. Med.*, v. 10, p. e27, 2008.

MacLaren, C. M., Evans, T. A., Alvarado, D. and Duffy, J. B. Comparative analysis of the Kekkone molecules, related members of the LIG superfamily. *Dev. Genes Evol.*, v. 214(7) p. 360-366, 2004.

Mak, R. H. Can plasma iohexol disappearance be used to measure GFR in children with chronic kidney disease? *Nature Reviews Nephrology*, v. 2, p. 608-609, 2006.

Malik, A., Sakamoto, M., Hanazaki, S., Osawa, M., Suzuki, T., Tochigi, M. and Kakii, K. Coaggregation among Nonflocculating Bacteria Isolated from Activated Sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69(10), p. 6056–6063, 2003.

Manes, S., Real, G., Martinez, A. Pathogens: Raft hijackers. *Nat Rev Immunol.*, v. 3, p. 557-568, 2003.

Mantovani, A., Bussolino, F. and Dejana, E. Cytokine regulation of endothelial cell function. *FASEB J.*, v. 6, p. 2591-2599, 1992.

Marchaim, D., Gortzak-Uzan, L., Peled N., Riesenber, K. and Schlaeffer, F. Cell wall proteins of group B streptococcus, low incidence of neonatal disease in southern Israel. *J. Reprod. Med.*, v. 48, n. 9, p. 697–702, 2003.

Martins, Andreza Francisco (Org.). Identificação de cocos gram-positivos. In: *Bacteriologia clínica: manual de aulas práticas*. Porto Alegre: Sulina, p.48-58, 2010.

Mattila, K. J., Valtonen, V. V., Nieminen, M. S. and Asikainen, S. Role of infection as a risk factor for atherosclerosis, myocardial infarction, and stroke. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.*, v. 26(3), p. 719–34, 1998.

Miura, E. & Martin, M. C. Group B *Streptococcal* neonatal infections in Rio Grande do Sul, Brazil. *Ver. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v. 43, n. 5, p. 243-246, 2001.

Meng, H., Yuan, Y. and Lee, V. M. Loss of sphingosine kinase 1/S1P signaling impairs cell growth and survival of neurons and progenitor cells in the developing sensory ganglia. *PLoS One*, v. 6, p. 27150, 2011.

Mermelstein, C. S., Portilho, D. M., Mendes, F. A., Costa, M. L., Abreu, J. G. Wnt/beta-catenin pathway activation and myogenic differentiation are induced by cholesterol depletion. *Differentiation*, v. 75(3), p. 184-92, 2007.

Mithal, L. B., Palac, H. L., Yogev, R., Ernst, L. M., Mestan, K. K. Cord Blood Acute Phase Reactants Predict Early Onset Neonatal Sepsis in Preterm Infants. *PLoS One*. 0168677. eCollection, 2017.

Mocelin, C. O., Carvalho, D. A. A. F. and Brites, C. Isolamento de *Streptococcus agalactiae* de gestantes na região Londrina-PR. *Rev. Bras. Ginec. Obstet.*, v. 17, p. 915-918, 1995.

Molinari, G. and Chhatwal, G. S. Streptococcal invasion. *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 2, p. 6-61, 1999.

Molinari, G., Rohde, M., Guzman, C. A. and Chhatwal, G. S. Two distinct pathways for the invasion of *Streptococcus pyogenes* in nonphagocytic cells. *Cell Microbiol.*, v. 2 p. 145–154, 2000.

Mollinedo, F., Gajate, C. Lipidrafts as major platforms for signaling regulation in cancer. *Adv Biol Regul.*, v. 57, p. 130-46, 2015.

Moncada, S., and Higgs, E. A. Nitric oxide and the vascular endothelium. *Berlin Heidelberg: Springer*, 2006.

Monteiro, G. C. T. S., Hirata Jr., R., Andrade, A. F. B., Mattos-Guaraldi, A. L. and Nagao, P. E. Surface carbohydrates as recognition determinants in non-opsonic interactions and intracellular viability of group B *Streptococcus* strains in murine macrophages. *Int. J. Mol. Med.*, v. 13, p. 175-180, 2004.

Motoyama, K., Kameyama, K., Onodera, R., Araki, N., Hirayama, F., Uekama, K., Arima, H. Involvement of PI3K-Akt-Bad pathway in apoptosis induced by 2,6-di-O-methyl-beta-cyclodextrin, not 2,6-di-O-methyl-alpha-cyclodextrin, through cholesterol depletion from lipid raft son plasma membranes in cells. *Eur J Pharm Sci.* v. 38(3), p. 249-61, 2009.

Moore, M. R., Schrag, S. J., Schuchat A. Effects of intrapartum antimicrobial prophylaxis for prevention of group-B-streptococcal disease on the incidence and ecology of earlyonset neonatal sepsis. *Lancet Infect Dis.*, v. 3, p. 201–13, 2003.

Munderloh, C., Solis, G. P., Bodrikov, V., Jaeger, F. A., Wiechers, M., Málaga-Trillo, E. and Stuermer, C. A. Reggies/flotillins regulate retinal axon regeneration in the zebrafish optic nerve and differentiation of hippocampal and N2a neurons. *J. Neurosci.* v. 29, 2009.

Murata, S., Usuda, N., Okano, A., Kobayashi, S., Suzuki, T. Occurrence of a transcription factor, signal transducer and activators of transcription 3 (STAT3) in the postsynaptic density of the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.*, v. 78 p.80–90, 2000.

Murayama, S. Y., Seki, C., Sakata, H., Sunaoshi, K., Nakayama, E., Iwata, S., Sunakawa, K., Ubukata, K. Invasive Streptococcal Disease Working Group. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 53 p. 2650-3, 2009.

Musser, J. M., Mattingly, S. J., Quentin, R., Goudeau, A., Selander, R. K. Identification of a high-virulence clone of type III *Streptococcus agalactiae* (group B *Streptococcus*) causing invasive neonatal disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 86, p. 4731–5, 1989.

Namavar Jahromi, B., Poorarian, S., Poorbarfehee, S. The prevalence and adverse effects of group B streptococcal colonization during pregnancy. *Arch. Iran. Med*, v. 11, p. 654–7, 2008.

Naroeni, A., Porte, F. Role of cholesterol and the ganglioside GM(1) in entry and short term survival of *Brucella suis* in murine macrophages. *Infect Immun.*, v. 70 p.1640–1644, 2002.

NavarreteSantos, A., Roentsch, J., Danielsen E. M., Langner, J., Riemann, D. Aminopeptidase N/CD13 is associated with raft membrane microdomains in monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 269(1), p. 143–8, 2000.

Neuhaus, T., Totzke, G., Gruenewald, E., Juesten, H. P., Sachinidis, A., Vetter, H. and Ko, Y. Tumour necrosis factor- $\alpha$  gene expression and production in human umbilical arterial endothelial cells. *Clin. Scien*, v. 98, p. 461-470, 2000.

- Neumann-Giesen, C., Fernow, I., Amaddii, M. and Tikkanen, R. Role of EGF-induced tyrosine phosphorylation of reggie-1/flotillin-2 in cell spreading and signaling to the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci*, v. 120, p. 395–406, 2007.
- Nichols, B. J., Kenworthy, A. K., Polishchuk, R. S. Rapid Cycling of Lipid Raft Markers between the Cell Surface and Golgi Complex. *J. Cell Biol*, v. 153(3), p. 529-542, 2003.
- Nikolaeva, N. S., Yermolaev, Y. I., and Lodkina I. G.. Modeling of Dst-index temporal profile on the main phase of the magnetic storms generated by different types of solar Wind. *Cosmic Res. Kosmicheskie Issledovaniya*, v. 51, p. 443–454, 2013.
- Nizet, V., Kim, S. K., Stins, M., Jonas, M., Chi, Y. E., Nguyen, D. and Rubens, E. C. Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B *Streptococci*. *Infect. Immun*, v. 65, p. 5074-5081, 1997.
- Nóbrega Jr., J. E., Gonçalves, P. B. D., Pereira, G. R., Figueiredo, J. R. The role of Sphingosine 1-phosphate and Leukemia Inhibitory Factor in the culture of goats preantral follicles in vitro. *Rev. Bras. Reprod. Anim*, v.38, n.2, p.75-79, 2014.
- Nomura, M. L., Passini Júnior, R. and Oliveira, U. M. Group B streptococcus 21. colonization in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. *Int. J. Gynaecol. Obstet*, v. 91, n. 1, p. 69-70, 2005.
- Ockleford, C. D., Cairns, H., Rowe, A. J., Byrne, S., Scott, J. J. A. and Willingale, R. The distribution of caveolin-3 immunofluorescence in skeletal muscle fibre membrane defined by dual channel confocal laser scanning microscopy, fast Fourier transform and image modelling. *J Microsc*, v. 206 p. 93–105, 2002.
- Olivera, A., Kohama, T., Edsall, L., Nava, V.,Cuvillier, O.,Poulton, S. and Spiegel, S., Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J Cell Biol.*, v.147, p.545-558, 1999.
- Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P. E. and Lisanti, M. P. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing “preassembled signaling complexes” at the plasma membrane. *J Biol Chem*, v. 273(10), p. 5419–5422, 1998.
- Okamoto, H., Takuwa, N., Yokomizo, T., Sugimoto, N., Sakurada, S., Shigematsu H., Takuwa, Y. Involvement of Phospholipase D in Sphingosine 1-Phosphate-induced Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase and Akt in Chinese Hamster Ovary Cells Overexpressing EDG3. *Mol. Cell. Bio.*, v. 20 p. 9247–9261, 2000.
- Oster, G., Edelsberg, J., Hennegan, K., Lewin, C., Narasimhan, V., Slobod, K., Edwards M. S., Baker, C. J. Prevention of group B streptococcal disease in the first 3 months of life: would routine maternal immunization during pregnancy be cost-effective? *Vaccine*, v. 32 p. 4778–4785, 2014.
- Overduin, M., Cheever, M. L. and Kutateladze, T. G. Signaling with phosphoinositides: better than binary. *Mol. Interv.* v.1, p. 150– 159, 2001.
- Ohtani, Y., Irie, T., Uekama, K., Fukunaga, K., Pitha, J. Differential effects of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur J Biochem*, v.186, p.17–22, 1989.

- Otto, G. P. and Nichols, B. J. The roles of flotillin microdomains – endocytosis and beyond. *J. Cell Sci*, v. 124 p. 3933–3940, 2011.
- Oviedo, P., Pegels, E. and Laczeski, M. Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women. First study in a province of Argentina, *Braz J Microbiol*, v.44, p.235-8, 2013.
- Pan, W., Yu, H., Huang, S. and Zhu, P. Resveratrol Protects against TNF- $\alpha$ -Induced Injury in Human Umbilical Endothelial Cells through Promoting Sirtuin-1-Induced Repression of NF-KB and p38 MAPK. *PLoS ONE*, v.11(1), p.e0147034, 2016.
- Paoletti, L. C., Ross, R. A. and Johnson, K. D. Cell Growth Rate Regulates Expression of Group B Streptococcus Type III Capsular Polysaccharide. *Infect. Immun*, v. 64, n. 4, p. 1220-1226, 1996.
- Parton, R. G. Caveolae and caveolins. *Curr Opin Cell Biol*, v.8(4), p.542–548, 1996.
- Parton, R. G. and Richards, A. A. Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffi c.*, v.4, p.724 – 738, 2003.
- Patil, K. P., Singla, S. S., Nagmoti, M. B. and Swamy, M. K. Group B streptococci colonization in pregnant women is screening necessary? *J South Asian Feder Obstet Gynecol*, v.5, p.64–67, 2013.
- Pelkmans, L., Püntener, D. and Helenius, A. Local Actin Polymerization and Dynamin Recruitment in SV40-Induced Internalization of Caveolae. *Science*, v.296(5567), p. 535-539, 2001.
- Peotta, V. A., Ribeiro, F. L., Arnholdt, A. C. V. and Nagao, P. E. Human monocytes and monocyte-derived macrophages phagocytosis of serotype III group B *Streptococci* strains. *Curr. Microbiol*, v.43, p.64-68, 2001.
- Peres, C., Yart, A., Perret, B., Salles, J. P. and Raynal, P. Modulation of phosphoinositide 3-kinase activation by cholesterol level suggests a novel positive role for lipid rafts in lysophosphatidic acid signalling. *FEBS Lett*, v.16, p.534(1-3):164-8, 2003.
- Peters, K., Unger, R. E., Brunner, J. and Kirkpatrick, C. J. Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovasc. Res*, v.60, p.49-57, 2003.
- Pettersson, K. Perinatal infection with Group B streptococci. *Fetal & Neonatal Med*, v. 12, p.193-197, 2007.
- Petterson, H., Saralahti, A., Parikka, M., Dramsi, S., Trieu-Cuot, P., Poyart, C., Rounioja, S. and Ramet M. Adult zebrafish model of bacterial meningitis in *Streptococcus agalactiae* infection. *Dev Comp Immunol*, v.38, p.447–455, 2012.
- Phares, C. R., Lynfield, R., Farley, M. M., Mohle-Boetani, J. and Harrison, L. H. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999–2005. *JAMA*, v.299, p.2056–2065, 2008.

Pike, L.J. and Casey, L. Localization and turnover of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolin-enriched membrane domains. *J Biol Chem*, v. 271, p.26453-26456, 1996.

Pike, L. J. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res*, v.44(4), p.655-67, 2003.

Pike, L. J. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res*, v.47(7), p.1597-1598, 2006.

Pike, L. J. Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J*, v.378(Pt 2), p. 281-292, 2004.

Pike, L. J. Casey L. Localization and turnover of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolin-enriched membrane domains. *J Biol Chem*, v.271(43), p.26453-6, 1996.

Pinto, T. C., Costa, N. S., Vianna, S. A. R., Silva, L. G., Corrêa, A. B., Fernandes, F. G., Oliveira, I. C., Mattos, M. C., Rosado, A. S. and Benchetrit, L. C. Distribution of serotypes and evaluation of antimicrobial susceptibility among human and bovine *Streptococcus agalactiae* strains isolated in Brazil between 1980 and 2006. *Braz J Infect Dis*. v.17, p.131-6, 2013.

Prinetti, A., Loberto, N., Chigorno, V., Sonnino, S. Glycosphingolipid behaviour in complex membranes. *Biochim Biophys Acta*, v.1788, p.184-193, 2009.

Pritchard, D. G., Lin, B., Willingham, T. R. and Backer, J. R. Characterization of the group B *Streptococcal* hyaluronate lyase. *Arch. Biochem. Biophys*, v.315, p.431-437, 1994.

Pucadyil, T. J., Tewary, P., Madhubala, R. and Chattopadhyay, A. Cholesterol is required for *Leishmania donovani* infection: implications in leishmaniasis. *Molecular & Biochemical Parasitology*, v.133, p.145-152, 2004.

Purushothaman, S. S., Wang, B., Cleary, P. P. M1 protein triggers a phosphoinositide cascade for group A *Streptococcus* invasion of epithelial cells. *Infect Immun*, v.71(10), p.5823-30, 2003.

Qi, M., Liu, Y., Freeman, M. R. and Solomon, K. R. Cholesterol-regulated stress fiber formation. *J CellBiochem*, v.106(6), p.1031-1040, 2009

Radetsky, M. Pediatric infectious disease emergencies. Review. *Curr. Opin. Pediatr*, v.6, p.310-316, 1994

Rajagopal, L. Understanding the regulation of Group B *Streptococcal* virulence factors. *Future Microbiol*, v.4, p.201-221, 2009.

Razani, B., Woodman, S. E. and Lisanti, M. P. Caveolae: From Cell Biology to Animal Physiology. *Pharmacological Reviews*, v.54(3), p.431-467, 2002.

Riento, K., Frick, M., Schafer, I. and Nichols, B. J. Endocytosis of flotillin-1 and flotillin-2 is regulated by Fyn kinase. *J. Cell Sci*, v.122, p.912-918, 2009.

- Ring, A., Johann, S., Nizet, V., Wolfgang, S. and Jerry, L. S. Group B *Streptococcal*  $\beta$  hemolysin induces nitric oxide production in murine macrophages. *J. Infect. Dis.*, v.182, p.150-157, 2000.
- Rivera, L., Sáez-Llorens, X., Feris-Iglesias, J., Ip, M., Saha, S., Adrian, P. V., Madhi S. A., Boudville, I. C., Cunningham, M. C., Casellas, J. M. and Slobod, K. S. Incidence and serotype distribution of invasive group B streptococcal disease in young infants: a multi-country observational study. *BMC Pediatr.*, v.15, p.143, 2015.
- Rivera-Milla, E., Stuermer, C. A. and Málaga-Trillo, E. Ancient origin of reggie (flotillin), reggie-like, and other lipid-raft proteins: convergent evolution of the SPFH domain. *Cell. Mol. Life Sci.*, v.63, p.343–357, 2006.
- Riethmuller, J., Riehle, A., Grassme, H. and Gulbins, E. Membrane rafts in host-pathogen interactions. *Biochim Biophys Acta*, v.1758, p.2139–2147, 2006.
- Rocchetti, T. T., Marconi, C., Rall, V. L. M., Borges, V. T. M., Corrente, J. E. and Silva, M. G. Group B streptococci colonization in pregnant women: risk factors and evaluation of the vaginal. *Arch. Gynecol. Obstet.*, v.283, p.717–721, 2011.
- Rodriguez, N. E., Gaur, U., and Wilson, M. E. Role of caveolae in *Leishmania chagasi* phagocytosis and intracellular survival in macrophages. *Cellular Microbiology*, v.8, p.1106–1120, 2006.
- Rodrigues, S. F. and Granger, D. N. Blood cells and endothelial barrier function. *Tissue Barriers*, v.3, p.e978720, 2015.
- Rohde, M., Mülle, E., Chhatwal, G. S., and Talay, S. R., Host cellcaveolaeact as anentry-port for Group A streptococci. *Cellular Microbiology*, v.5(5), p.323–342, 2003
- Rolando, M., Escoll, P. and Buchrieser, C. Legionella pneumophila strains autophagy by modulating the host's sphingolipid metabolism. *Autophagy*, v.12(6), p.1053-1054, 2016.
- Rosenberger, C. M., Brumell, J. H. and Finlay, B. B. Microbial pathogenesis: lipid rafts as pathogen portals. *Curr Biol*, v.10(22), p.R823-5, 2000.
- Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney J. R. and Anderson R.G. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell.*, v.68, p.673–682, 1992.
- Roy, C. R. and Van der Goot, F.G. Eukaryotic cells and microbial pathogens: a familiar couple take centre stage. *Nat. Cell. Biol.*, v.5, p.16-9, 2003.
- Sakarya, S. and Öncü, S. Bacterial adhesions and role of sialic acid in bacterial adhesion. *Me. Sci. Monit.*, v.9, p.RA76-82, 2003.
- Salaun, C., James, D. J., Chamberlain, L. H. Lipid rafts and the regulation of exocytosis. *Traffic*, v.5, p.255-264, 2004.



Santos, G. S., Miyazaki, N. H., Mattos-Guaraldi, A. L. and Nagao, P. E. The effects of interferon-gamma and transforming growth factor-beta on adherence and survival of group B *Streptococcus* type III strains in ECV304 cells. *Int. J. Mol. Med*, v.11, p.401-406, 2003.

Santos, G. S., Loureiro y Penha, C. V., Mattos-Guaraldi, A. L., Attias, M., Lopes-Bezerra, L. M., Silva-Filho, F. C. and Nagao, P. E. Group B *Streptococcus* induces tyrosine phosphorylation of annexin V and glutathione S-transferase in human umbilical vein endothelial cells. *International Journal of Molecular Medicine*, v.24, p.393-399, 2009.

Shaul, P. W. and Anderson, R. G. W. Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am. J. Physiol*, v.275, p.843, 1998.

Shin, J. S., Gao, Z., Abraham, S. N. Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells. *Science*, v.289, p.785-788, 2000.

Schousboe, I., Thomsen, P. and van Deurs, B. Factor XII binding to endothelial cells depends on caveolae. *Eur J Biochem*, v.271(14), p.2998-3005, 2004.

Schmitz, M., Zerr, I., Althaus, H. H. Effect of cavtratin, a caveolin-1 scaffolding domain peptide, on oligodendroglial signaling cascades. *Cell Mol Neurobiol*, v.31(7), p.991-997, 2011.

Schnitzer, J. E., Oh, P., Pinney, E. and Allard J. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol*, v.127, p.1217-1232, 1994.

Schubert, W., Cohen, A.W., Hnasko, R. and Lisanti M. P. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev*, v.84(4), p.1341-1379, 2004.

Schubert, A., Zakikhany, K., Schereiner, M., Frank, R., Spellerberg, B., Eikmanns, B. J. and Reinscheid, D. J. A fibrinogen receptor from group B *Streptococcus* interacts with fibrinogen by repetitive units with novel ligand binding sites. *Mol. Microbiol*, v.46, p.557-569, 2002.

Schuchat, A. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clin. Microbiol. Rev*, v.11, p.497-513, 1998.

Schulte, T., Paschke, K. A, Laessing, U., Lottspeich, F. and Stuermer, C. A. Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration. *Development*, v.124(2), p.577-87, 1997.

Schuchat, A. Group B *Streptococcus*. *Lancet*, v.353, p.51-56, 1999.

Schwab, S. R., Pereira, J. P., Matloubian, M., Xu, Y., Huang, Y. and Cyster, J. G., Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science*, v.309, p.1735-1739, 2005.

Semeraro, N., Ammollo, C. T., Semeraro, F. and Colucci, M. Sepsis, thrombosis and organ dysfunction. *Thromb Res*, v.129(3), p.290-295, 2012.

- Sendi, P. and Proctor, R. A. *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends in Microbiology*, v.17, p.54–58, 2009.
- Sexton, E., Leblanc, K., Asselin, E. AKT involvement in cisplatin chemoresistance of human uterine cancer cells. *Gynecol Oncol*, v.94(3), p.785-95, 2004
- Simons, K. and Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, v.387, p.569–572, 1997.
- Simons, K. and Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, v.1, p.31–39, 2000.
- Simons, K. and Gerl, M. J. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v.11(10), p.688-99, 2010.
- Skalka, B. and Smola, J. Lethal effect of CAMP-factor and UBERIS factor: a new finding about diffusible exosubstances of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis*. *Zentbl. Bakteriol*, v.249, p.190–194, 1981.
- Slotved, H. C., Kong, F., Lambertsen, L., Sauer, S. and Gilbert, G. L. Serotype IX, a Proposed New *Streptococcus agalactiae* Serotype. *J. Clin. Microbiol*, v.45, p.2929–2936, 2007.
- Soares, G. C., Alviano, D. S., da Silva, S. G., Alviano, C. S., Mattos-Guaraldi A. L., Nagao, P. E. Prevalence of Group B Streptococcus serotypes III and V in pregnant women of Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Microbiol*, v.15, p.869-872, 2014.
- Soriani, M., Santi, I., Taddei, A., Rappuoli, R., Grandi, G. and Telford, J. L. Group B *Streptococcus* crosses human epithelial cells by a paracellular route. *J. Infect. Dis*, v.193,p.241-250, 2006.
- Spangler, B. D. Structure and function of cholera toxin and the related Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Microbiol. Rev*, v.56, p.622–647, 1992.
- Spellerberg, B. Pathogenesis of neonatal Streptococcus agalactiae infections. *Micro. Infect*, v.2, p.1733-1742, 2000.
- Stoll, B. J., Hansen, N., Fanaroff, A. A., Wright, L. L., Carlo, W. A., Ehrenkranz, R. A., Lemons, J. A., Donovan, E. F., Stark, A. R., Tyson, J. E., Oh, W., Bauer, C. R., Korones, S. B., Shankaran, S., Laptook, A. R., Stevenson, D. K., Papile, L. A. and Poole, W. K. Changes in pathogens causing early-onset sepsis in very-low-birth-weight infants. *N. Engl. J. Med*, v. 347, p.240–47, 2002.
- Stuermer, C. A. O. The reggie/flotillin connection to growth. *Cell*, v.20, p.6–13, 2010.
- Strassheim Asehnoune, K., Park, J. S., Kim, J. Y., He, Q., Richter, D., Kuhn, K., Mitra, S., Abraham, E. Phosphoinositide 3-Kinase and Akt Occupy Central Roles in Inflammatory Responses of Toll-Like Receptor 2-Stimulated Neutrophils. *J Immunol*, v.172 (9), p.5727-5733, 2004.

Stratmann, T. Cholera Toxin Subunit B as Adjuvant—An Accelerator in Protective Immunity and a Break in Autoimmunity. *Vaccines (Basel)*, v.3(3), p.579–596, 2015.

Strus, M., Pawlik, D., Brzychczy-Wloch, M., Gosiewski, T., Rytlewski, K., Lauterbach R. Heczko, P. B. Group B streptococcus colonization of pregnant women and their children observed on obstetric and neonatal wards of the University Hospital in Krakow, Poland. *J. Med. Microbiol*, v.58, p.228–233, 2009.

Subtil, A., Wyplosz, B., Balana, M. E., Dautry-Varsat, A. Analysis of Chlamydia caviae entry sites and involvement of Cdc42 and Rac activity. *J CellSci*, v.117, p.3923–3933, 2004.

Suzuki, T., Zhang, J., Miyazawa, S., Liu, Q., Farzan, M. R. and Yao, W. D. Association of membrane rafts and postsynaptic density: proteomics, biochemical, and ultrastructural analyses. *J Neurochem*, v.119(1), p.64-77, 2011.

Tamura, G. S. and Nittayajarn, A. Group B *Streptococci* and other gram-positive *cocci* bind to cytokeratin 8. *Infect. Immun*, v.68, p.2129-2134, 2000.

Tamura, G. S., Kuypers, J. M., Smith, S., Raff, H. and Rubens, C. E. Adherence of group B *Streptococci* to cultured epithelial cells: roles of environmental factors and bacterial surface components. *Infect. Immun*, v.62, p.2450-2458, 1994.

Tazi, A., Disson, O., Bellais, S., Bouaboud, A., Dmytruk, N., Dramsi, S., Mistou, M. Y., Khun, H., Mechler, C., Tardieux, I., Trieu-Cuot, P., Lecuit, M., Poyart, C. The surface protein HvgA mediates group B streptococcus hypervirulence and meningeal tropism in neonates. *J Exp Med*, v.207, p.2313–2322, 2010.

Teijaro, J. R., Walsh, K. B., Cahalan, S., Fremgen, D. M., Roberts, E., Scott, F., Martinborough, E., Peach, R., Oldstone, M. B. and Rosen, H. Endothelial cells are central orchestrators of cytokine amplification during influenza virusinfection. *Cell*, v.146, p.980-991, 2011

Teixeira, C. F., Azevedo, N. L., Carvalho, T. M. U., Fuentes, J. and Nagao, P. E. Cytochemical study of *Streptococcus agalactiae* and macrophage interaction. *Microsc. Res. Tech*, v.54, p.254-259, 2001.

Teixeira, L. M. *et al.* *Streptococcus agalactiae*. In: Trabulsi, Luiz Rachid e Alterthum, Flávio. *Microbiologia*. 5 ed. São Paulo: Atheneu, p.195-206, 2008.

Toledo, A., Pérez, A., Coleman, J. L. and Benach, J.L. The lipid raft proteome of *Borrelia burgdorferi*. *Version of Record*, v.15, p.3662–3675, 2015.

Tyrrell, G. J., Kennedy, A., Shokoples, S. E., Sherburne, R. K. Binding and invasion of HeLa and MRC-5 cells by *Streptococcus agalactiae*. *Microbiology*, v.148, p.3921–3931, 2002.

Tuluc, F., Meshki, J., Kunapuli, S. P. Membrane lipid microdomains differentially regulate intracellular signaling events in human neutrophils. *IntImmunopharmacol*, v.3 (13-14), p.1775-90, 2003.

- Ulett, G. C., Maclean, K. H., Nekkhalapu, S., Cleveland, J. L., Adderson, E. E. Mechanisms of group B streptococcal-induced apoptosis of murine macrophages. *J. Immunol*, v.175, p.2555-2562, 2005.
- Ulett, G. C., Bohnsack, J. F., Armstrong, J. and Adderson, E. E.  $\beta$ -Hemolysin-independent induction of apoptosis of macrophages infected with serotype III group B *Streptococcus*. *J. Infect. Dis*, v.188, p.1049-1053, 2003.
- Usein, C. R., Militaru, M. and Cristea, V. Genetic diversity and antimicrobial resistance in *Streptococcus agalactiae* strains recovered from female carriers in the Bucharest area. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.109, p.189-196, 2014.
- Vaciloto, E., Richtmann, R., de Paula F. C. H, Kusano, E. J., de Almeida, M. F. and Amaro E. R. A survey of the incidence of neonatal sepsis by Group B Streptococcus during a decade in a Brazilian maternity hospital. *Braz J Infect Dis*, v.6, p.55–62, 2002.
- Valbuena, G. and Walker, D. H. The endothelium as a target for infections. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*, v.1, p.171-198, 2006.
- Valentin-Weigand, P., Benkel, P., Rohde, M., and Chhatwal, G. S. Entry and intracellular survival of group B streptococci in J774 macrophages. *Infect Immun*, v.64 p.2467–2473, 1996.
- Vandamme, P., Devriese, L. A., Pot, B., Kersters, K. and Melin, P. *Streptococcus difficile* is a nonhemolytic group B, type Ib Streptococcus. *Int. J. Syst. Bacteriol*, v.47, p.81–85, 1997.
- van der Goot, F.G. and Harder T. Raft membrane domains: from a liquid-ordered membrane phase to a site of pathogen attack. *Semin Immunol Apr*, v.13(2), p.89-97, 2001.
- Verani, J. R, McGee, L., Schrag, S. J. Division of Bacterial Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention of perinatal group B streptococcal disease – revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm. Rep*, v.59, p.1-36, 2010.
- Vieira, F.S., Corrêa, G., Einicker-Lamas, M. and Coutinho-Silva, R. Host-cell lipid rafts: a safe door for micro-organisms? *Biol Cell*, v.102, p.391–407, 2010.
- Virgintino, D., Robertson, D., Errede, M., Benagiano, V., Tauer, U., Roncali, L., and Bertossi, M. Expression of caveolin-1 in human brain microvessels. *Neuroscience*, v.115(1), p.145–152, 2002.
- Viola, A. and Gupta, N. Tether and trap: regulation of membrane-raft dynamics by actin-binding proteins. *Nat Rev Immunol*, v.7(11), p.889-96, 2007.
- Vlahos, C. J., McDowell, S. A. and Clerk A. Kinases as therapeutic targets for heart failure. *Nature Reviews Drug Discovery*, v.2, p.99-113, 2004.
- Wang, Y., Karnataki, A., Parsons, M., Weiss, L. M. and Orlofsky, A. 3-Methyladenine blocks *Toxoplasma gondii* division prior to centrosome replication. *Mol Biochem Parasitol*, v.173, p.142–153, 2010.

Wang X., Maruvada R., Morris A.J., Liu J.O., Wolfgang M.J., Baek D.J., Bittman R., Kim K.S. Sphingosine 1-Phosphate Activation of EGFR As a Novel Target for Meningitic *Escherichia coli* Penetration of the Blood-Brain Barrier. *PLoS Pathog*, v.12(10), p.e1005926, 2016.

Wang, Z., Sims, C. R., Patil, N. K., Gokden, N., Mayeux, P. R. Pharmacologic targeting of sphingosine-1-phosphate receptor 1 improves the renal microcirculation during sepsis in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther*, v.352(1), p.61-66, 2015.

Wang, J., Wu, J., Yi, L., Hou, Z. and Li, W. Pathological analysis, detection of antigens, FasL expression analysis and leucocytes survival analysis in tilapia (*Oreochromis niloticus*) after infection with green fluorescent protein labeled *Streptococcus agalactiae*. *Fish Shellfish Immunol*, v.12(1), p.e0168677, 2017.

Weisner, A. M., Johnson, A. P., Lamagni, T. L., Arnold, E., Warner, M., Heath, P. T. and Efstratiou, A. Characterization of group B Streptococci recovered from infants with invasive disease in England and Wales. *Clin. Infect. Dis*, v.38, p.1203-8, 2004.

Wessels, M. R., Haft, R. F., Heggen, L. M. and Rubens, C. E. Identification of a genetic locus essential for capsule sialylation in type III group B *Streptococcus*. *Infect. Immun*, v.60, p.392-400, 1992.

Winkler, M. S., Nierhaus, A., Holzmann, M., Mudersbach, E., Bauer, A., Robbe, L., Zahrt, C., Geffken, M., Peine, S., Schwedhelm, E., Daum, G., Kluge, S. and Zoellner, C. Decreased serum concentrations of sphingosine-1-phosphate in sepsis. *Crit Care*, v.19, p.372, 2015.

Wymann, M. P., Zvelebil, M. and Laffargue, M. PI3K signaling - which way to target? *Trends in Pharmacological Sciences*, v.24(7) p.366-376, 2003.

Whidbey, C., Harrell, M. I., Burnside, K., Ngo, L., Becraft, A.K., Iyer, L. M., Aravind, L., Hitti, J., Waldorf, K. M., Rajagopal, L. A hemolytic pigment of Group B Streptococcus allows bacterial penetration of human placenta. *Journal of Experimental Medicine*, v.210, p.1265–1281, 2013.

Winram, S. B., Jonas, M. J., Chi, E. and Rubens, C. E. Characterization of group B *Streptococcal* invasion of human chorion and amnion epithelial cells *in vitro*. *Infect. Immun*, v.66, p.4932-4941, 1998.

Yakes, F. M., Wamil, B. D., Sun, F., Yan, H., Carter, C. E. and Hellerqvist, C. G. CM101 treatment overrides tumor-induced immunoprivilege leading to apoptosis. *Cancer Res*, v.60, p.5740–5746, 2000.

Yamada, E. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol*, v.25, p.445-58, 1955.

Yamaguchi, Y., Takei, M., Kishii, R., Yasuda, M. and Deguchi, T. Contribution of topoisomerase IV mutation to quinolone resistance in *Mycoplasma genitalium*. *Antimicrob. Agents Chemother*, v.57, p.1772–1776, 2013.

Yeung, M. K. and Mattingly S. J. Biosynthetic capacity of type-specific antigen synthesis determines the virulence of serotype III strains of group B streptococci. *Infect. Immun*, v.44, p.217-221, 1984.

Yu, R. K., Macala, L. J., Taki, T., Weinfield, H. M. and Yu, F. S. Developmental changes in ganglioside composition and synthesis in embryonic rat brain. *J. Neurochem*, v.50(6), p.1825–1829, 1988.

Yu, C., Alterman, M., and Dobrowsky, R. T. Ceramide displaces cholesterol from lipid rafts and decreases the association of the cholesterol binding protein caveolin-1. *J. Lipid Res*, v.46, p.1678-1691, 2005.

Itokazu, Y., Tsai, Y.T. and Yu, R.K. Epigenetic regulation of ganglioside expression in neural stem cells and neuronal cells. *Glycoconjugate Journal*, v.34, p.1–8, 2016.

Zhang, Y., Li, X., Becker, K. A., Gulbins, E. Ceramide-enriched membrane domains--structure and function. *Biochim Biophys Acta*, v.1788(1), p.178-83, 2009.

Zaas, D. W., Duncan M., Rae Wright, J. and Abraham, S. N. The role of lipid rafts in the pathogenesis of bacterial infections. *Biochim Biophys Acta*, v.1746, p.305–313, 2005