



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Cecilia Maria Ferreira da Silva

Captura e ativação de plasminogênio por

Pseudomonas aeruginosa

Rio de Janeiro

2002

Cecilia Maria Ferreira da Silva

Captura e ativação de plasminogênio por
Pseudomonas aeruginosa

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria Cristina Maciel Plotkowski

Rio de Janeiro

2002

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

S586 Silva, Cecília Maria Ferreira da.
Captura e ativação de plasminogênio por *Pseudomonas aeruginosa* / Cecília
Maria Ferreira da Silva – 2002.
82 f.

Orientadora: Maria Cristina Maciel Plotkowski.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Pseudomonas aeruginosa* - Teses. 2. Ativadores de Plasminogênio. 3.
Infecções Bacterianas. I. Plotkowski, Maria Cristina Maciel II. Universidade do
Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 576.8

Bibliotecária: Angela da Silva Velho CRB7/4780

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

Assinatura

Data

Cecilia Maria Ferreira da Silva

Captura e ativação de plasminogênio por *Pseudomonas aeruginosa*

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica

Aprovada em 23 de setembro de 2002.

Banca Examinadora: _____

Prof.^a Dra. Maria Cristina Maciel Plotkowski (Orientadora)
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. João Ramos da Costa Andrade
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. José Hermogenes Rocco Suassuna
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Maria Cristina Vidal Passolani
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2002

DEDICATÓRIA

Para Clarisse e Jonas

AGRADECIMENTOS

Agradeço à disciplina de Microbiologia e Imunologia e a todos os professores, por sua gentileza, paciência, dedicação e por sua contribuição na revisão e atualização de conhecimentos teórico-práticos, tão relevantes para minha formação.

À Prof^a Maria Cristina Maciel Plotkowski, por sua orientação sempre eficiente e objetiva.

À Prof^a Maria das Graças de Luna Gomes pela revisão desse trabalho.

À Cristina Assis e Elizabeth Capelli, companheiras de laboratório, pelo elevado espírito de coleguismo que tanto contribuiu para que esse trabalho fosse desenvolvido num ambiente de cordialidade. Agradeço também à Rebeca Nishi, por sua contribuição na realização dos testes de captura de plasminogênio e à Luciana Vidipó, por toda ajuda oferecida durante a etapa em que foram realizados os testes de aderência de cepas.

A todos os funcionários da disciplina de Microbiologia e Imunologia, que com eficiência e presteza contribuíram com seu trabalho.. Sobretudo à Ângela Oliveira da Costa, por sua participação durante a etapa de extração de proteínas de membrana externa e à Maria Angélica Pereira da Silva, por sua participação na etapa de preparações para microscopia.

À Prof^{ra} Elizabeth de Andrade Marques, chefe do LABAC- HUPE, que gentilmente cedeu todas as cepas clínicas usadas nesse estudo.

À Prof^{ra} Verônica Morandi, do Departamento de Biologia molecular e Genética da UERJ, que gentilmente cedeu as células ECV-304, insertos e trombina, usados nesse trabalho.

À Prof^{ra} Lucia Helena Cavalheiro Villela, chefe do Laboratório de Imunologia – HUPE, pelo fornecimento de reagentes e por permitir a utilização do leitor de ELISA do laboratório.

Agradeço também aos funcionários do laboratório de Imunologia pela ajuda recebida durante o manuseio do equipamento.

Agradeço a todos os colegas de turma, pela união, cooperação e por todos os momentos alegres que tivemos o dom de compartilhar, mesmo naqueles dias, em que “tudo parecia tão difícil!”

A todos os amigos que solidariamente se dispuseram a me ouvir e apoiar.

A meus filhos, por sua compreensão nas muitas horas em que lhes faltei e por seu incondicional apoio.

RESUMO

SILVA, Cecília Maria Ferreira da **Captura e ativação de plasminogênio por *Pseudomonas aeruginosa***. 2002. 82 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.

A afinidade pelo plasminogênio (Plg) por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* laboratoriais e clínicas, isoladas de sangue e de fezes de indivíduos assintomáticos, foi avaliada por ensaio imunoenzimático (ELISA). A ligação de Plg a poços de microplacas de ELISA revestidas com os inóculos bacterianos foi significativamente superior à ligação a poços controle não revestidos ($p < 0.001$). Nenhuma diferença significativa foi observada entre a captura de Plg pelas cepas de sangue ou de fezes, o que sugere a presença de receptores de superfície para Plg seja constitutiva. A ligação do Plg à cepa fimbriada PAK e à sua mutante isogênica não fimbriada PAK/p- foi semelhante, sugerindo que as fímbrias do tipo IV não sejam relevantes na captura de Plg. A adição de ácido ϵ -aminocapróico aos testes reduziu significativamente ($p < 0.001$) a captura de Plg pelas cepas PAK e PAK/p-, evidenciando que a ligação do zimogênio aos receptores bacterianos é lisina-dependente e sugerindo a importância dos domínios “kringle” na ligação da molécula aos micro-organismos. A participação de ompitinas na captura de Plg por *P. aeruginosa* foi pesquisada pela técnica de Western-blotting. Todas as 14 cepas estudadas apresentaram frações proteicas, com pesos moleculares entre 30 e 60 kDa, capazes de ligar Plg com alta especificidade. A capacidade de ativação do Plg associado às células bacterianas foi pesquisada pelo tratamento dos micro-organismos aderidos a poços de microplacas de ELISA com Plg, ativador uroquinase (u-PA) e com o substrato cromogênico da plasmina. Em paralelo, poços contendo bactérias aderidas foram tratados apenas com Plg e com o substrato cromogênico, para avaliação da capacidade intrínseca dos micro-organismos de gerar plasmina. As 14 cepas estudadas apresentaram variável capacidade de degradação do substrato, em presença de u-PA. Duas cepas, uma isolada de fezes e a outra de sangue, apresentaram capacidade significativamente superior à das demais em degradar o substrato, inclusive independentemente da presença de u-PA, sugerindo a existência de um ativador endógeno ligado ao corpo bacteriano. Os resultados de ensaios preliminares sugeriram que este ativador seja uma serino-protease uma vez que não pode ser inibido pela adição de EDTA aos testes. Finalmente, foi pesquisado o efeito da captura e ativação de Plg na capacidade proteolítica de *P. aeruginosa* e, conseqüentemente, em seu potencial de invasão. Géis de fibrina contidos em tubos de Durhan ou em insertos Millicell-PCF foram expostos a suspensões bacterianas tratadas com plasmina. Como controle, outros géis foram expostos a bactérias não tratadas com plasmina. Nos dois modelos experimentais, a presença da plasmina conferiu maior invasividade aos micro-organismos, detectada em 3 horas. Com base nos resultados obtidos, sugerimos que, *in vivo*, a captura do Plg e sua ativação possam favorecer a degradação de barreiras teciduais do hospedeiro, como coágulos e membranas basais, e à disseminação bacteriana, no curso de processos infecciosos invasivos por *P. aeruginosa*.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*. Captura e ativação de plasminogênio. Ativadores bacterianos de plasminogênio. Metástase bacteriana.

ABSTRACT

SILVA, Cecília Maria Ferreira da. **Binding and activation of plasminogen to *Pseudomonas aeruginosa***. 2002. 82 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

This study was carried out to assess the affinity for plasminogen (Plg) by ELISA of *Pseudomonas aeruginosa* laboratory and clinical strains isolated from blood of septicemic patients or from stools of asymptomatic carriers. The Plg binding to ELISA microplate coated wells with 14 different bacterial strains was significantly higher ($p < 0.001$) than the binding to uncoated control wells. The Plg binding by blood strains did not differ from the binding by stool strains, suggesting that the expression of Plg receptors on *P. aeruginosa* surface is constitutive. No difference in the Plg binding was detected between the piliated PAK strain and the isogenic nonpiliated mutant PAK/p-, suggesting that type IV pili is not a main adhesin accounting for Plg binding to *P. aeruginosa* cells. The inclusion of ϵ -aminocaproic acid in the assays reduced significantly the Plg binding to PAK and PAK/p- strains indicating that Plg binding to surface *P. aeruginosa* receptors is lysin dependent and suggesting a role for the kringle domains in the Plg capture by bacterial cells. By Western-immunoblotting assays, several *P. aeruginosa* low molecular weight outer membrane proteins (from 30 to 60 kDa) were seen to react with Plg, suggesting that *P. aeruginosa* Plg surface receptors are omptins. To ascertain whether bacteria-bound Plg could be activated to plasmin, bacteria-coated microplate wells were incubated successively with Plg and with the urokinase (u-PA) activator. The bacteria-associated proteolytic activity was assessed by the addition of a chromogenic plasmin substrate. In parallel, other bacteria-coated microplate wells were exposed only to Plg and to the chromogenic substrate, to assess the intrinsic capability of the bacteria to generate plasmin. Most strains were shown to activate Plg in plasmin in presence of u-PA. Two clinical strains, one from blood and the other from stools, exhibited a marked capability to generate plasmin in the absence of u-PA, suggesting the existence of an endogenous cell surface Plg activator. The results from preliminary studies carried out in the presence of EDTA suggest that this *P. aeruginosa* Plg activator is a bacteria-bound serine protease. Finally, the role of Plg binding and activation to plasmin in the bacterial proteolytic activity and invasiveness was assessed by inoculating fibrin gels prepared in Durhan tubes or in Millicell inserts with plasmin-coated and uncoated bacteria. The presence of surface-bound plasmin enhanced significantly the *P. aeruginosa* capacity to invade the fibrin gells, detected as early as 3h after the infection. Based on these results, we suggest that *in vivo*, the binding of Plg to *P. aeruginosa* surface may represent a mechanism that could enhance the bacterial metastasis through normal host tissue barriers, such as fibrin clots and basal membranes, in the course of invasive infectious processes.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*. Plasminogen binding and activation. Bacterial plasminogen activators. Bacterial metastasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Representação esquemática de estrutura da molécula do plasminogênio.....	18
Figura 2 –	Representação esquemática da ativação e regulação da atividade do sistema fibrinolítico humano	21
Figura 3 –	Representação esquemática da ativação do plasminogênio por u-PA em célula neoplásica.	22
Figura 4 –	Tabela com as cepas usadas no estudo.	30
Figura 5 –	Esquema de insertos Millicell-PCF inseridos em poços de microplacas com 4 poços para cultura de células.....	39
Figura 6 –	Aderência das células bacterianas das cepas PAK e PAK/p- a poços de microplaca de ELISA.....	43
Figura 7-	Captura de plasminogênio por cepas clínicas isoladas de fezes, de sangue e pelas cepas laboratoriais PAK fimbriada e PAK/ p- não fimbriada.....	44
Figura 8 -	Inibição da captura de plasminogênio pelas cepas PAK e PAK/p- por diferentes concentrações do ácido amino capróico (EACA).....	46
Figura 9 –	Perfil de proteínas de membrana externa das diferentes cepas de <i>P. aeruginosa</i> corado pelo Comassie Blue e reatividade das proteínas de membrana externa, adsorvidas em membrana de nitrocelulose com o plasminogênio marcado com biotina.....	47
Figura 10 -	Degradação do substrato cromogênico da plasmina pelas diferentes cepas revestidas com plasminogênio, após tratamento ou não com uroquinase.....	49
Figura 11 –	Degradação do substrato cromogênico da plasmina pelas cepas F4 e S6 revestidas com plasminogênio (P), na presença (u-PA+) , ausência (u-PA-) de uroquinase e em presença ou ausência de EDTA.....	50

Figura 12 –	Evolução dos valores de $A_{405\text{ nm}}$ dos sobrenadantes dos poços de microplacas revestidos com as cepas F4 e S6 após incubação com o substrato cromogênico da plasmina, ao longo de 24 horas de incubação.....	51
Figura 13 –	Fotomicrografia óptica mostrando a imunolocalização de plasminogênio na superfície de células bacterianas da cepa PAK.....	52
Figura 14 –	Capacidade de invasão dos géis de fibrina de células da cepa PAK tratadas com plasminogênio e estreptoquinase (T) e de bactérias controle não tratadas (C). Representação esquemática da ativação do plasminogênio por u-PA em célula neoplásica.	53
Figura 15 –	Fotomicrografia óptica de um corte de um dos géis de fibrina (GF) sobre a membrana (M) do inserto, após cinco horas de incubação com suspensão da cepa PAK não tratada com plasminogênio e ativador.....	53
Figura 16 –	Fotografias de tubos de Durhan contendo géis de fibrina inoculados com células bacterianas da cepa PAK, tratadas com plasminogênio e estreptoquinase (P+) ou não tratadas (P-), após incubação por 3 horas (A) e por 24 horas (B e C).....	55
Figura 17-	Fotomicrografias ópticas (x 1000) de monocamadas de células ECV-304 não infectadas (A) e infectadas por cinco horas com suspensão da cepa PAK tratada com plasmiogênio e estreptoquinase (B) e com bactérias controle não tratadas (C).....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Arg	Arginina
Asp	Aspargina
BSA	Soroalbumina bovina
CD 87	Grupamento de diferenciação celular
CO ₂	Monóxido de carbono
DAB	Ácido diaminopimérico
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGF	Fator do crescimento epidérmico
GAPDH	Gliceraldeído -3- fosfato-desidrogenase
His	Histidina
IgG	Imunoglobulina G
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lis	Lisina
Omp	Ompina
OPD	Orto-fenileno-diamina
PAI-1	Inibidor da ativação do plasminogênio do tipo 1
PAI-2	Inibidor da ativação do plasminogênio do tipo 2
PBS	Salina tampão fosfato
Pg	Plasminogênio
SDS	Duodecil sulfato de sódio
Ser	Serina
Serpina	Proteína inibidora de serina-proteases
t- PA	Ativador de plasminogênio tecidual
TTC	Cloreto de trifetil tetrazólio
u-PA	Ativador de plasminogênio do tipo uroquinase
u-PAR	Receptor de u-PA
Val	Valina

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
α	Alfa
β	Beta
ε	Épsilon
°C	Graus Celcius
H ₂ O	Molécula da água
OsO ₄	Molécula doTetróxido de ósmio
mL	Mililitro
μL	Microlitro
g	grama
mg	milligrama
μg	micrograma
cm	Centímetro
nm	Nanômetro
kDa	quiloDalton
rpm	Rotações por minuto
A	Absorbância
H	Hora
v/v	Volume sobre volume
M	Molar
mM	miliMolar
μM	microMolar
nM	nanoMolar
K _d	Constante de dissociação
mA	miliAmpére

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	OBJETIVOS	18
2	MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1	Cepas Bacterianas	29
2.2	Captura de plasminogênio	31
2.2.1	<u>Aderência das bactérias a poços de microplacas de ELISA</u>	31
2.2.2	<u>Teste de ELISA</u>	32
2.2.3	<u>Teste de inibição da captura de plasminogênio</u>	33
2.3	Ligação de plasminogênio a proteínas de membrana externa de <i>P. aeruginosa</i>	33
2.3.1	<u>Obtenção dos extratos de proteínas de membrana externa</u>	33
2.3.2	<u>SDS-PAGE das proteínas de membrana externa</u>	34
2.3.3	<u>Western-Blotting das proteínas de membrana externa</u>	34
2.4	Ativação de plasminogênio	35
2.4.1	<u>Testes colorimétricos para detecção da ativação do plasminogênio</u>	35
2.4.2	<u>Efeitos do EDTA na ativação de plasminogênio por <i>P. aeruginosa</i></u>	36
2.5	Influência da captura e ativação de plasminogênio por cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na degradação e invasão de géis de fibrina	37
2.5.1	<u>Preparação de géis de fibrina em insertos MilliCell –PCF</u>	37
2.5.2	<u>Preparação das suspensões bacterianas</u>	37
2.5.3	<u>Teste quantitativo de invasão dos géis de fibrina</u>	38
2.5.4	<u>Preparação de géis de fibrina em tubos</u>	39
2.5.5	<u>Testes de invasão dos géis de fibrina em tubos</u>	40
2.6	Efeito da captura do plasminogênio na invasão de culturas de células	40
2.6.1	<u>Cultura de células ECV- 304</u>	40
2.6.2	<u>Teste quantitativo de invasão das monocamadas de células ECV 304 por <i>P.aeruginosa</i></u>	41
2.7	Microscopia óptica dos géis de fibrina e de monocamadas de células infectadas por <i>P. aeruginosa</i> tratadas ou não com plasminogênio	42
2.8	Análise estatística	42

3	RESULTADOS	43
3.1	Aderência de <i>P. aeruginosa</i> aos poços das microplacas de ELISA	43
3.2	Captura de plasminogênio por cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
3.3	Inibição da captura de plasminogênio	45
3.4	Captura do plasminogênio por proteínas de membrana externa	46
3.5	Ativação do plasminogênio na superfície de <i>P. aeruginosa</i>	48
3.6	Efeito da captura e ativação de plasminogênio por <i>P. aeruginosa</i> na invasão de géis de fibrina	51
3.6.1	<u>Testes quantitativos de invasão de géis de fibrina</u>	52
3.6.2	<u>Testes de invasão de géis de fibrina contidos em tubos de Durhan</u>	54
3.7	Efeito da captura e ativação do plasminogênio por <i>P. aeruginosa</i> na invasão de monocamadas de células ECV-304	56
4	DISCUSSÃO	58
	CONCLUSÕES	66
	PERSPECTIVAS	67
	REFERÊNCIAS	68
	APÊNDICE – Artigo publicado	75

INTRODUÇÃO

Patogenia e determinantes de virulência de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram negativo pertencente à família *Pseudomonadaceae*, de distribuição ubíqua e cosmopolita. Seus habitats naturais são solo, água, ambientes marinhos e superfícies de algumas plantas. Nos ambientes aquáticos, ocorre sob a forma planctônica livre, com intenso movimento natatório. Ao contrário, em superfícies úmidas, é frequentemente encontrada aderida a suportes sob a forma de biofilmes (Watnick e Kolter, 2000).

P. aeruginosa pode ainda ser encontrada como flora de diferentes espécies animais. No homem, a taxa de colonização em pacientes internados em Unidades de Tratamento Intensivo pode ser de até 34% dos indivíduos, dependendo do sítio pesquisado e também da ocorrência de certas condições predisponentes, como a pressão seletiva de antibióticos (Bonten *et al.*, 1999).

A grande capacidade de adaptação explica a ampla distribuição de *P. aeruginosa* na natureza. Embora habitualmente exibam metabolismo oxidativo, podem também crescer em ausência de O₂, desde que fontes de nitratos, que atuam como aceptores de elétrons, estejam presentes no ambiente (Chayabutra e Lu-Kwang, 2000). Suas exigências nutritivas são mínimas e podem crescer até mesmo em água destilada. Também possuem uma ampla faixa de temperatura ótima de crescimento, variando de 37° a 42°C (Koneman *et al.*, 1997).

Apesar de sua ampla distribuição na natureza, *P. aeruginosa* raramente causa infecção em indivíduos saudáveis. Ao contrário, é importante agente de doença infecciosa em pacientes com comprometimento de seus mecanismos de defesa ou portadores de lesões primárias, sendo isolada em infecções de diversos sítios, como pele, tecidos moles, ossos, articulações, trato urinário, ouvidos, válvulas cardíacas, trato respiratório, sangue, sistema nervoso central e olhos (Murray *et al.*, 1995).

P.aeruginosa é também um dos micro-organismos Gram negativos mais comumente isolados em infecções hospitalares, tendo sido responsabilizado por 16% dos casos de pneumonias nosocomiais, 12% das infecções urinárias hospitalares, 8% das infecções pós-cirúrgicas e 10% das bacteremias (Van Delden e Iglewski, 1998). Em um levantamento mais recente, realizado por Hsueh *et al.* (2002), foi identificado como o agente bacteriano de infecções hospitalares mais frequente, depois de *Candida spp.* e *Staphylococcus spp.*

Em nosso meio *P. aeruginosa* destaca-se como um importante patógeno humano. Em estudos realizados em um hospital público da cidade do Rio de Janeiro, no período de 1995 a 1997 foi o segundo micro-organismo mais prevalente em infecções nosocomiais, tendo sido responsável por 18,5% dos casos. Considerando-se o número total de isolamentos de *P. aeruginosa*, 38,6% dos casos foram procedentes de enfermarias de Clínica Médica, 20,4% de enfermarias de Cirurgia Geral e 15,9% de Unidades de Tratamento Intensivo. Os sítios de isolamento mais frequentes foram as feridas cirúrgicas (22,0%) e tratos respiratórios inferior (20,4%) e superior (13,6%), enquanto 4,5% das amostras foram isoladas de sangue de pacientes septicêmicos. De um modo geral, as amostras isoladas apresentaram elevados níveis de resistência aos aminoglicosídeos e cefalosporinas (De Moraes *et al.*, 2000).

As infecções por *P. aeruginosa* podem levar a altas taxas de mortalidade, da ordem de 30% em pacientes neutropênicos e naqueles que sofreram transplante de medula óssea e da ordem de 38% nos casos de pneumonias e septicemias em pacientes artificialmente ventilados (Van Delden e Iglewski, 1998).

A ocorrência e a importância clínica de *P. aeruginosa* podem ser explicadas por sua virulência multifatorial e complexa, relacionada a inúmeras peculiaridades que variam com o sítio de infecção, condições específicas do hospedeiro e com o fenótipo das cepas, que pode ser invasivo, nas cepas isoladas de sangue, em condições como neutropenia induzida, ou citotóxico, naquelas isoladas de trato respiratório (Tang *et al.*, 1996; Fleiszig *et al.*, 1997; Hirakata *et al.*, 2000).

Os principais determinantes de virulência de *P. aeruginosa* podem ser classificados como fatores de colonização e exoenzimas.

Entre os fatores de colonização destacam-se as fímbrias do tipo IV (Doig *et al.*, 1988), flagelos (Arora *et al.*, 1996) e adesinas não fimbriais, como o glicocálix (Lazdunski, 1998), o exopolissacarídeo dos alginatos das cepas mucóides (Watnick e Kolter, 2000) e as proteínas da membrana externa (Carnoy *et al.*, 1994; Plotkowski, Tournier e Puchelle, 1996).

As exoenzimas de *P. aeruginosa* são secretadas por três diferentes vias. A do tipo I que depende da ação de três proteínas exportadoras de produtos bacterianos do meio intracelular para o meio extracelular, como a protease alcalina, sem a participação de componentes intermediários presentes no espaço periplasmático. Estas três proteínas são o transportador ABC, localizado dentro da membrana interna, codificado pelo gene *aprD*, a proteína MFP, codificada pelo gene *aprE*, a qual possibilita a continuidade entre as membranas interna e

externa, e uma terceira proteína, codificada por *aprF*, que aflora como um poro na membrana externa (Lazdunski, 1998, Starthopoulos *et al.*, 2000).

A via secretória do tipo II depende de um regulon codificante para cerca de 12 proteínas Xcp, homólogas a GSP (General Secretory Pathway- Via Secretória Geral) de outras bactérias Gram negativas. Essas proteínas são exportadas em duas etapas. Inicialmente as proteínas bacterianas, acopladas a um peptídeo sinal, atravessam a membrana interna. Já no periplasma, esse complexo é parcialmente fragmentado e reconhecido pela maquinaria de secreção que promove sua passagem pela membrana externa. Essas proteínas são translocadoras de sinais e estão envolvidas na biossíntese de precursores das pili do tipo IV e na secreção de fatores de virulência, como elastases, exotoxina A, citotoxinas formadoras de poros e hemolisinas, como a fosfolipase C e lecitinases (ramnolipídeos) (Lazdunski, 1998; Bleves *et al.*, 1999).

A via secretória do tipo III depende de um regulon codificante para cerca de 20 proteínas. Seu mecanismo de exportação, extremamente complexo, possibilita a secreção das exoenzimas Exo S, Exo T, Exo Y e Exo U, dotadas de atividade citotóxica para diferentes tipos celulares, e dependem do contacto entre as células bacteriana e hospedeira (Lazdunski, 1998 ; Coburn e Frank, 1999).

Também são determinantes de virulência de *P. aeruginosa* pigmentos sideróforos, como a pioverdina, a piocelina, um outro pigmento dotado de potencial redox, a piocianina, e o lipopolissacarídeo da parede celular bacteriana (Meyer *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1996; Lazdunski, 1998).

A expressão fenotípica de muitos dos fatores de virulência de *P. aeruginosa* é coordenada por sistemas de sinalização célula-célula conhecidos como “quorum sensing”. Foram identificados em *P. aeruginosa* dois tipos de sistemas “quorum sensing” interativos, chamados de las e rhl. Esses sistemas envolvem moléculas sinalizadoras, do tipo homoserina-lactona ou quinolonas, e proteínas ativadoras da transcrição específica de alguns genes, codificantes para as elastases Las A e Las B, exotoxina A, protease alcalina, ramnolipídios, alginato e proteínas xcp da via de secreção do tipo II. Sob o controle desses sistemas “quorum sensing”, a síntese e secreção de exoprodutos são condicionadas à densidade populacional bacteriana, somente ocorrendo quando os micro-organismos atingem a fase de crescimento exponencial, o que favorece o escape dos patógenos aos mecanismos de defesa do hospedeiro (Glessner *et al.*, 1999; Kievit e Iglewsky, 2000).

A multirresistência a antimicrobianos encontrada em muitas cepas de *P. aeruginosa* também é apontada como um importante determinante de virulência. Pode ser favorecida por

múltiplos fatores, como a pressão seletiva decorrente da manutenção de elevadas concentrações de antimicrobianos no ambiente. Esse mecanismo é especialmente importante nas cepas isoladas de ambiente hospitalar. Além disso, os biofilmes decorrentes da produção de alginatos podem conferir impermeabilidade a antimicrobianos (Van Delden e Iglewski, 1998; Watnick e Kolter, 2000; Brooun, Liu e Lewis, 2000).

Apesar da produção de inúmeros fatores de virulência, dos sofisticados sistemas reguladores de sua produção e de sua elevada resistência a antimicrobianos, *P. aeruginosa* ainda permanece um micro-organismo oportunista. Assim, as infecções primárias causadas por esse micro-organismo restringem-se, habitualmente, a tecidos previamente lesados (de Bentzmann, Plotkowski e Puchelle, 1996). Embora na maior parte das vezes essas infecções localizadas regridam, seja em decorrência de resposta imune do hospedeiro ou de terapia antimicrobiana bem sucedida, em outras, se observa a disseminação sistêmica da infecção.

Diversos autores têm procurado correlacionar a afinidade de *P. aeruginosa* por tecidos lesados à interação do micro-organismo com os componentes das matrizes extracelulares (de Bentzmann, Plotkowski e Puchelle, 1996). Essas interações envolvem etapas como aderência e degradação dos componentes da matriz extracelular por enzimas proteolíticas (Heck, Morinasa e Abrahamson, 1986; Bejarano *et al.*, 1989). No entanto, em um estudo em que coelhos foram inoculados com cepas produtoras e não produtoras de proteases, não foi verificada correlação perfeita entre a produção dessas enzimas e a capacidade de disseminação de cepas de *P. aeruginosa* (Ziegler e Douglas, 1979).

O sistema fibrinolítico humano

Em condições fisiológicas, lesões de tecidos humanos são seguidas por uma série de eventos celulares e bioquímicos que visam restabelecer a arquitetura e função tissular. Entre os eventos mais precoces destaca-se a formação de um coágulo compacto de fibrina e plaquetas agregadas. Essa estrutura neoformada é responsável pela hemostasia que é imprescindível à evolução satisfatória do processo de reparação tissular (Ruggeri, Dent e Saldívar, 1999; Tapper e Herwald, 2000). Em fase posterior do processo reparatório, o coágulo de fibrina é dissolvido por um sistema fibrinolítico que depende da ação de uma serino-protease, a plasmina. Esta é gerada pela conversão de um precursor presente no plasma, o plasminogênio, pela ação de ativadores teciduais (t-PA, Tissue plasminogen activator) ou de ativadores do tipo uroquinase (u-PA, urokinase-type plasminogen activator), (Broder *et al.*, 1991; Tapper e Herwald, 2000).

O plasminogênio é uma glicoproteína desprovida de atividade enzimática, sintetizada no fígado, abundante no plasma e em fluidos tissulares. Sua concentração plasmática em adultos varia de cerca de 180 a 200 $\mu\text{g/mL}$ (2 μM). É formado por uma cadeia única com peso molecular em torno de 92 kDa, contendo 791 aminoácidos, sendo o ácido glutâmico o aminoácido presente em sua extremidade N terminal (Glu-plasminogênio). Fisiologicamente, mediante um evento autocatalítico espontâneo, ocorre a clivagem entre 2 resíduos de lisina (Lis⁷⁷ – Lis⁷⁸), que resulta na remoção de um peptídeo contendo o resíduo de ácido glutâmico terminal e na maior estabilidade da molécula. Desse modo, a molécula de Glu- plasmina ou Glu-plasminogênio é autoconvertida na forma que contém lisina como aminoácido N terminal, chamada de Lis-plasmina ou Lis-plasminogênio (Ullberg *et al.*,1992; Lähteenmäki *et al.*,1995; Gonias, 1996) (Figura 1).

Os ativadores de plasminogênio agem clivando a molécula do zimogênio entre os resíduos Arg⁵⁶⁰-Val⁵⁶¹, dando origem a duas cadeias, A e B, unidas por duas pontes dissulfeto (Figura 1). Essa nova configuração, em cadeia dupla, confere à molécula a atividade proteolítica que caracteriza a plasmina.

A cadeia A do plasminogênio abriga cinco alças triplas (chamadas de domínios “kringle”) que funcionam como os sítios responsáveis pela interações não covalentes entre o plasminogênio/plasmina e diferentes moléculas, como α_2 anti-plasmina, fibrinogênio, fibrina, fibronectina, trombospondina, vitronectina, gangliosídios, receptores da superfície celular e resíduos de lisina ou seus análogos sintéticos, como o ácido amino caprótico (Ullberg, Kronvall e Wiman, 1989) (Figura 1).

Figura 1. Representação esquemática da estrutura do plasminogênio

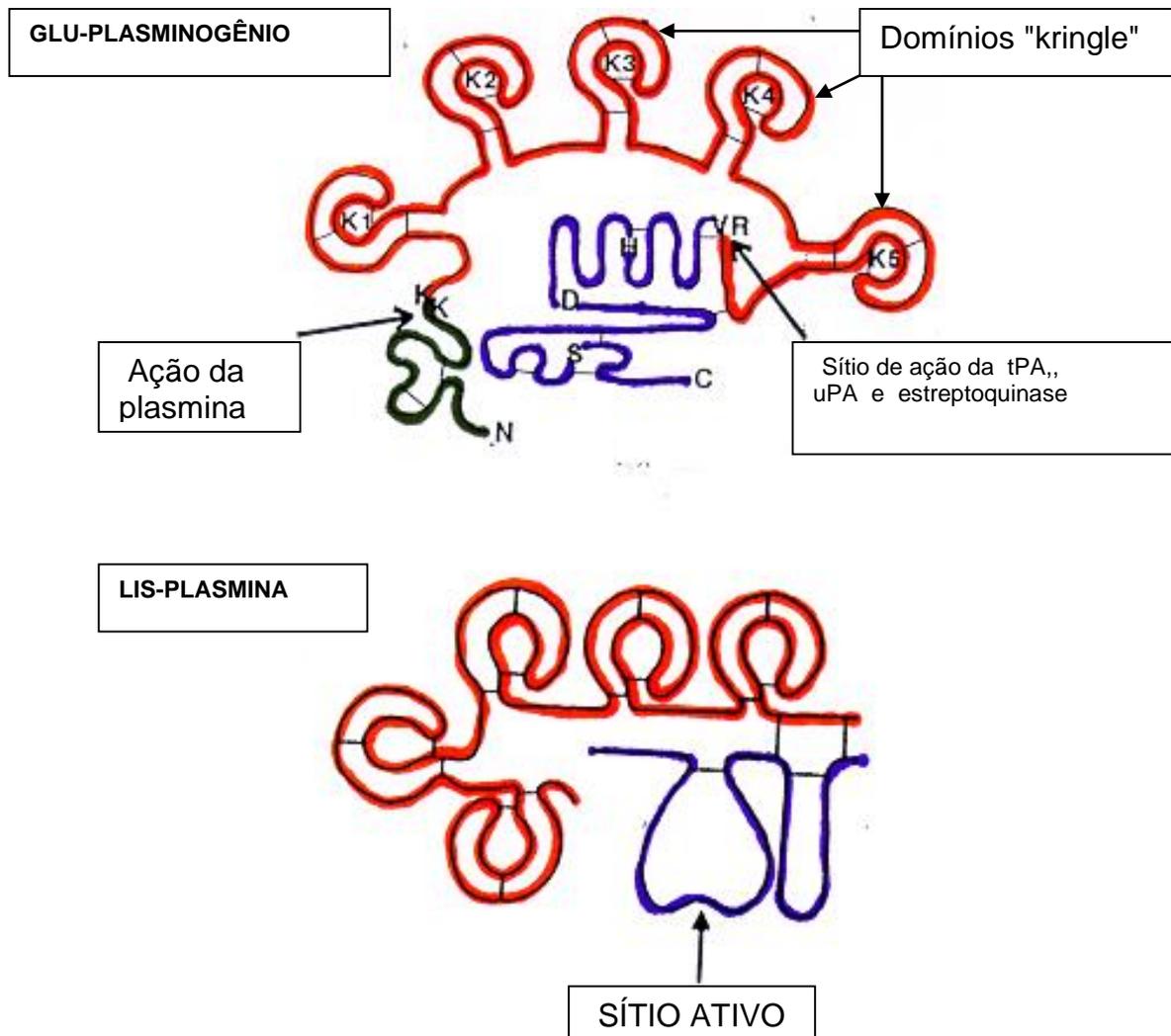


Figura 1. Representação esquemática da estrutura do plasminogênio.

N e C representam as regiões amino e carboxi terminais da molécula, respectivamente. O sítio catalítico é composto pelos aminoácidos serina (S), ácido aspártico (D) e histidina (H). A ligação Arg-Val (VR) é clivada pelos ativadores do plasminogênio dando origem à molécula enzimaticamente ativa da plasmina, formada por duas cadeias peptídicas. A clivagem do Glu-plasminogênio entre os dois resíduos de lisina (KK) dá origem à molécula Lis plasminogênio, mais susceptível à ativação por tPA e uPA. Adaptado de Lottenberg R, Minning-Wenz D, Minning-Wenz D, Boyle MD. Capturing host plasmin(ogen): a common mechanism for invasive pathogens? **Trends Microbiol.** v.2, p. :20-4, 1994

A cadeia B exibe a atividade proteolítica da plasmina, que é uma serino- protease capaz de digerir, além de fibrina, proteínas da matriz extracelular e da membrana basal, como laminina e outras glicoproteínas não colagenosas (Ullberg *et al.*,1992) .

Quanto às moléculas ativadoras de plasminogênio, t-PA é a principal molécula envolvida na dissolução de coágulos de fibrina enquanto u-PA está mais relacionado com a ativação de plasminogênio que favorece a invasão de barreiras teciduais por diferentes tipos celulares (Stepanova e Tkachuk , 2002).

O ativador t-PA é uma proteína ativa, de cadeia simples e com cerca de 70 kDa, produzido e secretado por células endoteliais. Possui dois domínios “kringle”, um domínio semelhante ao do fator de crescimento epidérmico (EGF, Epidermal Growth Factor) e um domínio amino terminal homólogo ao sítio ligador de fibrina presente na molécula de fibronectina e que, junto com o domínio “kringle” 2, confere alta afinidade para fibrina. Seu sítio ativo, como o de outras serino-proteases, contém a tríade His³²², Asp³⁷¹ e Ser⁴⁷⁸. Plasmina, calicreína e o fator Xa da via de coagulação clivam a ligação Arg²⁷⁵-Leu²⁷⁶ convertendo a molécula em outra com cadeias duplas, unidas por duas pontes dissulfeto.

Essa forma de t-PA de cadeia dupla é muito mais ativa sobre substratos cromogênicos e atua mesmo na ausência de fibrina. Entretanto ambas as formas de t-PA ativam plasminogênio com igual intensidade. Na presença de moléculas de plasminogênio aderidas à fibrina, a capacidade catalítica de t-PA aumenta em cerca de 1000 vezes (Dobrovolsky e Titaeva, 2002; Parfyonova, Plekhanova e Tkachuk, 2002)

O ativador u-PA é uma proteína semelhante à tripsina. Muitas células eucarióticas secretam uma forma de u-PA inativa, de cadeia única com 54 kDa. A porção N- terminal da molécula é homóloga à do EGF e é seguida por dois domínios “kringle”. A carboxila terminal encerra o sítio ativo, contendo a tríade His²⁰⁴, Asp²⁵⁵ e Ser³⁵⁶. A cadeia simples de u-PA também pode ser clivada por calicreína e plasmina na região Lis¹⁵⁸- Ile¹⁵⁹ convertendo-a na forma ativa, composta por duas cadeias unidas por uma ponte dissulfeto (Dobrovolsky e Titaeva, 2001).

O ativador u-PA interage com um receptor específico encontrado em diversos tipos de células eucarióticas, como monócitos, neutrófilos, granulócitos, linfócitos T ativados, células endoteliais, hepatócitos, fibroblastos, queratinócitos, células do músculo liso, dendríticas e ainda em diversas células tumorais. Este receptor, chamado u-PAR, é uma glicoproteína com cerca de 45 a 65 kDa, ligada ao receptor CD 87 (Cluster of Differentiation, grupamento de diferenciação 87) da membrana celular por meio de uma âncora de resíduos de glicosil inositol fosfato. Possui em sua porção extracelular 3 domínios contendo o motivo lisina. Além da interação com o ativador u-PA, u-PAR também interage com integrinas, vitronectina e

cininogênio e exerce papel importante no recrutamento de neutrófilos durante processos inflamatórios /infecciosos (Godar e Stockinger, 2000).

Fisiologicamente, a modulação da atividade fibrinolítica é exercida pelos inibidores da ativação do plasminogênio (PAI-1 e PAI-2 Plasminogen activator inhibitor-1 and 2) e por proteínas antagonistas da atividade da plasmina, como α 2-antiplasmina e α 2-macroglobulina. Isso ocorre porque, em fase fluida, o inibidor PAI -1 compete com o plasminogênio ligando-se ao seu principal ativador, o t-PA. Também em fase fluida, a atividade da plasmina é inibida pela ação da α 2- antiplasmina (Figura 2). Coletivamente, as proteínas capazes de inibir a atividade de serina proteases, como a plasmina, são chamadas de serpinas (serina prototease inhibitors) (Parkkinen, Hacker e Korhonen, 1991). Assim, o balanço entre os níveis de ativadores de plasminogênio, dos inibidores PAI-1 e PAI-2 e da α 2- antiplasmina controlam a formação e a atividade da plasmina (Tapper e Herwald, 2000).

Além de sua atuação nos processos de reparação/regeneração tecidual, o sistema fibrinolítico participa na regulação de eventos como a migração celular no curso da embriogênese e do remodelamento de tecidos. É também importante durante a angiogênese, aterogênese e metástase de células tumorais (Davidson e Benn, 1996; Chavakis *et al.*, 1998).

Uma consequência da ligação do plasminogênio/plasmina a receptores celulares ou à rede de fibrina é sua modificação conformacional. Esta modificação tanto favorece a ação dos ativadores quanto protege a plasmina da ação do inibidor fisiológico α 2 antiplasmina, possibilitando a manutenção de sua atividade proteolítica (Ullberg, Kronvall e Wiman., 1989; Verlich *et al.*, 1998).

Além da capacidade de degradar a fibrina, várias outras atividades biológicas são atribuídas à plasmina, como a ativação do sistema complemento e de proenzimas, como as collagenases latentes e precursores de metaloproteases das matrizes extracelulares. Como consequência da atividade proteolítica, são gerados produtos que afetam a permeabilidade dos vasos sanguíneos colaborando para um acúmulo de células inflamatórias (Lottenberg, Minning-Wenz e Byle, 1994; Ploplis *et al.*, 1998).

Figura 2. Representação esquemática da ativação e regulação da atividade do sistema fibrinolítico humano.

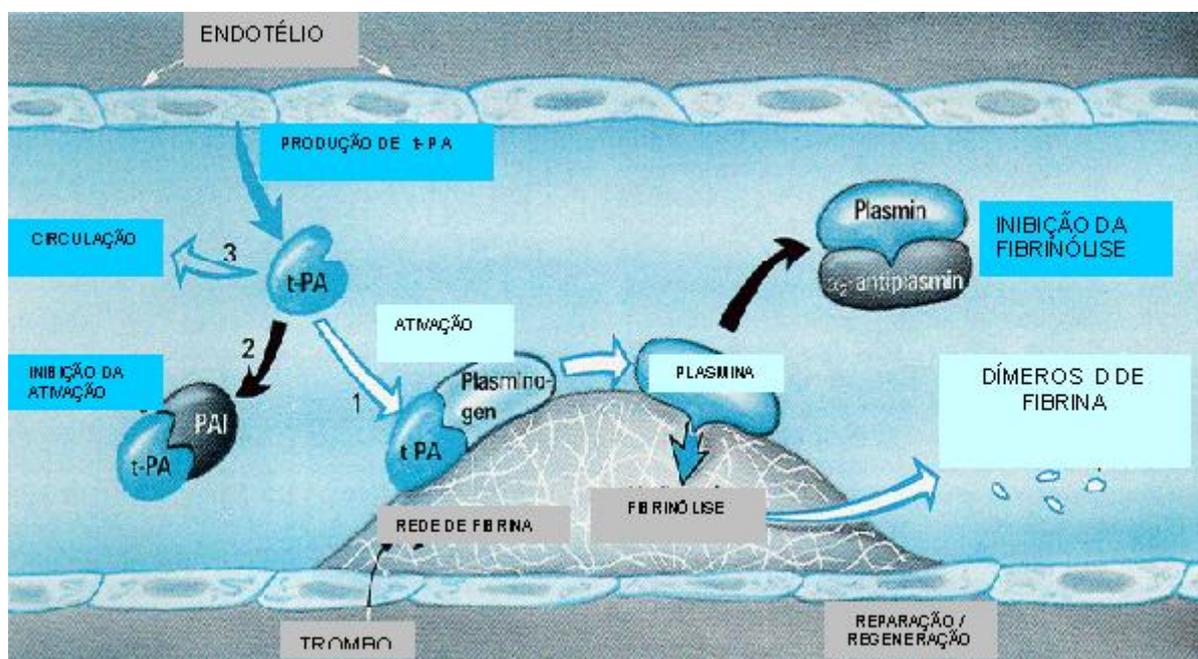


Imagem adaptada de Francis, C. W., & Marder, V. J. Concepts of Clot Lysis. Annual Review of Medicine, v. 37 p., 187- 204, 1986.doi:10.1146/annurev.me.37.020186.001155

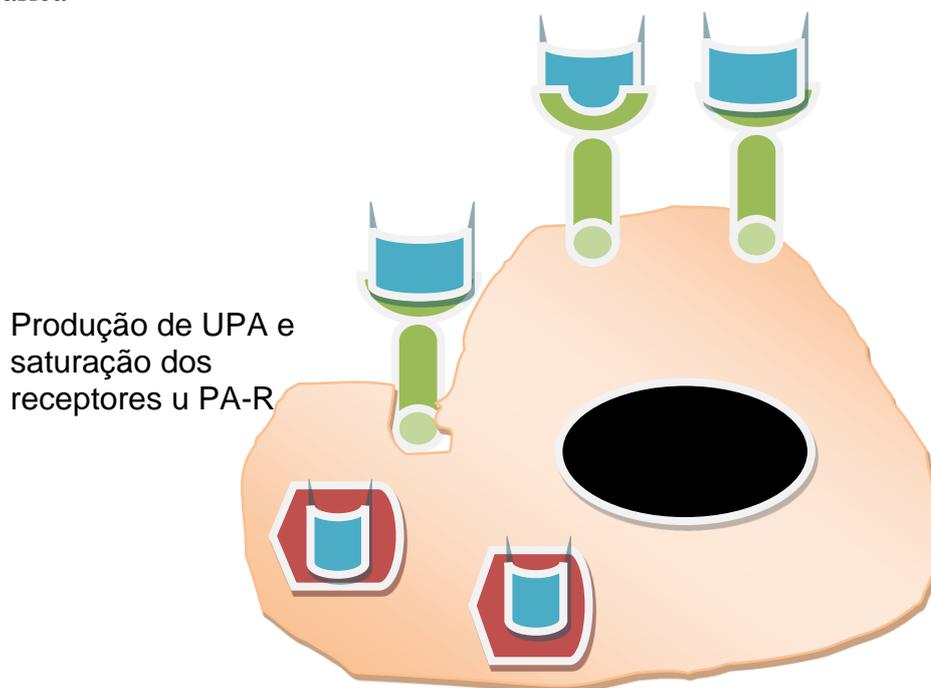
Durante infecções bacterianas, o hospedeiro responde com uma variedade de mecanismos, que podem ser modulados por micro-organismos ou produtos de seu metabolismo. Nas infecções graves, como a sepsis, os sistemas de coagulação e fibrinolítico são alvos dessas modulações. As cascatas de ativação de ambos os sistemas são disparadas nos sítios tissulares infectados. Em algumas situações, o sistema fibrinolítico desempenha papel importante evitando o acúmulo de fibrina e a falência de órgãos vitais (Tapper e Herwald, 2000).

Algumas células eucarióticas, como plaquetas, monócitos, granulócitos, linfócitos B e T, são capazes de ligar plasmina/ plasminogênio em suas superfícies. Como consequência, ocorre aumento na concentração da enzima ativa no microambiente, o que pode ser importante para facilitar o acesso de células sanguíneas inflamatórias ao sítio onde se desenrola o processo. Também no curso da resposta imune a agentes infecciosos, a ativação de plasmina nas superfícies de células de defesa facilita a sua migração através das barreiras de fibrina formadas pelas defesas do hospedeiro (Ullberg *et al.*, 1992, Ploplis *et al.*, 1998).

Estudos *in vitro* realizados com culturas de células endoteliais humanas, que expressam receptores para plasminogênio, mostraram que receptores para u-PA estão presentes, localizados nos sítios de adesão célula-célula e nos contatos focais. A adição de plasminogênio e u-PA a essas células causou retração das culturas. Como consequência, foi observada a perda da integridade dos contatos de adesão célula-célula e focais, com subsequente alteração da permeabilidade da cultura e exposição da membrana basal sub-endotelial, que se tornou suscetível à proteólise (Conforti *et al.*, 1994; Chavakis *et al.*, 1998).

A maioria das células tumorais produz grandes quantidades de ativadores de plasminogênio e de seus receptores, sendo capazes de disparar a saturação autócina dos receptores para u-PA e seus precursores pró u-PA (Figura 3).

Figura 3. Representação esquemática da ativação de plasminogênio por u-PA em uma célula neoplásica



Legenda : Uroquinase (u-PA) fixa-se a receptores celulares. O plasminogênio é ativado e a plasmina ativa promove a invasão de células neoplásicas através da matriz extracelular.

A ativação de plasminogênio na superfície de células neoplásicas aderidas a células endoteliais causa retração do endotélio, favorecendo a penetração de células tumorais e a degradação de glicoproteínas da matriz extracelular. Outra consequência da ativação de plasminogênio nas neoplasias é a ativação de metaloproteases, que dissolvem colágenos e de fatores de crescimento e estimuladores dos hepatócitos pelos ativadores u-PA e t-PA (Davidson e Benn, 1996).

Captura e ativação do plasminogênio por patógenos bacterianos

A estreptoquinase, uma proteína produzida por *Streptococcus pyogenes*, tem sido amplamente utilizada por várias décadas no tratamento de doenças cardiovasculares com o objetivo de dissolver coágulos. Entretanto, somente em 1987, estudos pioneiros estabeleceram uma correlação entre a sua produção e a capacidade de disseminação do *S. pyogenes* favorecida pela captura de plasmina. Nesse estudo, os autores descreveram a presença de um receptor presente na superfície da célula bacteriana específico para plasmina (Lottenberg, Broder e Boyle, 1987). Nos anos que se seguiram, foram descritos outros receptores com afinidade específica para sítios da molécula do plasminogênio, contidos em alguns dos domínios “Kringle”, tanto em bactérias Gram positivas, como *Streptococcus pneumoniae* e outros alfa hemolíticos, *S. equisimilis* e beta hemolíticos do grupo G (Ullberg, Kronvall e Wiman, 1989), quanto em Gram negativas, como enterobactérias, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis* (Ullberg *et al.*, 1990).

Cepas de *Neisseria meningitidis* e *N. gonorrhoeae* também foram capazes de ligar e ativar plasminogênio. Na superfície das cepas de *N. meningitidis* testadas, as análises das interações receptor – ligante caracterizaram a presença de dois tipos de receptores. Do primeiro tipo, foram encontrados cerca de 3 000 a 6 000 receptores por célula bacteriana, com constante de dissociação (K_d) da ordem de 50 nM. Do segundo tipo, foram encontrados de 10 000 a 20 000 receptores por bactéria. Apesar de mais numerosos, esse segundo tipo de receptores apresentou afinidade inferior à do primeiro, com K_d de 200 nM. Os valores referentes à afinidade foram ligeiramente inferiores aos valores dos receptores detectados em cepas de *Staphylococcus*

aureus, mas foram praticamente os mesmos encontrados em estreptococos beta hemolíticos dos grupos A, C e G. (Ullberg *et al.*, 1992).

Ullberg, Wiman e Kronvall, 1994 mostraram que além dos receptores para plasminogênio, *N. meningitidis* e *H. influenzae* apresentavam também receptores para o ativador tecidual t-PA e que nenhuma das cepas testadas apresentava receptores para ativadores do tipo uroquinases (u-PA). Ao contrário, em cepas de *Borrelia burgdorferi*, além de receptores para plasminogênio e plasmina, foram também detectados receptores para ativadores do tipo u-PA (Fuchs *et al.*, 1994; Klempner *et al.*, 1995; Coleman *et al.*, 1995).

Atualmente a relação de micro-organismos capazes de interagir com proteínas do sistema fibrinolítico humano é extensa e inclui, além dos já citados, *S. aureus* (Zavision, White e Bramley, 1997; Santala *et al.*, 1999), *Escherichia coli* (Parkkinen e Korhonen, 1989; Korhonen *et al.*, 1992; Lottenberg *et al.*, 1992), *Yersinia pestis* (Lähteenmäki *et al.*, 1998; Kuttyrev *et al.*, 1999), *Salmonella enterica* sorovariante Typhimurium (Kukkonen *et al.*, 1998), *Helicobacter pylori* (Ljungh, 2000) e *Mycobacterium tuberculosis* (Monroy *et al.*, 2000).

No curso dos processos infecciosos, acredita-se que o contato de micro-organismos com membranas basais, reservatórios de alguns precursores do sistema fibrinolítico no hospedeiro humano (Kukkonen *et al.*, 1998; Lähteenmäki *et al.*, 1998), seguida da ativação de plasminogênio nas superfícies bacterianas, possa favorecer a disseminação bacteriana através dos tecidos do hospedeiro (Lähteenmäki *et al.*, 1993; Lähteenmäki *et al.*, 1995).

Vários modelos foram propostos visando explicar a invasividade bacteriana via ativação do sistema fibrinolítico. Tanto para micro-organismos Gram positivos quanto para Gram negativos, as opiniões convergem para a existência de duas vias que podem ser utilizadas simultaneamente ou não. Uma delas é dependente da ativação de plasminogênio por meio de ativadores endógenos do hospedeiro. Na outra, os micro-organismos produzem seus próprios ativadores de plasminogênio (Lottenberg, Minning-Wenz e Boyle, 1994).

Na via pela qual a invasividade bacteriana foi relacionada à ativação do sistema fibrinolítico com a participação dos ativadores do hospedeiro, o plasminogênio, os ativadores ou até mesmo a plasmina são capturados por receptores da superfície bacteriana (Lottenberg, Minning-Wenz e Boyle, 1994; Sjobring, Pohl e Olsen, 1994; Lähteenmäki *et al.*, 1995).

Diversas moléculas da superfície bacteriana têm sido apontadas como receptores para o plasminogênio/plasmina e, portanto, relacionadas à atividade proteolítica de superfície bacteriana *in vitro*. Alfa enolases análogas à gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH)

são capazes de ligar plasmina a bactérias do gênero *Streptococcus* (Broder *et al.*, 1991; Wang e Lottenberg, 1994).

Algumas adesinas bacterianas, como a proteína M de *S. pyogenes* (Ringdahl e Sjöbring, 2000), flagelos (Lähteenmäki *et al.*, 1993), fímbrias S de *E. coli* (Parkkinen, Hacker, Kornhonen, 1991; Korhonen *et al.*, 1992), fímbrias G de *E. coli*, fímbrias do tipo 1 de *S. enterica* sorovariante Thyphimurium (Kukkonen *et al.*, 1998) e fímbrias curli de *S. enterica* (Sjöbring, Pohl e Olsen, 1994), exibem estruturas filamentosas, morfologicamente similares à fibrina, o principal alvo do sistema fibrinolítico, e são capazes de ligar plasminogênio ou t-PA.

Outras moléculas bacterianas capazes de ligar plasminogênio são proteínas da membrana externa, como a OspA de *B. burdorferi* (Fuchs *et al.*, 1994), de *H. pylori* (Ljungh, 2000) e proteínas solúveis e da parede celular de *M. tuberculosis* (Monroy *et al.*, 2000).

Estudos *in vitro* mostraram que o ácido ϵ -amino capróico (EACA), um análogo sintético da L-lisina, utilizado terapêuticamente como inibidor da proteólise induzida pela plasmina (Tapper e Herwald, 2000), foi também capaz de inibir a fixação de plasminogênio/plasmina às superfícies bacterianas, evidenciando o envolvimento dos resíduos de lisina no processo (Lähteenmäki *et al.*, 1993; Conforti *et al.*, 1994; Coleman *et al.*, 1995; Kukkonen *et al.*, 1998; Monroy *et al.*, 2000).

De modo semelhante ao observado em células eucarióticas, em estudos experimentais em que o plasminogênio foi imobilizado na superfície de células bacterianas, foi observado um aumento na sua ativação devido a variações conformacionais da molécula ocorridas após sua ligação aos receptores, facilitando a ação dos ativadores t-PA e u-PA (Ullberg *et al.*, 1992; Lähteenmäki *et al.*, 1995).

Também em estudos realizados com micro-organismos, foi observado que a adição de α -2 antiplasmina a bactérias que apresentavam plasmina fixada não foi capaz de inibir a atividade proteásica da enzima. Esses resultados foram atribuídos à ocupação dos domínios “kringle” da molécula de plasmina, que possuem afinidade tanto para os receptores celulares como para o principal inibidor fisiológico da plasmina (Lottenberg, Minning-Wenz e Boyle, 1994; Coleman *et al.*, 1995).

Nas interações com o sistema fibrinolítico mediadas por estreptoquinase e estafiloquinase, a plasmina ativa pode ser capturada por receptores bacterianos com afinidade por essa molécula (Wang e Lottenberg, 1994; Santala *et al.*, 1999).

Ao contrário dos ativadores endógenos do plasminogênio, a estreptoquinase não possui ação enzimática sobre o zimogênio e a ativação é decorrente da formação de um complexo equimolar entre as duas moléculas. A interação entre domínios da estreptoquinase e do plasminogênio induz rearranjos intramoleculares no plasminogênio com geração do sítio ativo da serino-protease. Sendo assim, a estreptoquinase não é inibida pela ação dos inibidores da ativação de plasminogênio (PAI-1 e PAI-2) e também é capaz de disparar a ativação de plasminogênio generalizada e não regulada em fase fluida. Além disso, sua ação não é dependente da fixação do plasminogênio à fibrina ou a receptores celulares (Reed *et al.*, 1999).

Após a ativação do plasminogênio pela estreptoquinase e/ou por ativadores do hospedeiro, a plasmina pode ser capturada pelos receptores de superfície bacterianos análogos à GAPDH que possuem resíduos carboxi – terminais de lisina expostos em sua superfície. Também nesse caso, a plasmina ligada está protegida da ação de α_2 -antiplasmina e α_2 -macroglobulina (Broder *et al.*, 1991; Lottenberg *et al.*, 1992; Lottenberg, Mining-Wenz e Boyle, 1994). Portanto, a secreção de estreptoquinase *in vivo* pode gerar grande quantidade de plasmina que se imobiliza na superfície dos micro-organismos, conferindo-lhes atividade proteolítica.

Um outro importante ativador bacteriano de plasminogênio é produzido por *Y. pestis*. Trata-se da protease Pla, uma adesina para componentes da membrana basal e matriz extracelular de mamíferos ancorada à membrana externa bacteriana e codificada por genes plasmidiais. Essa adesina exibe alto grau de homologia para Omp T de *E. coli* (Kutyrev *et al.*, 1999). Em 1998, Lähteenmäki e colaboradores observaram que embora a produção de Pla aumente a adesão de *Y. pestis* à laminina da matriz extracelular, a adição e ativação de plasminogênio foi necessária para que ocorresse a degradação da matriz. Esta observação levou à sugestão de que a plasmina ativada por Pla favoreceria a migração desses micro-organismos através das barreiras teciduais do hospedeiro .

Interações de *P. aeruginosa* com plasminogênio

P. aeruginosa possui um amplo espectro de adesinas para glico-conjugados de mamíferos, algumas delas evolutivamente conservadas e compartilhadas com outros micro-organismos. Entre as adesinas descritas destacam-se as fímbrias (Doig *et al.*, 1988), flagelos (Arora *et al.*,

1996; Arora *et al.*, 2000) e proteínas de membrana externa (Carnoy *et al.*, 1994; Plotkowski, Tournier e Puchelle, 1996).

As pili do tipo IV, presentes nas cepas de *P. aeruginosa* com fenótipo aderente, possuem afinidade para receptores contendo resíduos de asialo GM1 do epitélio respiratório (Saiman e Prince, 1993; Bryan *et al.*, 1999; Comolli *et al.*, 1999). A flagelina dos tipos a e b de *P. aeruginosa*, que são altamente conservadas (Arora *et al.*, 2000), também tem afinidade por resíduos de asialo GM1, entre outros receptores (Feldman *et al.*, 1998). Quanto às proteínas de membrana externa, apresentam afinidade pela mucina respiratória (Carnoy *et al.*, 1994), por componentes da matriz extracelular (Plotkowski, Tournier e Puchelle, 1996; Roger *et al.*, 1999; Rebière-Hüet *et al.*, 1999) e por moléculas receptoras de células epiteliais respiratórias (Roger *et al.*, 1999; Plotkowski *et al.*, 2001). Ao menos em tese, existe a possibilidade de que algumas das adesinas de *P. aeruginosa* possam funcionar como receptores para plasminogênio.

Em estudo realizado por Ullberg *et al.* (1990) foi observado que sete de dez cepas de *P. aeruginosa* testadas foram capazes de ligar plasminogênio. Esse estudo revelou a existência de cerca de 8 000 sítios de ligação por bactéria, com constante de dissociação da ordem de 60 a 80 nM. Mais ainda, a afinidade desses receptores para o plasminogênio foi superior à afinidade de receptores de células eucarióticas, como já fora também observado para estreptococos. Entretanto, a natureza dos receptores e ativadores de plasminogênio envolvidos não foi caracterizada. Também não foi definida a possível participação dessa capacidade de ligação do plasminogênio com a invasividade bacteriana.

É possível que a mobilização precoce de sistemas proteolíticos pré-formados no hospedeiro, a competição por receptores para ativadores de plasminogênio das células de defesa e o escape aos mecanismos de controle fisiológicos da fibrinólise possam interferir no curso das infecções causadas por *P. aeruginosa* agregando mecanismos de virulência e abreviando o tempo necessário para a invasão de tecidos e fluidos corporais. Assim, estudos correlacionando o fenótipo de cepas com a possibilidade de utilização desses mecanismos, bem como a caracterização dos possíveis receptores e ativadores envolvidos no processo, podem fornecer auxílio para a compreensão da patogênese e para o controle das infecções causadas por *P. aeruginosa*.

1 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos :

Pesquisar a afinidade por plasminogênio nas cepas de *P. aeruginosa* colonizadoras do trato intestinal e isoladas de infecções sistêmicas.

Pesquisar a possível participação de fímbrias e proteínas de membrana externa na afinidade de *P. aeruginosa* por plasminogênio.

Pesquisar a ativação de plasminogênio por ativadores do sistema fibrinolítico humano, gerando plasmina ativa, nas diferentes cepas de *P. aeruginosa*.

Identificar e caracterizar a natureza de eventuais ativadores endógenos de plasminogênio presentes nas cepas de *P. aeruginosa* estudadas.

Pesquisar a participação da plasmina ativa ligada aos micro-organismos em sua invasividade.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2. 1. Cepas bacterianas

Foram utilizadas nesse estudo, as cepas laboratoriais de referência PAK (cepa piliada) e PAK/p- (cepa não piliada, obtida pela deleção do gene *pil* que controla a síntese da pilina), fornecidas pelo Dr. Paranchych (Universidade de Alberta, Canadá). Foram também utilizados isolados clínicos de sangue e de fezes de pacientes assintomáticos, fornecidos pela Dra. Elizabeth de Andrade Marques (Laboratório de Bacteriologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto da UERJ).

Tabela 1 : Cepas testadas neste estudo.

FEZES		SANGUE		CEDIDAS
Número no trabalho	Número no LABAC	Número no trabalho	Número no LABAC	Cepas de referência
F1	F 2926	S1	S 269	PAK (piliada)
F2	F 3040	S2	S 272	PAK/ p- (não piliada)
F3	F 6320	S3	S 305	
F4	F 5788	S4	S 373	
F5	F 2728	S5	S 856	
F6	F 6176	S6	S 641	
F7	F 2075	S7	S 194	
F8	F 2601	S8	S 200	
F9	F 9295	S9	S 225	
F10	F 9799	S10	S 226	
F11	F 1939	S11	S 214	
F12	F 776	S12	S 285	

Os estoques das cepas foram conservados a partir do crescimento por 24 horas a cerca de 37° C em agar CLED (Merck), de onde foram preparadas suspensões bacterianas concentradas de cada cepa, em trypticase soy broth (TSB; Difco Laboratories) contendo 20% de glicerol e mantidas em freezer , a 70° C negativos.

Para a realização dos testes, as bactérias foram cultivadas por uma noite em TSB e submetidas à centrifugação em centrífuga clínica (IEKE) a 3900 r.p.m. por 10 minutos. Os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos ressuspensos em diferentes soluções, conforme o teste a ser executado. As densidades ópticas das suspensões bacterianas foram

padronizadas em espectrofotômetro (Micronal) de forma a apresentarem $A_{660\text{ nm}} = 0,1$, contendo cerca de 10^8 UFC/ mL.

2. 2. Captura do plasminogênio

2. 2. 1. Aderência das bactérias a poços de microplacas de ELISA

Inicialmente, 100 μ L das suspensões bacterianas padronizadas em tampão carbonato (0,1M; pH 9,6) foram adicionados a poços de microplacas de poliestireno (Poly-Sorp, Nunc), seguindo-se a incubação durante uma noite a cerca de 4 °C. A seguir, os poços foram rinçados três vezes com 200 μ L de salina tampão fosfato 0,01 M, pH 7,2 (PBS) contendo 0,05 % (vol/vol) de Tween 20 (Sigma) (PBS-T), para remoção dos micro-organismos não aderidos. Os poços contendo os micro-organismos aderidos foram então tratados por 2 horas em temperatura ambiente com 100 μ L de tampão carbonato contendo 2% (p/v) de soroalbumina bovina (BSA; Sigma A 7030). Após o bloqueio, os poços foram submetidos a mais três lavagens com 200 μ L de PBS-T .

Para sabermos se as cepas PAK e PAK/p- apresentavam igual capacidade de aderência aos poços das microplacas, e se a presença de fímbrias seria capaz de interferir nesse processo, 100 μ L de cada uma das suspensões bacterianas em tampão carbonato estéril foram adicionados aos poços de microplacas. Após incubação por uma noite a cerca de 4 °C, os poços foram lavados por 3 vezes com 200 μ L de PBS-T estéril para remoção das bactérias não aderidas. A seguir, os poços foram tratados por 10 minutos a temperatura ambiente com 100 μ L de Triton X-100 a 0,1 % em PBS estéril, para remover as bactérias aderidas. O conteúdo de cada poço foi homogeneizado, diluído e plaqueado em quadruplicata em agar CLED, para determinação da concentração de bactérias aderidas.

2. 2. 2. Teste de ELISA

A ligação do plasminogênio na superfície das diversas cepas de *P. aeruginosa* foi avaliada por uma variação da técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA) em fase sólida proposta por Plotkowski, Tournier e Puchelle (1996).

Aos poços de microplacas contendo as diferentes cepas bacterianas aderidas e saturados com BSA foram aplicados 100 µL de solução contendo plasminogênio humano purificado (Sigma) a 25 µg/ mL em PBS-T contendo de 1% (p/v) de BSA (PBS-T-BSA). Após incubação por 1 hora a cerca de 37 °C, os poços foram rinçados três vezes consecutivas com 200 µL de PBS-T. Seguiu-se a incubação com 100µL de solução de anticorpos policlonais de coelho anti-plasminogênio humano (Calbiochem) diluída a 1:2500 em PBS-T-BSA, a cerca de 37 °C, por 1 hora. Após mais três lavagens com 200 µL de PBS-T, os poços foram incubados por 1 hora a cerca de 37 °C com 100 µL de solução de anticorpos secundários anti-IgG de coelho conjugados à peroxidase (Sigma) e diluídos a 1: 5 000 em PBS-T-BSA. Após 3 lavagens com 200 µL de tampão PBS-T, a atividade da peroxidase foi detectada pela incubação, com 100 µL do substrato cromogênico *O*-fenileno diamina-2 HCl (OPD; Abbott), por até 10 minutos em temperatura ambiente e em ausência de iluminação. Após a interrupção da reação com 100 µL ácido sulfúrico 1 N, foi determinada A_{490 nm} dos diversos poços em espectrofotômetro tipo leitor de ELISA (BioRad). A reprodutibilidade dos resultados foi avaliada pela execução dos testes em triplicata, em pelo menos duas ocasiões diferentes.

Como controles negativos foram usados poços onde : i) a etapa de incubação com o plasminogênio foi suprimida após a incubação das células bacterianas aderidas com 100 µL de tampão carbonato contendo 2% de BSA; ii) a etapa de incubação com a solução de anticorpos anti-plasminogênio humano foi substituída pela incubação com 100 µL de PBS-T-BSA 1% ; iii) a etapa inicial de incubação com as suspensões bacterianas foi suprimida. Como controle positivo, em substituição ao inóculo bacteriano, alguns poços das microplacas foram incubados com solução de plasminogênio a 25 µg/ mL em tampão carbonato por uma noite a cerca de 4 °C .

2. 2. 3. Teste de inibição da captura de plasminogênio

Com o interesse em identificar os domínios envolvidos nas possíveis interações da superfície bacteriana com o plasminogênio, foram realizados com as cepas de referência PAK e PAK/ p-, testes de ELISA, como descrito acima, com a seguinte modificação : aos poços das microplacas de ELISA contendo células bacterianas aderidas foram adicionados 100 µL da solução de plasminogênio contendo um análogo da L-lisina , o ácido ε amino caprónico (Sigma) em concentrações crescentes (0,01; 0,1 e 1 M). Seguiram-se as incubações com os anticorpos primários e secundários e a revelação da reação com solução de OPD, como descritas no item 2. 2. 2. Esse teste foi realizado em triplicata, em uma única ocasião.

2.3 Ligação de plasminogênio a proteínas de membrana externa de *P. aeruginosa*

A captura de plasminogênio pelas diferentes proteínas de membrana externa bacteriana, separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) conforme seu peso molecular, foi avaliada por metodologia de “Western – blotting” .

2. 3. 1. Obtenção dos extratos de proteínas de membrana externa

Para a preparação dos extratos de parede bacteriana, contendo as proteínas de membrana externa, foi utilizada a metodologia proposta por Carnoy *et al.*, (1994). Após o cultivo das diversas amostras bacterianas em 250 mL de TSB a cerca de 37 °C, por uma noite, as culturas foram centrifugadas a 10 000 r.p.m. por 10 minutos a 4 °C, em centrífuga refrigerada (Hitachi CR 21). Após duas lavagens com PBS, cada 1 g dos sedimentos foram tratados com 3 mL de solução extratora contendo 50 mM de citrato de sódio (pH7,4), 0,1% (p/v) de Zwittergent 3-14 (Calbiochem), 1 mM de fenil metil sulfonil fluoreto (Sigma) e 10 mM de EDTA (Sigma). Após incubação durante 25 minutos a 45 °C, seguiu-se nova centrifugação a 10 000 r.p.m. por 30 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes, contendo as proteínas de membrana externa, foram recolhidos e submetidos à diálise contra água destilada contendo 0,2% (p / v) de azida sódica

por uma noite a cerca de 4 °C. Finalmente, as proteínas foram liofilizadas e solubilizadas em água destilada estéril, de modo a se obter uma concentração padronizada de 10 mg / mL para cada cepa.

2. 3. 2. SDS PAGE das proteínas de membrana externa

Inicialmente, 100 µL dos extratos proteicos de cada amostra bacteriana foram diluídos em 300 µL do tampão de amostra contendo 4 mL de água destilada, 1 mL de Tris-HCl a 0,5 M (pH 6.8), 0,8 mL de glicerol, 1,6 mL de solução de SDS a 10% (p/v), 5% de 2 - β mercaptoetanol e 0,2 mL de azul de bromofenol a 0,25% (p/v). Após fervura por 5 minutos, 15 µL de cada preparação (contendo cerca de 37,5 µg de proteínas) foram aplicados a pistas do gel de poliacrilamida a 15%. Seguiu-se a eletroforese a 200 V por 45 minutos em sistema Míni Protean II (BioRad), usando tampão de corrida Tris a 0,3 % (p/v) contendo glicina a 0,144 % (p/v) , pH 8.3 e SDS a 0,1 % (p/v). Como padrão de referência para a determinação dos pesos moleculares das proteínas bacterianas foi utilizado o kit de calibração de baixo peso molecular da Gibco BRL.

Após a eletroforese, os géis foram submetidos à eletrotransferência para membranas de nitrocelulose (Immoblon-NC; Millipore), utilizando-se o sistema Mini Protean II por 1 hora, sob corrente que variou de 250 a 340 mA .

As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas eletrotransferidas foram bloqueadas por uma noite a cerca de 4 °C em tampão PBS contendo 0,05% (v/v) de Tween 20 e 2% (p/v) de BSA (PBS-T-BSA 2%).

2. 3. 3. Western-blotting das proteínas de membrana externa

As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas de membrana externa bacteriana foram incubadas com solução de plasminogênio marcado com biotina a 2,5 µg/mL em PBS-T-BSA 1% por 1 hora em temperatura ambiente, sob agitação.

Após três lavagens com PBS-T sob agitação (a primeira por 10 minutos e as demais por 5 minutos), as membranas foram incubadas com PBS-T-BSA 1%, por cinco minutos, sob agitação e em temperatura ambiente. A seguir, as membranas foram expostas à solução do

conjugado estreptavidina - peroxidase (Amersham) a 1: 2 500 em PBS-T-BSA 1%, por 1 hora, a temperatura ambiente e sob agitação. Após mais três rinçagens com PBS-T, como descrito acima, as membranas foram incubadas com uma solução contendo 0,1% de imidazol (Sigma), 0,1 % de diaminobenzidina (Sigma) e 0,1 % de peróxido de hidrogênio, para a revelação das possíveis bandas reativas.

Como controle negativo, a etapa de incubação das membranas contendo as proteínas de membrana externa com a solução do complexo plasminogênio-biotina em PBS-T-BSA 1% foi substituída pela incubação com a solução diluente.

A reprodutibilidade dos resultados foi avaliada pela execução dos testes em duas ocasiões distintas.

O conjugado plasminogênio-biotina foi preparado conforme metodologia proposta por Ternynck e Avrameas (1991). A alíquotas de 1 mL de solução de plasminogênio humano a 1 mg/ mL em bicarbonato de sódio a 0,1 M foram acrescidos 10 µL de solução de hidroxissuccinimida de biotina (Sigma) a 0,1 M em dimetil sulfóxido (DMSO; Sigma). Após incubação por 1 hora em temperatura ambiente, a solução foi dializada contra PBS 0, 01 M, durante 1 noite, a cerca de 4 °C, com agitação contínua, para eliminação da biotina não conjugada.

2. 4. Ativação do plasminogênio

2.4.1. Testes colorimétricos para detecção da ativação do plasminogênio

A ativação do plasminogênio ligado às células bacterianas aderidas a poços de microplacas de ELISA foi avaliada por ensaio colorimétrico em que foi detectada a clivagem do substrato cromogênico da plasmina, tosil-glicil-prolil-lisina 4-acetato de nitroanilida (Chromozym PL; Roche), segundo uma adaptação da metodologia descrita por Klempner *et al.* (1995).

A adsorção das células bacterianas aos poços das microplacas de ELISA e a saturação dos poços com BSA foram realizados como descrito no item 2. 2. 1. A dois conjuntos de três poços contendo cada uma das cepas bacterianas em estudo foram adicionados 100 µL de solução de plasminogênio humano purificado a 25 µg / mL em PBS-T-BSA. Após 1 hora a cerca de 37 °C, seguiram-se três lavagens com 200 µL de PBS-T e adição de 100 µL do ativador uroquinase

(Sigma) na concentração de 10 µg/mL, aos poços de apenas um dos conjuntos de cada cepa bacteriana. Aos poços do outro conjunto de cada cepa foram adicionados apenas 100 µL de PBS. Após incubação por 1 hora a cerca de 37 °C, os poços foram rinçados três vezes com 200 µL de PBS-T e tratados com 100 µL do substrato da plasmina Chromozyn PL a 500 µM, preparado segundo instruções do fabricante. Após incubação por 24 horas a 37 °C, seguiu-se a determinação da $A_{405\text{ nm}}$ dos diferentes poços, em espectrofotômetro tipo leitor de ELISA.

Como controle negativo, poços sem bactérias aderidas, saturados com tampão carbonato contendo 2% de BSA, foram incubados com plasminogênio, uroquinase e com o substrato da plasmina. Foram realizados também controles onde poços com cepas aderidas foram saturados com tampão carbonato-BSA 2%, rinçados e incubados apenas com o substrato cromogênico.

Como controle positivo, poços revestidos na véspera dos testes com 100 µL de solução de plasminogênio a 25 µg/ mL, em tampão carbonato, foram incubados com a solução de uroquinase e expostos ao substrato cromogênico.

Para o preparo da solução do substrato na concentração utilizada no teste, 1 parte do substrato a 5 mM em 100 mM de glicina em água destilada contendo 20% de Tween 20, foi acrescida de 8 partes de tampão Tris a 50 mM, preparado conforme especificações do fabricante, e de 1 parte de solução salina a 0.9 %.

A reprodutibilidade dos resultados foi avaliada pela execução dos testes em duplicata, em três ocasiões diferentes.

2. 4. 2. Efeitos do EDTA na ativação do plasminogênio por *P. aeruginosa*

Para caracterizar a natureza de ativadores endógenos de plasminogênio presentes em *P. aeruginosa* (se serino ou metaloproteases), foram realizados testes em que EDTA, na concentração final de 10 mM, foi adicionado às soluções de plasminogênio utilizadas para o tratamento das células bacterianas aderidas aos poços das microplacas e de uroquinase. Seguiu-se a realização dos testes, como descrito. A reprodutibilidade do teste foi avaliada pela execução em triplicata e em três ocasiões diferentes.

2.5 Influência da captura e ativação de plasminogênio por cepas de *P. aeruginosa* na degradação e invasividade de gel de fibrina

A capacidade proteolítica de bactérias contendo plasmina em sua superfície, e o potencial de invasividade a ela relacionado, foram estudados utilizando-se a cepa de referência piliada PAK após tratamento com plasminogênio e ativador estreptoquinase, em modelos que tentaram reproduzir, *in vitro*, condições semelhantes às encontradas por um micro-organismo frente às barreiras fisiológicas do hospedeiro, tais como a presença de coágulos de fibrina

2. 5. 1. Preparação de géis de fibrina em insertos MilliCell – PCF

Um dia antes da realização dos testes, 300 μ L de solução de fibrinogênio (Sigma) a 3 mg/mL em água destilada foram adicionados a insertos para cultura de células MilliCell- PCF (Millipore; diâmetro de 12 mm; poro de 3 μ m) e tratados com solução de trombina (Sigma) na concentração final de 10 U/ mL. Seguiu-se incubação a cerca de 37⁰ C por 24 horas, até ocorrer a completa formação do gel de fibrina.

2. 5. 2. Preparação das suspensões bacterianas

A partir do sedimento obtido após o crescimento da cepa de referência PAK por 24 horas foram preparadas suspensões bacterianas em PBS, com $A_{660\text{ nm}} = 0,4$, contendo glicose a 2% (p/v) (PBS-G). A alíquotas de 1 mL dessas suspensões foram adicionados 50 μ L de solução de plasminogênio humano a 100 μ g / mL, em PBS-G. Como controle negativo, a outras alíquotas de 1 mL das mesmas suspensões, foram adicionados apenas 50 μ L de PBS-G. Após 1 hora de incubação a 37 °C, as suspensões foram centrifugadas durante 5 minutos em centrífuga Eppendorf a 14000 r.p.m., seus sobrenadantes foram removidos e os micro-organismos tratados com plasminogênio foram ressuspensos em 100 μ L de solução de estreptoquinase (Sigma) a 100 U/ mL em PBS-G. As células bacterianas controle foram ressuspensas em 100 μ L de PBS-G. Após 1 hora de incubação a 37 °C os 2 tipos de suspensões bacterianas foram centrifugados

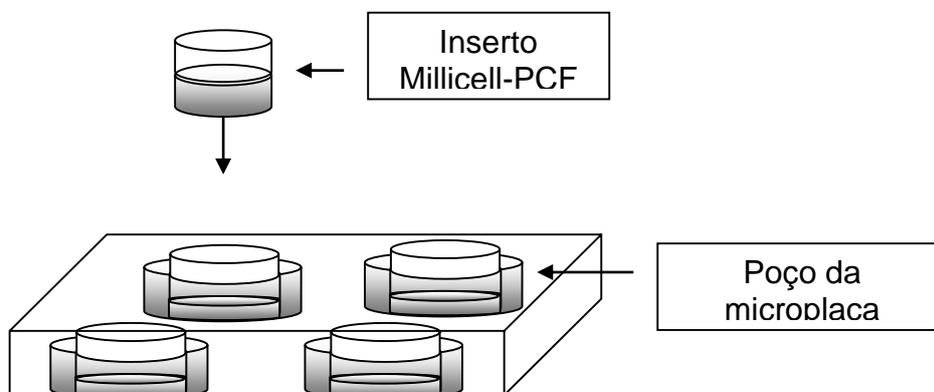
por 5 minutos a 14 000 r.p.m., os sobrenadantes foram removidos e aos sedimentos foram adicionados 200 μ L de PBS-G. Após nova centrifugação e remoção dos sobrenadantes os sedimentos obtidos foram ressuspensos em 500 μ L de PBS-G contendo EDTA a 10 mM (PBS-G-EDTA). Alíquotas de 20 μ L das suspensões bacterianas foram submetidas a diluições seriadas e plaqueamento em CLED, para determinação da concentração de micro-organismos viáveis.

Para confirmar a presença de plasmina na superfície das células bacterianas, alíquotas de 10 μ L da suspensão de bactérias tratadas com plasminogênio e estreptoquinase, e alíquotas da suspensão controle contendo bactérias não tratadas, foram depositadas na superfície de lâminas de vidro. Após a secagem, as preparações foram fixadas com metanol em temperatura ambiente por 10 minutos e tratadas com PBS contendo 1% de BSA (PBS-BSA 1%) por 5 minutos. A seguir, as lâminas foram incubadas durante 1 hora em temperatura ambiente com solução de anticorpos de coelho anti-plasminogênio humano, diluídos a 1: 2500 em PBS-BSA 1%. Os anticorpos não fixados foram removidos mediante três lavagens. Seguiu-se uma nova incubação com PBS- BSA 1% por 10 minutos e incubação com anticorpos anti-IgG de coelho conjugados a peroxidase (Sigma) diluídos a 1:5000 em PBS- BSA 1% por 1 hora em temperatura ambiente. Após mais três lavagens, as lâminas foram tratadas com solução reveladora contendo diaminobenzidina a 0,1%, imidazol a 0,1 % e peróxido de hidrogênio a 0,1% em água destilada, por cerca de 10 minutos. Após rinçagem com água destilada, as lâminas foram secas e observadas em microscópio óptico (Axioplan II; Zeiss) , com objetiva de aumento 100x.

2. 5. 3. Teste quantitativo de invasão dos géis de fibrina

Para realização do teste, os insertos recobertos com os géis de fibrina, preparados como descrito no item 2.5.1, foram colocados em poços de microplacas de 4 poços (Figura 5).

Figura 5. Esquema de insertos Millicell-PCF introduzidos em poços de microplaca para cultura de células de 4 poços.



A conjuntos de 2 insertos foram aplicados 100 μL das suspensões de células bacterianas revestidas com plasmina, preparadas como descrito no item 2. 5. 2, enquanto a outros 2 insertos foram adicionados 100 μL das suspensões controle. Seguiu-se a adição de 500 μL de PBS-G aos poços das microplacas contendo os insertos. Após incubação em estufa comum a cerca de 37 $^{\circ}\text{C}$ por 3, 4 e 5 horas, foram recolhidas, de cada poço contendo os insertos, alíquotas de 10 μL para plaqueamento direto em quadruplicata em CLED e alíquotas de 20 μL que, após diluições sucessivas, foram também plaqueadas em quadruplicata em CLED. Os testes foram executados em duplicata em 3 ocasiões distintas.

Após o término dos experimentos, os géis contidos nos insertos foram fixados com glutaraldeído a 2,5% (v/v) em tampão fosfato 0,1M, pH 7, 4 para processamento e observação microscópica.

2. 5. 4. Preparação de géis de fibrina em tubos

Em paralelo aos testes quantitativos de invasividade, foram também realizados testes de invasão em tubo. Na véspera da execução dos testes, a tubos de Durhan foram adicionados 400 μL de solução de fibrinogênio a 3 mg/ mL em água destilada, contendo 1% (v/v) de solução de cloreto de trifetil tetrazólio a 1% (TTC; Riedel de Haen AG-Seelze). A seguir, foram acrescentadas 10 U/mL de trombina. Os tubos com os géis foram mantidos em estufa a 37 $^{\circ}\text{C}$ por cerca de 24

horas, até a completa polimerização da fibrina. A redução do TTC acrescido ao gel pelos microorganismos, e o resultante aparecimento de coloração rosa, foi um recurso utilizado para favorecer a visualização da invasividade bacteriana.

2. 5. 5. Testes de invasão dos géis de fibrina em tubos

Suspensões da cepa PAK de *P. aeruginosa* foram tratadas com plasminogênio e estreptoquinase ou com PBS-G, como descrito no item 2. 5. 3. Seguiu-se centrifugação a 14 000 rpm por 5 minutos. Após a remoção dos sobrenadantes, 2 µL dos sedimentos foram inoculados, com micropipeta introduzindo-se levemente a extremidade das ponteiros até cerca de 2 mm da superfície dos géis. Os tubos foram mantidos a cerca de 37 °C e observados após diferentes períodos de incubação. Esse teste foi realizado em duplicata em apenas uma ocasião.

2.6. Efeito da captura do plasminogênio na invasão de culturas de células

2.6. 1. Cultura de células ECV- 304

A linhagem de células endoteliais ECV 304, espontaneamente imortalizadas (Takahashi, Sawasaki e Hata, 1990), foi gentilmente cedida pela Dra. Verônica Morandi, do Departamento de Biologia Molecular e Genética da UERJ, Rio de Janeiro. Inicialmente, as células foram cultivadas em garrafas de 25 cm² a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO₂, em meio F12 suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Gibco- BRL), gentamicina a 50 µg/mL (Central de Medicamentos; CEME) e anfotericina B a 2,5 µg/ mL (CEME) (meio suplementado), até a formação de um tapete confluyente, identificado pela observação das culturas em microscópio óptico invertido. Seguiu-se a lavagem com PBS-G, tripsinização com 5 mL de solução contendo tripsina a 0,1 % e EDTA a 0,01% e preparo de uma suspensão, em meio suplementado, contendo 4,4 x 10⁵ células/mL. Alíquotas de 200 µL da suspensão foram adicionadas a insertos

Transwell (Costar; poros com diâmetro de 3 μm) colocados em poços de microplaca de 24 poços, contendo 600 μL de meio suplementado. Foram realizadas trocas do meio de cultura a cada 48 horas de incubação, a 37 °C, em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 , até a total confluência das monocamadas celulares. Nessa etapa, o meio de cultura foi removido e os tapetes foram rinçados com PBS-G para que recebessem os inóculos bacterianos. A integridade das monocamadas foi avaliada por observação em microscópio óptico invertido.

2.6. 2. Teste quantitativo de invasão das monocamadas de células ECV 304 por *P. aeruginosa* revestidas com plasmina

Inóculos da cepa PAK de *P. aeruginosa* foram tratados com plasminogênio e estreptoquinase, como descrito no item 2. 5. 2, ou não tratadas (controle). Seguiu-se a preparação de suspensões em meio F12 contendo 10% de soro fetal bovino. Alíquotas de 100 μL de cada uma das suspensões foram adicionadas a conjuntos de 2 insertos contendo culturas confluentes de células ECV. Células controle não infectadas foram incubadas com 100 μL de meio de cultura F12 com 10% de soro fetal bovino. Aos poços das microplacas que continham os insertos, foram adicionados 600 μL de meio F12 contendo 10% de soro fetal bovino. Após períodos de 3, 4 e 5 horas de incubação em estufa CO_2 a 37⁰ C, foram recolhidas, de cada compartimento inferior dos sistemas, alíquotas de 10 μL para plaqueamento em quadruplicata em meio CLED e alíquotas de 20 μL , que após diluições sucessivas, foram também plaqueadas em quadruplicata em CLED. Esse teste foi realizado em duplicata em apenas uma ocasião.

Ao término do experimento, o meio de cultura e o crescimento bacteriano foram removidos. As células ECV contidas nos insertos foram fixadas com glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1M para processamento e observação microscópica.

2. 7. Microscopia óptica dos géis de fibrina e de monocamadas de células infectadas por *P. aeruginosa* tratadas ou não com plasminogênio

Após a fixação com glutaraldeído a 2,5 % , os géis de fibrina ou as culturas de células ECV foram rinçados com PBS e posteriormente com água destilada, pós-fixados com solução de Os O₄ a 1 % em água destilada , rinçadas, desidratadas em concentrações crescentes de etanol e incluídos em resina do tipo Epon (Electron Microscopy Science). Após a completa polimerização da resina, foram feitos cortes semifinos das preparações em ultramicrotomo (Reichert S), com espessura de 1 µm. Os cortes semifinos foram corados com azul de toluidina a 1% e observados ao microscópio óptico.

2. 8. Análise estatística

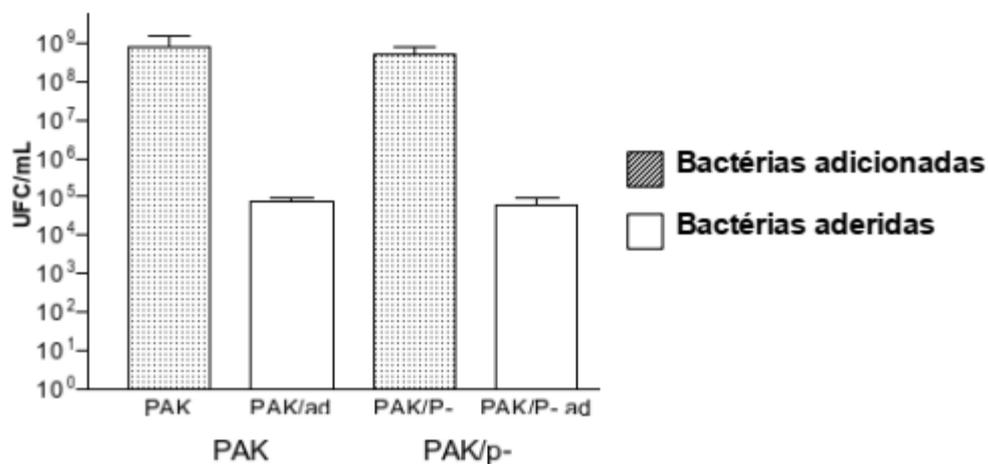
Foi realizada pelo emprego de diferentes testes estatísticos (t de Student, t de Mann Whitney U, análise de variância de Bonferroni e Dunnett), utilizando-se o aplicativo Prism2.exe, versão Junho de 1996. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

3. 1. Aderência de *P. aeruginosa* aos poços das microplacas de ELISA

Todas as cepas estudadas aderiram aos poços das microplacas utilizadas. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre o número de células bacterianas das cepas de referência PAK e PAK/p- recuperadas dos poços das microplacas ($p > 0,05$ pelo teste t de Mann Whitney U), o que mostra que a presença de fímbrias não influenciou na aderência ao poliestireno. A figura 6 abaixo mostra o potencial de aderência das cepas PAK e PAK/p- .

Figura 6. Aderência das células bacterianas das cepas PAK e PAK/p- a poços de microplaca de ELISA

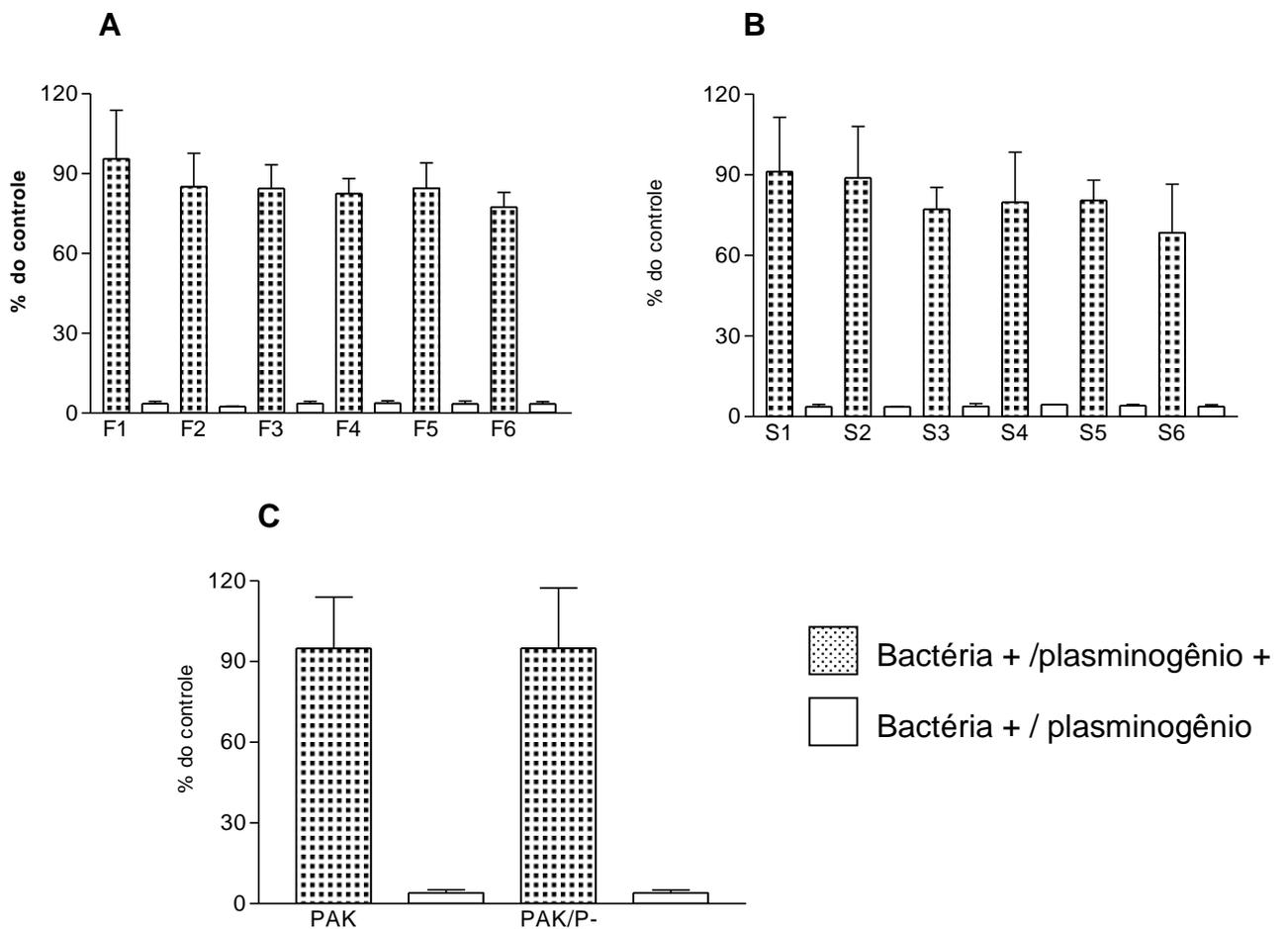


Legenda : Aderência de células bacterianas das cepas PAK e PAK/p- a poços de microplaca de ELISA. Os dados representam as médias das UFCs presentes nas suspensões adicionadas aos poços (bactérias adicionadas) e das UFCs recuperadas após o tratamento dos poços com detergente (bactérias aderidas) \pm os erros padrões das médias obtidas em três ensaios realizados em triplicata.

3. 2. Captura de plasminogênio por cepas de *P. aeruginosa*

Todas as cepas estudadas capturaram o plasminogênio. Na figura 7 são apresentados os percentuais médios da $A_{490\text{ nm}}$ dos poços revestidos com as diferentes cepas bacterianas, considerando a $A_{490\text{ nm}}$ dos poços revestidos com o plasminogênio como 100%.

Figura 7. Captura de plasminogênio por cepas clínicas isoladas de fezes, de sangue e pelas cepas laboratoriais PAK fimbriada e PAK/ p- não fimbriada



Legenda: Captura de plasminogênio por cepas clínicas isoladas de fezes (A) e de sangue (B) e pelas cepas laboratoriais PAK fimbriada e PAK/ p- não fimbriada (C). Os dados representam as médias \pm os erros padrões dos percentuais médios da $A_{490\text{ nm}}$ dos poços revestidos com as cepas bacterianas, considerando a $A_{490\text{ nm}}$ dos poços revestidos com o plasminogênio como 100%. Dados obtidos em 2 ensaios realizados em triplicata

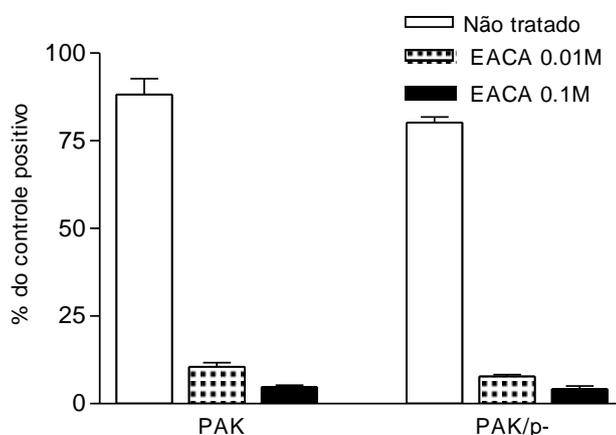
Os poços teste contendo suspensões bacterianas aderidas deram origem a valores médios de absorvância significativamente superiores ($p < 0,001$ pelo teste t de Mann Whitney U) aos valores obtidos nos controles negativos (poços em que as bactérias aderidas não foram tratados com plasminogênio ou ainda poços que não continham bactérias mas que foram tratados com plasminogênio). Ao contrário de nossa expectativa, a captura de plasminogênio pelas cepas isoladas de fezes foi semelhante à das cepas de sangue.

A observação da figura 7 C mostra que a aderência do plasminogênio à cepa fimbriada PAK foi semelhante à da cepa mutante isogênica não fimbriada PAK/p-. Esse resultado sugere que em *P. aeruginosa* as fímbrias não são estruturas responsáveis pela captura de plasminogênio.

3. 3. Inibição da captura de plasminogênio

A incubação das cepas PAK e PAK/p- com soluções de plasminogênio contendo concentrações crescentes do ácido ϵ aminocapróico (EACA) inibiu significativamente ($p < 0,001$ pelo teste de comparação múltipla de Dunnett) a captura de plasminogênio, sugerindo a participação dos domínios “kringle” ligadores de lisina nas interações entre o plasminogênio e a superfície bacteriana (Figura 8). Novamente, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre o comportamento da cepa fimbriada PAK e de sua mutante não fimbriada PAK/p-

Figura 8. Inibição da captura de plasminogênio pelas cepas PAK e PAK/p- por diferentes concentrações do ácido amino capróico (EACA)..

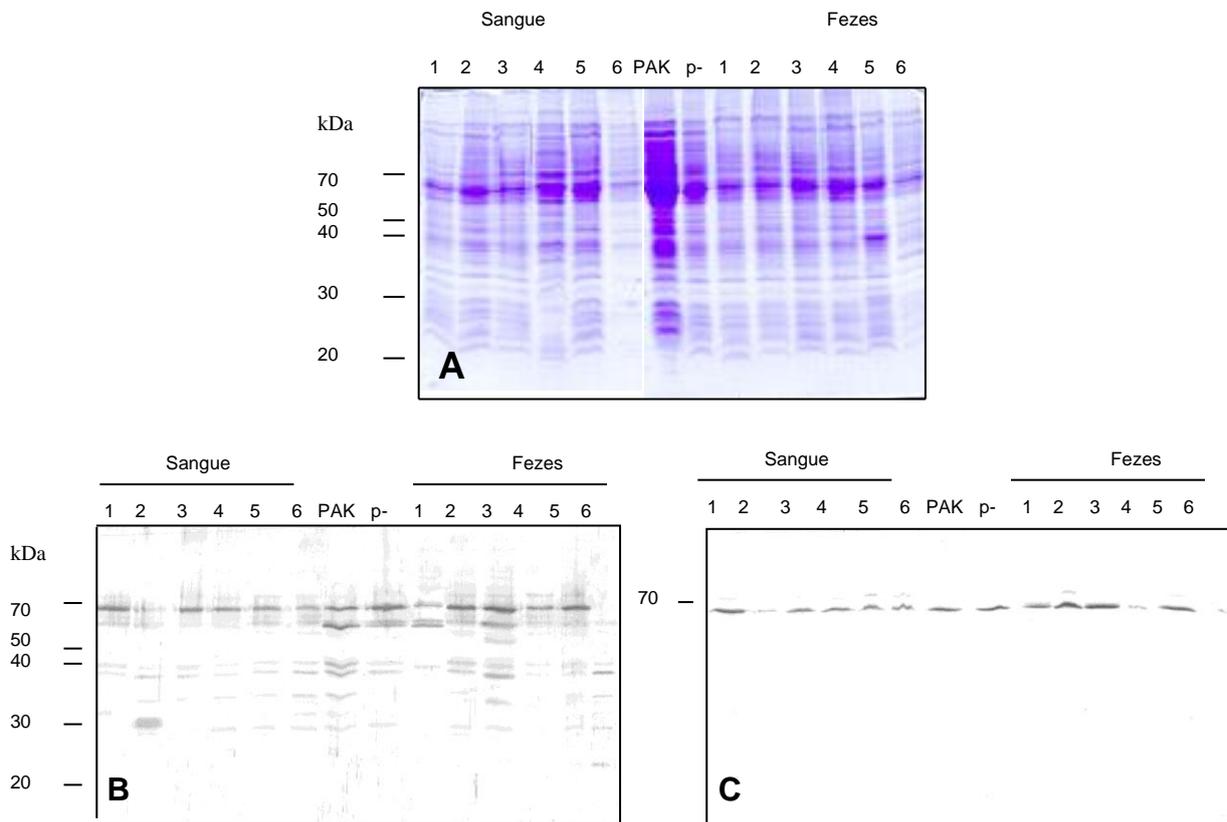


Legenda: Inibição da captura de plasminogênio pelas cepas PAK e PAK/p- por diferentes concentrações do ácido amino capróico (EACA). Os dados representam as médias \pm os desvios padrões dos resultados obtidos em um ensaio realizado em triplicata.

3.4. Captura do plasminogênio por proteínas de membrana externa

Uma vez que a presença de fímbrias não foi um fator determinante da capacidade de *P. aeruginosa* de capturar o plasminogênio, foi pesquisada a participação de proteínas da membrana externa bacteriana pela técnica de “Western blotting”. Como pode ser observado na figura 9, várias bandas proteicas de baixo peso molecular (entre 40 e 30 kDa) e outras de cerca de 70 kDa, identificadas em todas as cepas bacterianas, foram capazes de ligar plasminogênio. Algumas cepas apresentaram, também, proteínas reativas de cerca de 60kDa.

Figura 9. Perfil de proteínas de membrana externa das diferentes cepas de *P. aeruginosa* corado pelo Comassie Blue e reatividade das proteínas de membrana externa, adsorvidas em membrana de nitrocelulose com o plasminogênio marcado com biotina



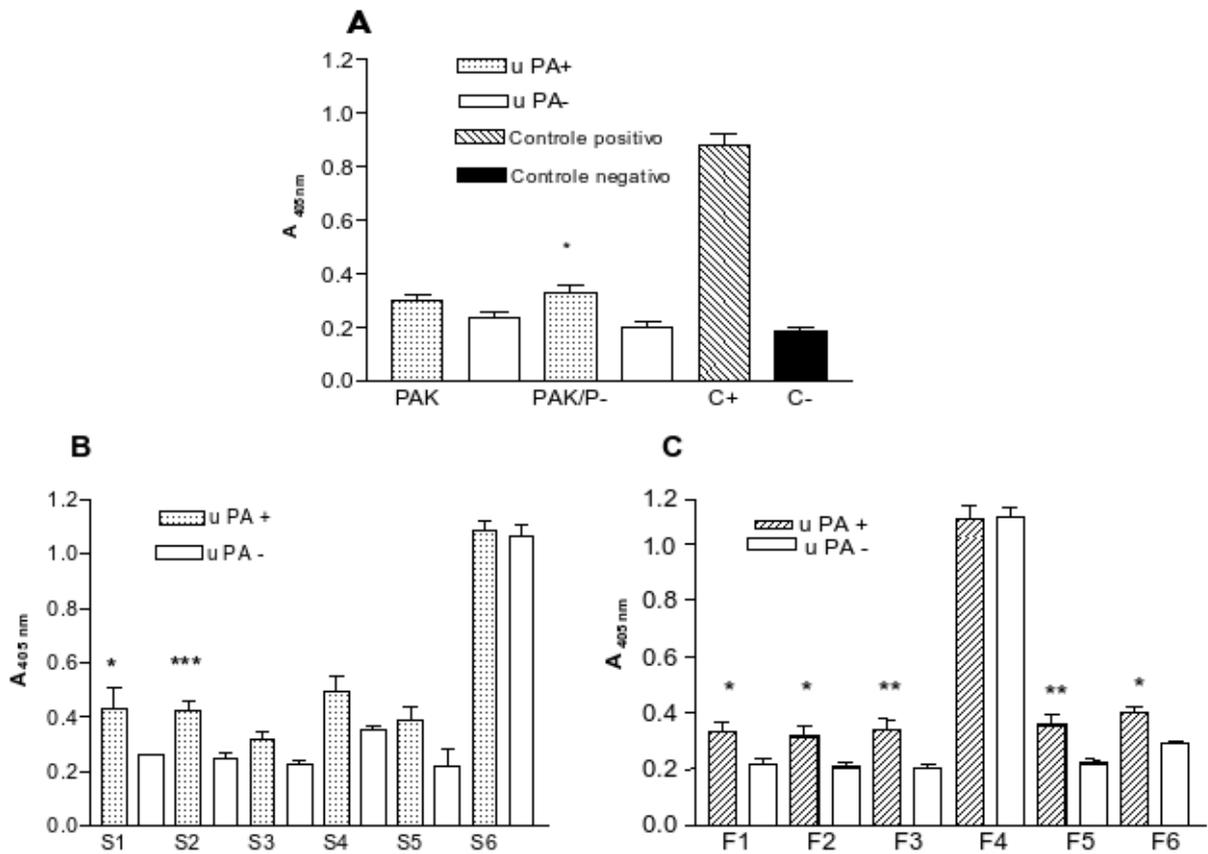
Legenda : A. Perfil de proteínas de membrana externa das diferentes cepas de *P. aeruginosa* após coloração pelo Comassie Blue. B. Reatividade das proteínas de membrana externa adsorvidas em membrana de nitrocelulose com o plasminogênio marcado com biotina mostrando várias bandas reativas. C. Controle negativo (membrana não exposta ao complexo plasminogênio-biotina) mostrando apenas uma banda reativa inespecífica, de cerca de 70 k Da. Na figura 9 C é apresentada a reatividade observada na membrana controle negativo, não expostas ao plasminogênio biotinilado, tratadas apenas com o complexo estreptavidina-peroxidase e posteriormente com a solução reveladora. Como pode ser observado, apenas a proteína de cerca de 70 kDa de todas as cepas foi evidenciada, sugerindo tratar-se de uma reatividade inespecífica.

3. 5. Ativação do plasminogênio na superfície de *P. aeruginosa*

A conversão de plasminogênio em plasmina foi avaliada por testes em que células das diferentes cepas bacterianas aderidas a poços de microplacas foram tratadas com solução de plasminogênio e com o ativador do tipo uroquinase e comparadas com células bacterianas controle submetidas apenas ao tratamento com plasminogênio quanto à capacidade de degradar o substrato cromogênico da plasmina. Como controle negativo foram utilizados poços sem bactérias aderidas, incubados com plasminogênio, uroquinase e com o substrato da plasmina. Os resultados obtidos são mostrados na figura 10.

A A_{405 nm} dos poços contendo as células bacterianas tratadas com uroquinase foi significativamente superior àquelas obtidas nos poços contendo bactérias não tratadas com o ativador uroquinase, com exceção das cepas PAK, S3, S4, S5, S6 e F4. Embora as cepas tratadas com uroquinase tenham degradado mais substrato da plasmina que as cepas não tratadas, a hidrólise do substrato por algumas das cepas não tratadas foi significativamente superior à detectada nos poços controle negativo ($p < 0.05$ pelo teste ANOVA de Dunnett; dados não mostrados), sugerindo que as bactérias por si só foram capazes de ativar o plasminogênio em plasmina. Esta hipótese foi reforçada pelos resultados obtidos com as cepas F4 e S6 que apresentaram altos níveis de degradação do substrato, independentemente da presença do ativador uroquinase.

Figura 10. Degradação do substrato cromogênico da plasmina pelas diferentes cepas revestidas com plasminogênio, após tratamento ou não com uroquinase

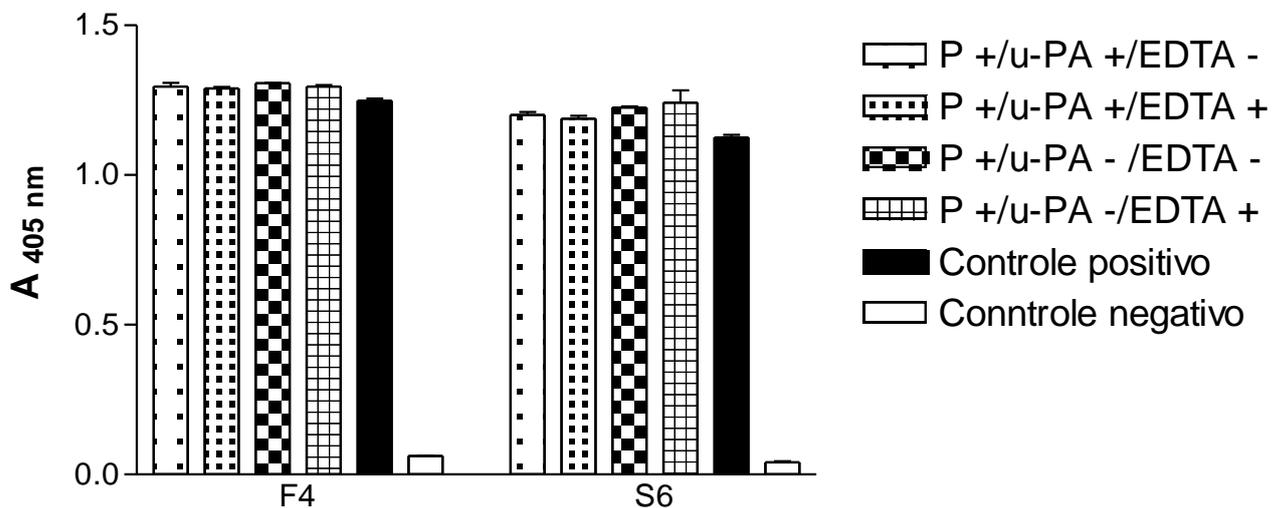


Legenda: As barras correspondem às médias das $A_{405\text{ nm}} \pm$ erro padrão dos resultados obtidos em 6 testes realizados em duplicata. Controle positivo, $A_{405\text{ nm}}$ obtida em poços revestidos com plasminogênio após ativação com u-PA ; controle negativo, $A_{405\text{ nm}}$ obtida em poços sem bactérias aderidas e tratados com plasminogênio e u-PA. *, ** e ***, $p < 0,5$; $0,01$ e $0,001$, respectivamente, pelo teste t de Mann Whitney, quando a $A_{405\text{ nm}}$ dos poços revestidos com bactérias tratadas com u-PA foi comparada à $A_{405\text{ nm}}$ dos poços revestidos com bactérias não tratadas com u-PA.

Na tentativa de avaliar a participação de metaloproteases secretadas por *P. aeruginosa* (elastases e protease alcalina) na degradação do substrato cromogênico pelas cepas F4 e S6, a capacidade de hidrólise do substrato por essas cepas após sua incubação com plasminogênio e posteriormente com o substrato da plasmina em presença de EDTA foi comparada com a

capacidade de hidrólise do substrato por micro-organismos incubados na ausência do quelante de cátions divalentes EDTA. Os resultados obtidos, apresentados na figura 11, mostram que o EDTA a 0,01 M não exerceu qualquer ação inibitória sobre a capacidade das cepas F4 ou S6 de degradar o substrato cromogênico da plasmina, sugerindo haver pouca ou nenhuma participação de metaloproteases bacterianas na degradação do substrato cromogênico.

Figura 11 : Degradação do substrato cromogênico da plasmina pelas cepas F4 e S6 revestidas com plasminogênio (P), na presença (u-PA+) , ausência (u-PA-) de uroquinase e em presença ou ausência de EDTA

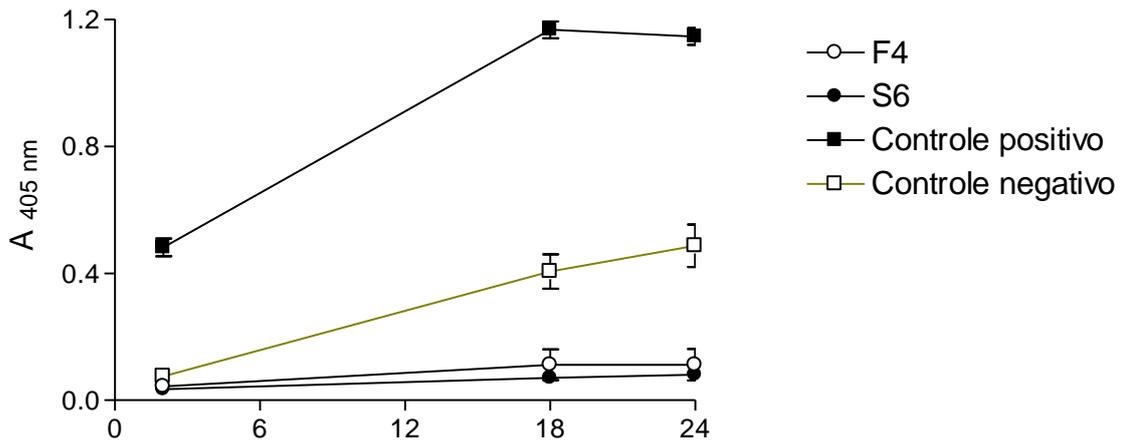


Legenda : As barras correspondem às médias das $A_{405 \text{ nm}}$ obtidos em 2 testes realizados em triplicata. Controle positivo, $A_{405 \text{ nm}}$ obtida em poços revestidos com plasminogênio após ativação com u-PA ; controle negativo, $A_{405 \text{ nm}}$ obtida em poços sem bactérias aderidas e tratados com plasminogênio e u-PA. Quando comparados pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni, os valores de $A_{405 \text{ nm}}$ dos controles positivos bem como os de cepas tratadas com EDTA e não tratadas não apresentaram diferenças significativas, sendo $p > 0,05$.

A avaliação da possível degradação inespecífica do substrato cromogênico da plasmina pelas cepas F4 e S6 foi realizada em um único teste em que poços de microplacas revestidos com células bacterianas foram incubados, por 24h, com o substrato cromogênico. Seguiu-se determinação da $A_{405 \text{ nm}}$ dos sobrenadantes. Como mostrado na figura 12, nenhuma degradação do substrato pode ser detectada.

Figura 12: Evolução dos valores de $A_{405\text{ nm}}$ dos sobrenadantes dos poços de microplacas revestidos com as cepas F4 e S6 após incubação com o substrato cromogênico da plasmina, ao longo de 24 horas de incubação..

..



Legenda: Os dados correspondem às médias \pm desvios padrões obtidos em dois ensaios distintos realizados em triplicata

3. 6. Efeito da captura e ativação de plasminogênio por *P. aeruginosa* na invasão de géis de fibrina

Células bacterianas da cepa PAK tratadas com plasminogênio e com o ativador estreptoquinase foram comparadas com células não tratadas em sua capacidade de invadir géis de fibrina. Antes da realização do teste, no entanto, a presença de plasminogênio na superfície das células bacterianas utilizadas nos testes de invasividade foi confirmada por teste imunoenzimático. Alíquotas das suspensões de bactérias tratadas com plasminogênio e estreptoquinase ou não tratadas foram depositadas em lâminas de vidro e expostas sucessivamente às soluções de anticorpos anti-plasminogênio e do complexo anti-IgG de coelho-peroxidase e, finalmente, à solução reveladora contendo DAB. Como controle negativo, foram utilizados esfregaços não expostos ao anticorpo anti-plasminogênio ou esfregaços tratados com plasminogênio mas não expostos ao anticorpo primário.

Enquanto as bactérias tratadas com plasminogênio mostraram-se intensamente coradas (figura 13) os esfregaços controle, não tratados com plasminogênio ou não tratados com anticorpo primário, não apresentaram qualquer imunomarcação (resultado não mostrado).

Figura 13. Fotomicrografia óptica mostrando a imunolocalização de plasminogênio na superfície de células bacterianas da cepa PAK.

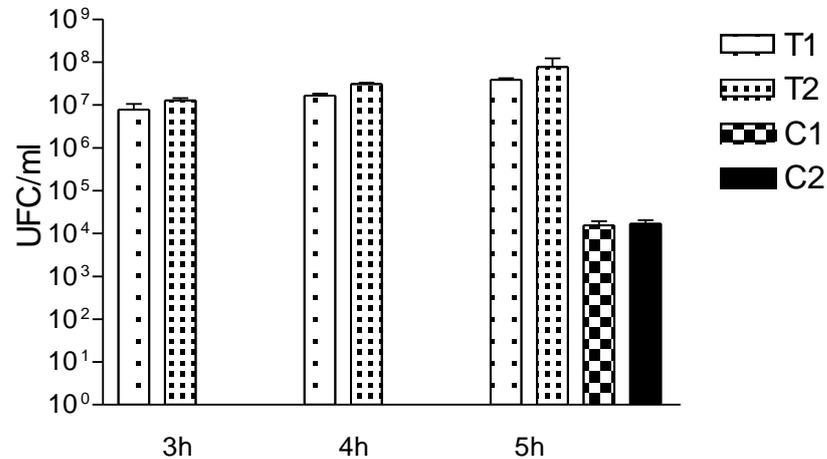


3. 6. 1. Testes quantitativos de invasão de géis de fibrina

A capacidade fibrinolítica da cepa de referência PAK foi estudada determinando-se a concentração de bactérias presentes nas soluções contidas nos poços de microplacas contendo insertos MilliCell-PCF recobertos com gel de fibrina e infectados com suspensões bacterianas tratadas ou não com plasminogênio e com o ativador estreptoquinase, após incubação por 3, 4 e 5 horas.

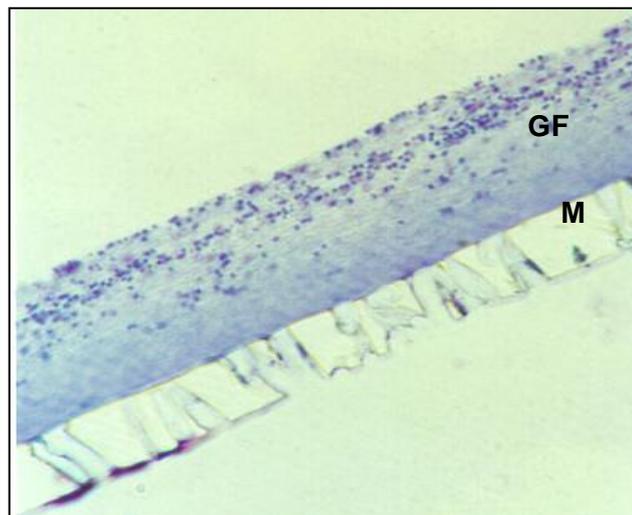
Em todos os testes realizados, o tratamento das suspensões bacterianas com plasminogênio e com seu ativador favoreceu significativamente a passagem dos micro-organismos através do gel de fibrina. Nos poços contendo géis infectados por suspensões tratadas a presença de micro-organismos foi detectada após 3 horas de incubação. Ao contrário, nos poços contendo géis infectados por suspensões não tratadas, somente após 5 horas de incubação foi detectada a presença de micro-organismos, em concentrações muito inferiores às detectadas nos poços “teste” após igual período de incubação (figura 14).

Figura 14. Capacidade de invasão dos géis de fibrina de células da cepa PAKe PAKp-tratadas com plasminogênio e estreptoquinase (T) e de bactérias controle não tratadas (C).



Legenda : Os dados acima representam as médias \pm erros padrão da concentração bacteriana nos poços contendo os insertos recobertos com os géis de fibrina obtidos em um experimento típico realizado em duplicata.

Figura 15. Fotomicrografia óptica de um corte de um dos géis de fibrina (GF) sobre a membrana (M) do inserto, após 5 horas de incubação com suspensão da cepa PAK não tratada com plasminogênio e ativador



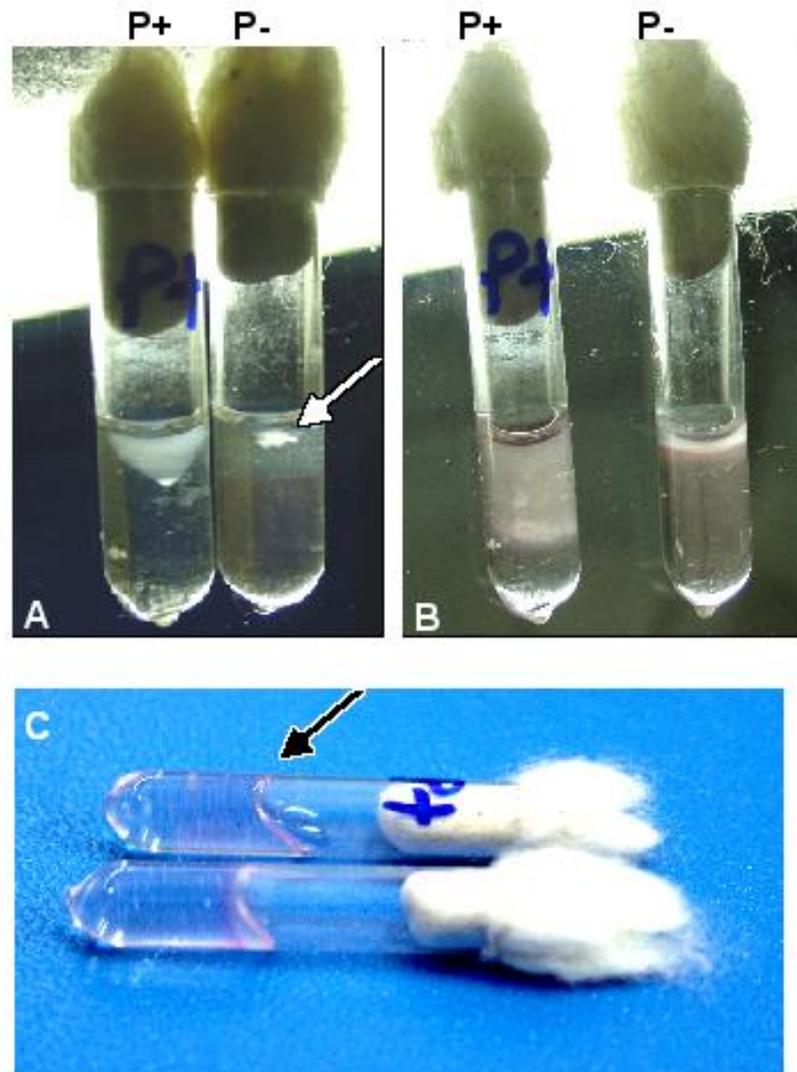
Legenda : A imagem mostra o aspecto de um gel de fibrina sobre a membrana de policarbonato do inserto, após incubação por 5 horas com bactérias não tratadas com o plasminogênio. Observa-se a presença de inúmeros micro-organismos no interior do gel que, ao fim do período de incubação, permaneceu perfeitamente preservado.

3. 6. 2. Teste de invasão de géis de fibrina contidos em tubos de Durhan

A observação dos tubos de Durhan contendo géis de fibrina inoculados com suspensões da cepa PAK de *P. aeruginosa* mostrou que células tratadas com plasminogênio e estreptoquinase foram capazes de invadir os géis após apenas 3 horas de incubação a cerca de 37⁰ C (Figura 16 A). Ao contrário, nenhum sinal de invasão foi observado nos tubos inoculados com células bacterianas não tratadas com plasminogênio e o inóculo bacteriano permaneceu localizado.

A invasividade dos micro-organismos contendo plasminogênio/plasmina em sua superfície foi mais evidente após 24 horas de incubação (Figura 16 B). Além disso, nos tubos inoculados com bactérias tratadas com plasminogênio/estreptoquinase, foi observada a liquefação parcial do gel de fibrina (Figura 16 C).

Figura 16 Fotografias de tubos de Durhan contendo géis de fibrina inoculados com células bacterianas da cepa PAK, tratadas com plasminogênio e estreptoquinase (P+) ou não tratadas (P-) após incubação por 3 horas (A) e por 24 horas (B e C)



Legenda: No tubo P+ em A a difusão dos micro-organismos no gel enquanto no tubo P- o crescimento bacteriano permaneceu restrito ao sítio de inoculação (seta). Observe, também, em C a liquefação parcial da fibrina (seta).

3. 7. Efeito da captura e ativação do plasminogênio por *P. aeruginosa* na invasão de monocamadas de células ECV-304

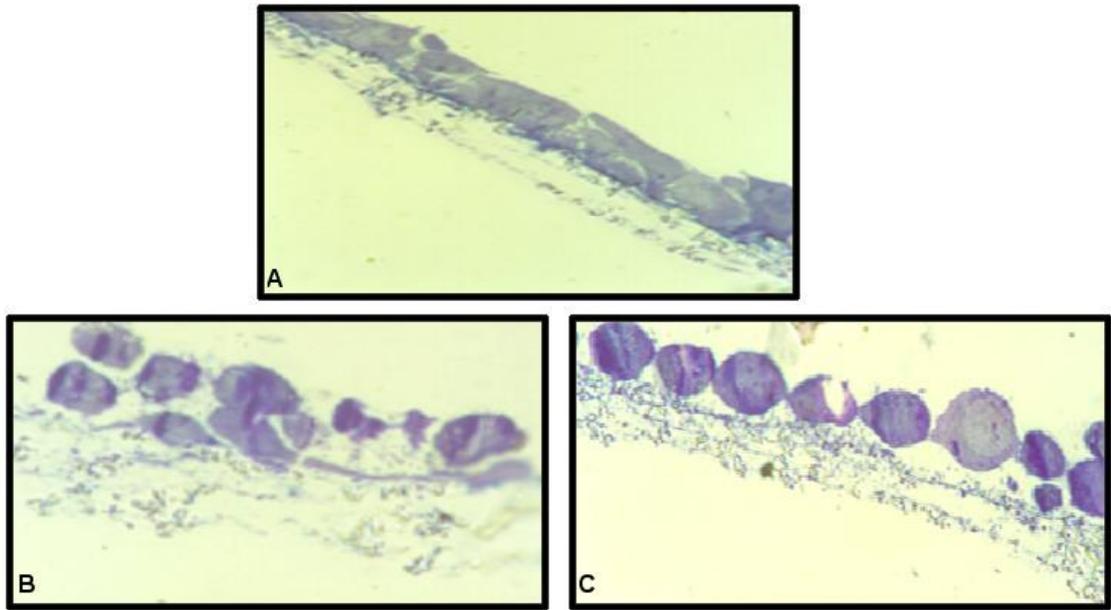
Culturas confluentes de células ECV-304 cultivadas sobre membrana semipermeável de insertos Transwell foram infectadas com suspensões da cepa PAK tratadas com plasminogênio e estreptoquinase e com suspensões bacterianas não tratadas. Após períodos de 3, 4 e 5 horas de incubação, alíquotas de 20 μ L do meio de cultura presente nos poços que continham os insertos foram diluídas e plaqueadas para determinação da presença e concentração de micro-organismos viáveis. Após a remoção da última alíquota, as células infectadas com os dois tipos de suspensões bacterianas e também células controle não infectadas foram fixadas e processadas para observação microscópica.

Surpreendentemente, após 3 horas de incubação, concentrações igualmente elevadas de bactérias foram recuperadas dos poços das microplacas contendo os insertos infectados com as suspensões microbianas tratadas e não tratadas com plasminogênio (resultados não mostrados).

A observação de cortes das culturas em microscópio óptico auxiliou a compreensão dos resultados acima descritos. Tanto nas culturas infectadas com bactérias tratadas com plasminogênio quanto nas culturas infectadas com bactérias não tratadas, foram observadas extensas áreas de destruição das monocamadas (figura 17 B e C).

Ao contrário, nas culturas controle não infectadas, as monocamadas apresentaram-se bem preservadas (figura 17 A), sugerindo que a destruição das células das culturas infectadas possa ter sido decorrente da secreção de exoprodutos bacterianos, como proteases, responsáveis pela perda das junções intercelulares nas células infectadas, as quais possibilitariam a passagem de micro-organismos para os compartimentos inferiores dos sistemas Transwell.

Figuras 17. Fotomicrografias ópticas (x 1000) de monocamadas de células ECV-304 não infectadas (A) e infectadas por 5 horas com suspensão da cepa PAK tratada com plasminogênio e estreptoquinase (B) e com bactérias controle não tratadas (C)



Legenda: Observa-se tanto em B quanto em C a desorganização das culturas resultante da destruição das junções intercelulares e perda da morfologia característica das células (x 1000).

4- DISCUSSÃO

Desde a década de 80, a interação de diversos patógenos humanos com proteínas do sistema fibrinolítico vêm despertando crescente interesse. Diversos autores evidenciaram, na superfície bacteriana, a presença, de receptores para plasminogênio/ plasmina e moléculas ativadoras de plasminogênio. Foi também descrita a produção de ativadores de plasminogênio por vários micro-organismos, tanto Gram positivos quanto Gram negativos (Lähteenmäki, Kuusela e Korhonen, 2001).

Patógenos humanos apresentam ainda, outras vias de interferência no sistema fibrinolítico humano, como a capacidade de indução da produção de moléculas ativadoras de plasminogênio por células eucarióticas. A exemplo, Zavisson, White e Bramley (1997) mostraram que células epiteliais de glândulas mamárias infectadas por *S. aureus* produziram altos níveis de u-PA, o mesmo ocorrendo com monócitos humanos após infecção por *B. burgdorferi* (Fuchs *et al.*, 1996). Além disso, o tratamento de monócitos com preparações purificadas da proteína de superfície A (Osp A) de *B. burgdorferi*, ou com seu análogo sintético, resultou na indução da super expressão do receptor para u-PA (u-PAR/CD87) na superfície celular e também na liberação de uma forma solúvel de u-PAR, detectada nos sobrenadantes das culturas (Coleman, Gebbia e Benach, 2001) .

Acredita-se que a alternância entre os fenótipos planctônico e aderente de bactérias, bem como a biossíntese coordenada de determinantes de virulência induzidos por estímulos ambientais e controlada pela densidade populacional bacteriana, somadas às interações dos micro-organismos com células e/ou mediadores do hospedeiro, exerçam influência na capacidade invasiva de *P. aeruginosa*.

Como *P. aeruginosa* produz proteases com largo espectro de ação, capazes de degradar diversos componentes da matriz extracelular (Heck, Morihara e Abrahamson, 1986), parece razoável supor que a produção dessas enzimas interfiram na invasividade bacteriana. No entanto, em um estudo experimental com coelhos, nenhuma diferença foi observada quanto à capacidade de causar infecções invasivas e de produzir vasculite (Ziegler e Douglas, 1979), entre cepas produtoras de proteases e outras não produtoras. Mais recentemente, Hirakata *et al.* (2000) mostraram que cepas isoladas de sangue apresentaram maior potencial de atravessar culturas confluentes de células epiteliais da linhagem MDCK (Madin-Darby Canine Kidney)

que cepas isoladas de secreções respiratórias. No entanto, essa maior invasividade não pode ser correlacionada à atividade citotóxica dos micro-organismos e permaneceu sem explicação.

Os resultados dos dois estudos mencionados nos levaram a pesquisar a contribuição da reatividade com o plasminogênio na invasividade de *P. aeruginosa* e também a avaliar se cepas isoladas de sangue de pacientes septicêmicos, em tese dotadas de potencial invasivo, apresentam reatividade diferente daquela exibida por cepas colonizadoras, em tese não invasivas.

Na primeira etapa de nosso trabalho foi investigada a afinidade de *P. aeruginosa* pelo plasminogênio e a participação das fímbrias nessa afinidade. Para atingir esse segundo objetivo, a capacidade de captura do plasminogênio por células da cepa fimbriada PAK foi comparada à de sua mutante isogênica não fimbriada PAK/p-.

É sabido que micro-organismos distintos, dentro de uma mesma espécie, podem diferir em sua capacidade de aderir a superfícies inertes. Além disso, pode-se supor que mutações induzidas visando à supressão de determinadas características fenotípicas, como a expressão de fímbrias, possam resultar na supressão de outras características bacterianas, como a capacidade de aderência a superfícies inertes. Como poços de microplacas de ELISA serviram de suporte para grande parte dos testes realizados neste estudo, a igual capacidade de aderência das cepas PAK e PAK/p- às microplacas era um pré-requisito indispensável para o estabelecimento dos modelos experimentais. Por isso, suspensões contendo iguais concentrações das cepas PAK e PAK/p- foram adicionadas aos poços das microplacas. Após incubação em geladeira, a cerca de 4°C, as suspensões foram removidas, os poços foram lavados e posteriormente tratados com solução de detergente para remoção dos micro-organismos aderidos. Seguiu-se a diluição sucessiva das suspensões obtidas e seu plaqueamento, para determinação do número de UFCs.

Os resultados obtidos nestes testes iniciais mostraram que a capacidade de aderência da cepa selvagem fimbriada ao plástico foi semelhante à de sua mutante isogênica não fimbriada. Esses resultados concordam com aqueles descritos por outros autores.

Estudando o comportamento de cepas selvagens e mutantes defectivas na biossíntese de pilina, O'Toole e Kolter (1998) observaram que as pili do tipo IV desempenham importante papel na aderência de *P. aeruginosa*, contrapondo-se aos efeitos de forças repulsivas exercidas por parte de microambientes inertes ou vivos. Foi ainda observado que estas estruturas são essenciais à formação de microcolônias e responsáveis pela penetração em substratos sólidos (graças ao fenômeno designado de “twitching motility”), nos estágios iniciais da formação dos biofilmes. Entretanto, foi verificado que cepas mutantes não piliadas, apesar de incapazes de

formar microcolônias, foram capazes de aderir satisfatoriamente a superfícies de polivinil. Vallet *et al.* (2001) também mostraram que cepas não piliadas de *P. aeruginosa*, obtidas por mutações induzidas na cepa PAK, quando cultivadas em meios de cultura pouco enriquecidos e sob temperaturas inferiores a 37 °C, foram capazes de aderir a superfícies de plástico com eficiência de 88%, quando comparadas à da cepa selvagem piliada.

Em nosso estudo, a etapa de aderência das diferentes cepas bacterianas ao plástico foi realizada em temperatura de cerca de 4 °C, em geladeira, e em tampão com pH básico. Como a aderência da cepa PAK/p- foi semelhante à de PAK, é possível que, sob as condições ambientais utilizadas em nossos testes, outras adesinas que não as pili do tipo IV possam ter possibilitado a aderência ao substrato das microplacas pelas cepas clínicas de *P. aeruginosa* utilizadas, mesmo aquelas eventualmente não portadoras de fímbrias.

A etapa seguinte de nosso estudo consistiu na pesquisa da afinidade de cepas bacterianas isoladas de pacientes com infecções disseminadas ou de indivíduos assintomáticos, pelo plasminogênio. Surpreendentemente, todas as cepas estudadas, independentemente do sítio de isolamento ou mesmo da eventual presença de fímbrias, mostraram afinidade semelhante pelo plasminogênio. Em todos os ensaios, não foram observadas reações cruzadas entre as células bacterianas aderidas aos poços das microplacas com o anticorpo específico para plasminogênio ou com o conjugado anti-IgG-peroxidase utilizado. Da mesma forma, o grau de aderência inespecífica do plasminogênio aos poços de microplacas não revestidas com células bacterianas, mas tratados com solução de BSA em tampão carbonato também foi consideravelmente baixo. Os resultados obtidos com esses controles negativos atestam que a ligação do plasminogênio a todas as cepas bacterianas estudadas foi específica, indicativa da presença de receptores para o plasminogênio. Além disso, a semelhança dos valores de $A_{490\text{ nm}}$ obtidos após a exposição sucessiva das bactérias ao plasminogênio, ao anticorpo anti-plasminogênio, ao complexo anti-IgG-peroxidase e à solução de OPD sugere que os receptores de superfície de *P. aeruginosa* para plasminogênio sejam estruturas constitutivas e, por conseguinte, bem conservadas.

Neste trabalho, como em muitos outros encontrados na literatura especializada, a captura do plasminogênio por *P. aeruginosa* pode ser inibida por um análogo da L-lisina, o ácido ϵ aminocapróico. Essa inibição foi tomada como indicativo de que a ligação do plasminogênio às células de *P. aeruginosa* também é mediada pelos 5 domínios “kringle”, que ligam resíduos

de lisina presentes e expostos nas extremidades carboxila terminais dos diversos receptores de plasminogênio (Lähteenmäki, Kuusela e Korhonen, 2001).

A capacidade de *P. aeruginosa* de capturar plasminogênio já fora descrita, em 1990, por Ullberg *et al.* que utilizou metodologia sensível, na qual foi empregado plasminogênio marcado com o isótopo radioativo do iodo. Os autores mostraram que 7 de 10 cepas testadas foram capazes de ligar plasminogênio. No entanto, nenhuma informação quanto à procedência das cepas de *P. aeruginosa* estudadas foi informada. Além disso, embora a presença de receptores específicos para plasminogênio tenha sido detectada e quantificada, sua natureza não foi caracterizada. Ao contrário, em nosso estudo, foi pesquisada a participação das fímbrias na captura do plasminogênio. Esta pesquisa foi direcionada pela existência de vários estudos que mostraram a participação de estruturas de superfície filogeneticamente compartilhadas, como fímbrias e flagelos, na afinidade de bactérias pelo plasminogênio, principalmente em espécies da família *Enterobacteriaceae* (revisto por Lähteenmäki, Kuusela e Korhonen, 2001). Em nosso trabalho, nenhuma diferença entre a reatividade das cepas piliada PAK e não piliada PAK/ p- foi observada. Este achado descartou a participação direta das fímbrias na captura do plasminogênio por *P. aeruginosa* e direcionou a procura de outros ligantes, presentes na superfície bacteriana.

Como diversos estudos também apontavam a participação de proteínas da membrana externa de bactérias Gram negativas, inclusive algumas não pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, (Lähteenmäki, Kuusela e Korhonen, 2001), foi pesquisada a importância dessas proteínas na afinidade de *P. aeruginosa* pelo plasminogênio.

O fracionamento das proteínas de membrana externa das cepas de *P. aeruginosa* usadas nesse estudo por SDS-PAGE, seguido pela técnica de “Western-blotting” mostrou a afinidade específica de várias bandas proteicas, de 30 a 60 kDa, pelo plasminogênio. Proteínas de membrana externa de outros micro-organismos com afinidade para o plasminogênio e apresentando pesos moleculares semelhantes, foram evidenciadas por diversos autores, sugerindo que as proteínas de *P. aeruginosa* reativas possam ser compartilhadas entre bactérias Gram negativas. Fuchs *et al.* (1994) identificaram em *B. burgdorferi* uma proteína de superfície, chamada Osp A, que funciona como adesina para o plasminogênio. Posteriormente caracterizaram a existência de duas diferentes frações de Osp A, com alta e baixa afinidade para o plasminogênio, de 24 e 20 kDa, respectivamente (Coleman *et al.*, 1995).

Yarzabal *et al.*(2000) também evidenciaram a participação de proteínas de membrana externa de *H. pylori*, com baixo peso molecular, cerca de 58,9 kDa como os receptores para o plasminogênio .

Proteínas de baixo peso molecular apresentando afinidade para o plasminogênio também foram identificadas por Monroy *et al.* (2000) na parede celular de *M. tuberculosis* (30, 60 e 66 kDa) e por Yavlovich, Higazi e Rottem (2001), na membrana plasmática de *Micoplasma fermentans* (de 32 e 55 kDa).

Uma vez demonstrada a afinidade das cepas de *P. aeruginosa* estudadas por plasminogênio, foi pesquisada a capacidade de ativação do plasminogênio ligado às células bacterianas por ativadores exógenos, como descrito em outros micro-organismos. A capacidade de ativação de plasminogênio pelo ativador uroquinase foi demonstrada em todas as cepas em estudo, independentemente do seu sítio de isolamento.

Em paralelo à incubação sucessiva de bactérias revestidas com plasminogênio com uroquinase e com o substrato da plasmina, os micro-organismos revestidos foram expostos diretamente ao substrato, sem exposição prévia ao u-PA., para avaliação de sua capacidade intrínseca de gerar plasmina. Nos poços das microplacas contendo algumas das cepas estudadas, a degradação do substrato Chromozyn pelos micro-organismos tratados com u-PA não diferiu daquela apresentada por células bacterianas não tratadas com o ativador. Duas cepas, uma originária de fezes e outra de sangue, mereceram especial atenção por terem apresentado elevada capacidade de degradação do substrato cromogênico. A ausência de degradação inespecífica do substrato observada em poços das microplacas em que as bactérias foram incubadas isoladamente com o substrato cromogênico, na ausência de plasminogênio, sinaliza para a presença de um ativador endógeno presente na superfície das células bacterianas. A alta especificidade para o Chromozyn e a resistência à ação do quelante de cátions divalentes EDTA foram tomados como indícios de que este ativador endógeno seja uma serino-protease.

Recentemente, em estudo visando à caracterização de proteases de *P. aeruginosa*, uma serino-protease extracelular, designada como protease IV, foi caracterizada e acrescida à enorme lista de fatores de virulência produzidos por *P. aeruginosa* (Engel *et al.*, 1998).Caballero *et al.* (2001).

Embora em nosso trabalho o ativador endógeno de plasminogênio evidenciado pareça estar ligado às células bacterianas, não se pode excluir a possibilidade de que esta(s) serino-protease(s) seja(m) secretada(s) para o meio extracelular. Sendo assim, a pesquisa da produção

de protease IV nos sobrenadantes de cepas clínicas de *P. aeruginosa* é assunto de interesse para futuros estudos.

A presença de uma protease de superfície sob controle plasmidial, designada como Pla e com cerca de 35 kDa, foi identificada no gênero *Yersinia*. Sua ação é semelhante à de u-PA e t-PA, clivando a molécula de plasminogênio na ligação Arg₅₆₀ - Val₅₆₁ (Kutyrev *et al.*, 1999). Além de ativar plasminogênio, Pla também exibe discreta atividade de coagulase (Beesley *et al.*, 1967). Estudos comparativos usando cepas com fenótipo Pla⁺ e mutantes defectivas mostraram que a presença dessa protease aumentou significativamente a aderência de *Yersinia* à matriz extracelular e à membrana basal. Verificou-se, também, que a adição de plasminogênio conferiu elevada capacidade de degradação e de invasão dessas estruturas (Lähteenmäki *et al.*, 1995; Lähteenmäki, Kuusela e Korhonen, 2001).

A influência da aquisição e posterior ativação de plasminogênio na superfície de patógenos bacterianos durante processos de invasão de tecidos hospedeiros vem sendo estudada *in vivo* e *in vitro*. A transmigração de patógenos bacterianos mediada pela ativação de plasminogênio após sua aderência a componentes de matriz extracelular e membrana basal é um fenômeno similar ao descrito no curso da disseminação de células neoplásicas. Por esse motivo, tem sido denominada de "metástase bacteriana", com o objetivo de diferenciar dos processos de invasão bacteriana já conhecidos, dependentes da interação com receptores de fagócitos e seu carreamento por estas células (Korhonen *et al.* 1992).

Em nosso trabalho, a importância da captura do plasminogênio no potencial de metástase de *P. aeruginosa* foi, inicialmente, investigada pela avaliação da capacidade de degradação de géis de fibrina, por ser a fibrina o substrato preferencial da plasmina.

Os testes quantitativos forneceram fortes evidências da facilitação da invasão dos géis pela cepa PAK revestida com plasminogênio, quando incubada em presença do ativador estreptoquinase. Essa facilitação refletiu-se particularmente no tempo de incubação requerido para que os micro-organismos pudessem transpor as barreiras do modelo experimental utilizado. Enquanto as células bacterianas não tratadas com plasminogênio precisaram de cerca de 5 horas para atravessar os géis de fibrina e as membranas dos insertos Millicell-PCF, as bactérias revestidas com plasminogênio e tratadas com o ativador estreptoquinase exigiram apenas 3 horas de incubação. Além disso, o número de UFCs encontrado após 5 horas de incubação foi indiscutivelmente muito superior ao detectado nos compartimentos inferiores dos insertos que continham géis de fibina inoculados com micro-organismos controle (não tratados com plasminogênio). A realização dos experimentos em presença de EDTA possibilitou a

exclusão da hipótese de que a degradação da fibrina tivesse sido decorrente da ação de metaloproteases produzidas por *P. aeruginosa*, como elastase e protease alcalina.

Além do teste quantitativo de degradação da fibrina, foram também realizados testes qualitativos, em tubos de Durhan, que possibilitaram a visualização da invasão, e posterior hidrólise dos géis de fibrina.

Estudos experimentais envolvendo micro-organismos de diversas espécies bacterianas tem mostrado a degradação de glicoproteínas da matriz extracelular e da membrana basal decorrente da ativação de plasminogênio ligado às células microbianas. A exemplo, células de *H. influenzae* revestidas com plasmina degradaram eficientemente proteínas não colagenosas da membrana basal, como laminina, fibronectina e vitronectina radiomarcadas. Degradaram, também, matrizes extracelulares secretadas por células endoteliais e epiteliais em cultura *in vitro*. A aprotinina, um importante inativador de serino-proteases, inibiu o processo (Virkola *et al.*, 1996). Resultados similares foram obtidos com *S. typhimurium* (Lähtenmäki *et al.*, 1995), *B. burgdorferi* (Coleman, Roemer e Benach, 1999) e *E. coli* expressando o gene codificante do ativador Pla (Lähtenmäki *et al.*, 1998).

Estudos em que foram utilizadas preparações de Matrigel, um composto que contém os principais componentes das membranas basais, como laminina, colágeno do tipo IV e proteoglicanas, também mostraram intensa atividade proteolítica bacteriana mediada pela ação da plasmina na superfície de *S. typhimurium* (Lähtenmäki *et al.*, 1995), *E. coli* (Korhonen *et al.*, 1992) *H. influenzae* (Virkola *et al.*, 1996) e *S. pneumoniae* (Ebberhard *et al.*, 1999).

Além de conferir a micro-organismos a capacidade de degradar glicoproteínas da matriz extracelular, Santala *et al.* (1999) mostraram que *S. aureus* revestidos com plasmina ativaram procolagenases (pro-MMP-1) presentes na matriz extracelular. A geração da enzima ativa resultou na degradação de colágenos, compostos resistentes à ação da plasmina propriamente dita, favorecendo, potencialmente, a disseminação bacteriana pelos tecidos hospedeiros

A aquisição de atividade proteolítica de superfície, mediada pela plasmina ativa, além de favorecer a degradação/invasão da matriz extracelular, parece favorecer também a invasão de monocamadas de células eucarióticas *in vitro*. Como exemplos de estudos pode-se citar aqueles que evidenciaram a invasão de *B. burgdorferi* através de monocamadas de células endoteliais (Coleman *et al.*, 1995) e outros realizados com *S. aureus* que foram capazes de invadir monocamadas de células do epitélio mamário bovino, a partir de sua adesão a receptores basais preferencialmente, atingindo posteriormente as regiões apicais das monocamadas celulares (Zavision, White e Bramley, 1997).

Em nosso trabalho, a capacidade da cepa PAK de *P. aeruginosa* revestida por plasmina de atravessar barreiras epiteliais foi pesquisada pela incubação de células bacterianas com monocamadas de células da linhagem ECV-304, que apresentam características mistas de células endoteliais e epiteliais, cultivadas sobre membranas de insertos Transwell. Nossas tentativas resultaram em fracasso pois tanto as culturas infectadas com bactérias revestidas com plasmina quanto aquelas infectadas com bactérias controle (não tratadas com plasminogênio e estroptocinase) apresentaram importante arredondamento das células bem como a presença de inúmeras células descamadas, sugestivas da perda das junções intercelulares. Como os períodos de infecção foram prolongados, e o teste foi realizado na ausência de EDTA para evitar a ação do quelante sobre as junções intercelulares, é possível que os micro-organismos tenham produzido metaloproteases, sabidamente dotadas de largo espectro de ação, ou outro fator de virulência determinante do sofrimento das células hospedeiras. Assim, pretendemos, no futuro, repetir estes ensaios utilizando cepas bacterianas defectivas na produção de elastase e protease alcalina.

A importância da captura do plasminogênio/plasmina na virulência bacteriana também já foi demonstrada em estudos *in vivo*. Assim, há 10 anos Sodeinde *et al.* (1992), utilizando um modelo experimental de infecções cutâneas, mostraram a importância da ativação do plasminogênio na invasividade de *Y. pestis*. Mais recentemente, Li *et al.* (1999), utilizando um modelo experimental de infecções cutâneas em camundongos, mostraram a existência de correlação direta entre a presença de receptores para moléculas ativadoras de plasminogênio na superfície de células de *Streptococcus* do grupo A e o potencial de invasividade dos micro-organismos. Quando animais transgênicos deficientes na produção de plasminogênio, foram utilizados, essa correlação deixou de existir. Finalmente, Coleman *et al.* (1997) mostraram que a presença de plasminogênio é necessária para o estabelecimento de espiroquetemia em camundongos infectados com *B. burgdorferi*. Os autores mostraram também, que bactérias utilizando mecanismos próprios independentes dos ativadores dos organismos hospedeiros capazes de capturar plasminogênio e gerar plasmina associada à sua superfície, apresentaram maior facilidade de causar infecções invasivas. Assim, a identificação em nosso estudo de que 16% das cepas clínicas de *P. aeruginosa* estudadas, além de capturar plasminogênio, apresentaram uma serino-protease de superfície capaz de gerar plasmina abre novas perspectivas para a compreensão dos mecanismos determinantes da patogênese destes micro-organismos oportunistas.

CONCLUSÕES

Tanto cepas de referência de *P. aeruginosa*, piliada ou não piliada, quanto cepas clínicas, provenientes de fezes de indivíduos assintomáticos e de sangue de pacientes sépticos, foram capazes de capturar plasminogênio humano.

O comportamento homogêneo de todas as cepas estudadas em relação à interação com plasminogênio sugere a existência de receptores constitutivamente expressos em *P. aeruginosa*.

A ligação do plasminogênio aos receptores das cepas PAK e PAK/p- foi lisina-dependente, implicando na participação dos domínios “kringle” do plasminogênio, domínios estes ligados de resíduos expostos de lisina.

Diversas frações proteicas de baixo peso molecular (entre 30 e 60 kDa), detectadas em todas as cepas estudadas, reagiram especificamente com o plasminogênio, sugerindo a participação dessas “omptinas” como os prováveis receptores de superfície de *P. aeruginosa* para o plasminogênio .

Como ocorre na extensa maioria das vezes em que patógenos capturam plasminogênio do hospedeiro, a presença de ativador exógeno uroquinase resultou na expressão de atividade proteolítica associada à superfície de todas as cepas bacterianas incluídas no estudo.

Duas cepas apresentaram ativador endógeno de plasminogênio associado à superfície das células bacterianas. Devido à sua especificidade para o substrato da plasmina e resistência à ação inibitória do EDTA, acredita-se que esse(s) ativador(es) pertença(m) à classe das serino-proteases.

A incorporação de plasmina na superfície da cepa PAK, *in vitro*, promoveu a degradação de géis de fibrina contidos em tubos após 3 horas de incubação e favoreceu a migração bacteriana através de géis de fibrina contidos em insertos Millicell- PCF.

Monocamadas de células da linhagem ECV-304 mostraram-se extremamente susceptíveis à infecção pela cepa PAK, o que impediu o estabelecimento de uma perfeita correlação entre a aquisição de plasmina na superfície bacteriana e o aumento na sua capacidade de migração em monocamadas celulares .

PERSPECTIVAS

A existência de receptores que possibilitem a ligação de *P. aeruginosa* diretamente aos ativadores de plasminogênio, como uroquinase e t-PA permanece a ser investigada.

Ainda permanece em aberto, como objeto de futuros estudos, a quantificação de receptores para plasminogênio ou seus ativadores em *P. aeruginosa*.

São oportunos estudos da cinética de ativação do plasminogênio por *P. aeruginosa*, bem como estudos objetivando avaliar diferenças no grau ativação de plasminogênio por outros tipos de ativadores, como estreptoquinase e principalmente t-PA.

É também de interesse que estudos futuros do (s) ativador (es) endógeno(s) de plasminogênio, ligado(s) à superfície de *P. aeruginosa* evidenciado(s) nesse estudo, forneçam maiores informações quanto às suas propriedades físicoquímicas, sua eventual ocorrência em fase solúvel e sua participação na invasividade de *P. aeruginosa*.

A degradação de fibrina mediada pela aquisição de plasmina na superfície de *P. aeruginosa* abre novas perspectivas de estudos visando investigar a digestão de componentes da matriz extracelular como laminina, sulfato de heparana, fibronectina. .

È oportuno também o desenvolvimento de novos modelos de estudo da capacidade de metástase bacteriana, utilizando outras linhagens de células endoteliais além de ECV-304, bem como cepas defectivas na produção de proteases .

É também de interesse a realização de estudos visando à investigação da super expressão de receptores para u-PA em linhagens de células endoteliais, em resposta a infecções por cepas clínicas de *P. aeruginosa*. Finalmente, a utilização de modelos *in vivo* infectados com cepas de *P. aeruginosa* produtoras do(s) ativador(es) endógeno(s), principalmente aqueles envolvendo a comparação da susceptibilidade à infecção bacteriana de linhagens de animais normais e mutantes defectivos na produção de plasminogênio, possibilitará a validação dos resultados obtidos nos testes *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ARORA S K, RITCHINGS E C, LORY A S , RAMPHAL R. Cloning and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* *fli F* necessary for flagellar assembly and bacterial adherence to mucin. **Infect Immun.**v.64,p.2130-2136, 1996.
- ARORA S K, DASGUPTA N, LORY S, RAMPHAL R. Identification of two types of flagellar Cap proteins, Fli D, in *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect Immun.**v.68,p.1474-1479, 2000
- BEESELEY E D, BRUBAKER R R, JANSEN W A, SURGALLA M J. Pesticins III. Expression of coagulase and mechanism of fibrinolysis. **J Bacteriol** . v.94,p.19-26, 1967
- BEJARANO P A , LANGEVELD J P M, HUDSON B G, NOELKEN M E. Degradation of basement membranes by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. **Infect Immun.** v.57,p.3783-3787, 1989
- BLEVES S, GÉRARD-VINCENT M, LAZDUNSKI A , FILLOUX A. Structure-function analysis of Xcp, a component involved in secretory pathway-dependent protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. **J Bacteriol.**v.181, p.4012-4019, 1999.
- BONTEN M J M, BERGMANS D C J J, SPEIJER H, STOBBERINGH E E. Characteristics of polyclonal endemicity of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in intensive care units. **Am J Respir Crit Care Med.**v.160,p.1212-1219, 1999.
- BRODER C C, LOTTENBERG R, VON MERING G O, JOHNSON K H. Isolation of a procariotic plasmin receptor. **J Biol Chem.**v. 266, p.4922-4928, 1991.
- BROOUN A , LIU S, LEWIS K. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrob Agents Chemother.**v.44,p. 640-646, 2000.
- BRYAN R, FELDMAN M, JAWETZ S C, RAJAN S, DIMANGO E, TANG H B, SCHEFFLER L, SPEERT D P, PRINCE A. The effects of aerosolized dextran in a mouse model of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. **J Infect Dis.**v.179, p.1449-1458, 1999.
- CABALLERO A R, MOREAU J M, ENGEL L S, MARQUART M E, HILL J M, O'CALLAGHAN R J. *Pseudomonas aeruginosa* Protease IV enzyme assays and comparison to other *Pseudomonas* proteases. **Anal Biochem.**v.290, p.330-337, 2001.
- CARNOY C, SHARFMAN A, VAN BRUSSEL E, LAMBLIN G, RAMPHAL R, ROUSSEL P. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane adhesins for human respiratory mucus glycoproteins. **Infect Immun.**v.62, p.1896-1900, 1994..
- CHAVAKIS T, KANSE S M, YUTZY B LIJNEN, H R, PREISSNER K T. Vitronectin concentrates proteolytic activity on the cell surface and extracellular matrix by trapping soluble urokinase receptor-urokinase complexes . **Blood.** v.91,p.2305-2312, 1998.

CHAYABUTRA C , LU-KWANG J. Degradation of n-hexadecane and its metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* under microaerobic and anaerobic denitrifying conditions. **Appl Environ Microbiol.**v. 66, p. 493–498, 2000.

COBURN J , FRANK D W. Macrophages and epithelial cells respond differently to the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. **Infect Immun.**v.67, p.3151-3154, 1999.

COLEMAN JL, SELLATI TJ, TESTA JE, KEW RR, FURIE MB, BENACH JL. *Borrelia burgdorferi* binds plasminogen, resulting in enhanced penetration of endothelial monolayers . **Infect Immun.**v.63, p.2478-2484,1995.

COLEMAN JL, GEBBIA JA, PIESMAN J, DEGEN JL, BUGGE TH, BENACH JL. Plasminogen is required for efficient dissemination of *B. burgdorferi* in ticks and for enhancement of spirochetemia in mice. **Cell** . v.89, p. 1111-1119, 1997.

COLEMAN JL, ROEMER E J, BENACH JL. Plasmin coated *Borrelia burgdorferi* degrades soluble and insoluble components of the mammalian extracellular matrix. **Infect Immun.** v. 67, p. 3929-3936, 1999.

COLEMAN J L, GEBBIA J A, BENACH JL. *Borrelia burgdorferi* and other bacterial products induce expression and release of the urokinase receptor (CD 87).**J Immunol.** v. 166, p. 473-480, 2001.

COMOLLI J C, WAITE L L , MOSTOV K E, ENGEL J N. Pili binding to Asialo-GM1 on epithelial cells can mediate cytotoxicity or bacterial internalization by *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect Immun.**v. 67, p. 3207-3214, 1999.

CONFORTI G, DOMINGUEZ-JIMENEZ C, RONNE E, HEVER-HANSEN G, DEJANA E. Cell-surface plasminogen activation causes a retraction of *in vitro* cultured human umbilical vein endothelial cell monolayer . **Blood.**83:994-1005.1994.

DAVIDSON J M, BENN S I. Regulation of angiogenesis and wound repair. Interactive role of the matrix and growth factors. In Lippincott Raven Publishers, eds. **Cellular and Molecular Pathogenesis.** Philadelphia. Sirica A E. Sirica.p. 79-107,1996.

DE BENTZMAN S, PLOTKOWSKI C, PUCHELLE E. Receptors in the *Pseudomonas aeruginosa* adherence to injured and repairing airway epithelium. **Am J Respir Crit Care Med.**v. 154, p. 5155-5162,1996.

DE MORAES B A , CRAVO C A N, LOUREIRO M M, SOLARI C A , ASENCI M D. Epidemiological analysis of bacterial strains involved in hospital infection in a university hospital from Brasil. **Rev Inst Med trop S. Paulo.**v. 42, p. 201-207,2000.

DOBROVOLSKY A B , TITAEVA E V. The Fibrinolysis System: Regulation of Activity and Physiologic Functions of Its Main Components. **Biochemistry (Moscow).**v. 67, p. 99-108, 2002 Translated from **Biokhimiya.**v.67, p. 116 -126, 2002. Original Russian Text Copyright © by Dobrovolsky, Titaeva.2002.

DOIG, P, TODD T, SASTRY PA, LEE KK, HODGES RS, PARANCHYCH W, IRVIN RT. Role of pili in adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human respiratory epithelial cells. **Infect Immun.**v. 56, p.1641-1646, 1988.

EBBERHARD T, KRONVALL G, ULLBERG M. Surface bound plasmin promotes migration of *Streptococcus pneumoniae* through reconstituted basement membranes. **Microb Pathogen.**v.26, p. 175-181,1999.

ENGEL L E, HILL J M, CABALLERO A R, GREEN L C, O'CALLAGHAN R J. Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. **J Biol Chem.**v. 27, p. 16792-16797,1998.

FELDMAN M, BRYAN R, RAJAN S, SCHEFFLER L, BRUNNERT S, TANG H, PRINCE A. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. **Infect Immun.**v. 66, p. 43-51, 1998.

FLEISZIG S M J, EVANS D J, DO N, VALLAS V, SHIN S, MOSTOV K E. Epithelial Cell Polarity Affects Susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* Invasion and Cytotoxicity. **Infect Immun.**v.65, p. 2861-2867, 1997.

FRANCIS, C. W., & MARDER, V. J. Concepts of Clot Lysis. **Annu Rev Med.**1986. 37(1), 187-204.

FUCHS H, WALLICH R, SIMON MM, KRAMER MD. The outer surface protein A of de spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) receptor. **Proc Natl Acad Sci.** v. 91, p.12594-12598, 1994.

FUCHS H, SIMON MM, WALLICH R, BECHIEL M , KRAMER MD . *Borrelia burgdorferi* induces secretion of pro-urokinase –type plasminogen activator for human monocytes. **Infect Immun.**v. 64, p. 4307- 4312, 1996.

GLESSNER A, SMITH RS, IGLEWSKY BH, ROBINSON JB. Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* Quorum-Sensing Systems in control of twitching motility. **J Bacteriol.**v. 181, p. 1623-1629, 1999.

GODAR S. , STOCKINGER H. CD87. **J Biol Regul Homeost Agents.**2000; 14:324-326.
Gonias S L. Pathophysiology of thrombosis and blood clotting disorders. In Lippincot Raven Publishers, eds. **Cellular and Molecular Pathogenesis.** Philadelphia. Sirica A E. Sirica. p. 109 -124, 1996.

HECK L W, MORIHARA K, ABRAHAMSON D R. Degradation of soluble laminin and depletion of tissue-associated basement membrane laminin by *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease. **Infect Immun.**v. 54, p. 149-153, 1986.

HIRAKATA Y, FINLAY B B, SIMPSON D A, KOHNO S, KAMIHIRA S, SPEERT D P. Penetration of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* through MDCK epithelial cell monolayers. **J Infect Dis.**v. 181,p. 765-769, 2000.

HSUEH P R , CHEN M L, SUN C C , CHEN W H, PAN H J, YANG L S, CHANG S C, HO S W, LEE C Y, HSIEH W C, LUH K T. Antimicrobial drug resistance in pathogens causing

nosocomial infections at a university hospital in Taiwan , 1981 –1999. **Emerging Infect Dis.** v. 8, p. 63-68, 2002

KIEVIT TR, IGLEWSKY B. Bacterial quorum-sensing in pathogenic relationships. **Infect Immun.**v. 68, p. 4839-4849, 2000

KLEMPNER MS, NORING R, EPSTEIN MP, MCCLOUD B, HU R, LIMENTANI SA, ROGERS R A. Binding of human plasminogen and urokinase-type plasminogen activator to the Lyme Disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. **J Infect Dis.**v. 171, p. 1256-1265, 1995.

KONEMAN E W , ALLEN S D , JANDA W M, SCHRECKENBERGER P C, WINN JR. W C. **Color Atlas and textbook of Diagnostic Microbiology.** 5th edition. Philadelphia, Lippincott- Raven Publishers.p 265-268, 1997.

KORHONEN T K, VIRKOLA R, LÄHTEENMÄKI K, BJÖRKMAN Y, KUKKONEN M, RAUNIO T, TARKKANEN A M, WESTERLUND B. Penetration of enteric bacteria through basement membranes : a hypothesis. **FEMS Microbiol Lett.**v. 100, p. 307-312, 1992.

KUKKONEN M, SAARELA S, LÄHTEENMÄKI K,HYNÖNEN U, WESTERLUND-WIKSTRÖM, RHEN M, KORHONEN TK. Identification of two laminin-binding fimbriae, the type 1 fimbria of *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium and G fimbria of *Escherichia coli*, as plasminogen receptors. **Infect Immun.**v.66, p. 4965-4970,1998.

KUTYREV V, MEHIGH R J, MOTIN V L, POKROVSKAYA M S, SMIRNOV G B, BRUBAKER R R. Expression of the plague plasminogen activator in *Yersinia pseudotuberculosis* and *Escherichia coli*. **Infect Immun.**v. 67,p.1359-1367, 1999.

LÄHTEENMÄKI K, WESTERLUND B, KUUSELA P, KORHONEN TK . Immobilization of plasminogen on *Escherichia coli* flagella. **FEMS Microbiol Lett.** v.106, p. 309-314,1993.

LÄHTEENMÄKI K, VIRKOLA R, POUTTU R, KUUSELA P, KUKKONEN M, KORHONEN TK . Bacterial plasminogen receptors : *in vitro* evidence for a role in degradation of the mammalian extracellular matrix . **Infect Immun.**v. 63, p. 3659-3664. 1995. .

LÄHTEENMÄKI K, VIRKOLA R, SARE A , EMÖDY L, KORHONEN T K. Expression of plasminogen activator Pla of *Yersinia pestis* enhances bacterial attachment to the mammalian extracellular matrix. **Infect Immun.**v. 66, p. 5755–5762, 1998.

LÄHTEENMÄKI K, KUUSELA P, KORHONEN T K. Bacterial plasminogen activators and receptors. **FEMS Microbiol Rev.** v. 25, p. 531-552, 2001.

LAZDUNSKI A. Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* et leur régulation. **Med Mal Infect.** v. 28, p. 109-118, 1998.

LI Z, PLOPLIS VA, FRENCH EL, BOYLE MDP. Interactions between group A streptococci and the plasmin(ogen) system promotes virulence in a mouse skin infection model. **J Infect Dis.** v. 179, p. 907-914, 1999.

LJUNGH A. *Helicobacter pylori* interactions with plasminogen. **Methods.** v. 21, p. 151-157, 2000.

LOTTENBERG R, BRODER C C, BOYLE M D. Identification of a specific receptor for plasmin on a group A streptococcus. **Infect Immun.**v. 55, p. 1914-1918, 1987.

LOTTENBERG R, DES JARDIN L E, WANG H, BYLE M D P. Streptokinase-producing streptococci grown in human plasma acquire unregulated cell-associated plasmin activity. **J Infect Dis.**v. 166, p. 436-440, 1992.

LOTTENBERG R, MINNING-WENZ D, BOYLE, M D P. Capturing host plasmin(ogen): common mechanism for invasive pathogens? **Trends Microbiol.** v. 2, p. 20-24, 1994.

MEYER J M, NEELY A, STINTZI A, GEORGES C, HOLDER I A. Pyoverdin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa* . **Infect Immun.**v. 64, p. 518–523, 1996.

MONROY V, AMADOR A, RUIZ B, ESPINOZA–CUETO P, XOLALPA W, MANCILLA R, ESPITIA C. Binding and activation of human plasminogen by *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect Immun.** v. 68, p. 4327-4330, 2000.

MURRAY P R, BARON E J, PFALLER M A, TENOVER F C, YOLKEN R H. **Manual of Clinical Microbiology.** 6th edition. American Society for Microbiology.p. 509-511, 1995.

O'TOOLE G, KOLTER R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Mol Microbiol.** v. 30, p. 295-304, 1998.

PARFYONOVA, YE V , PLEKHANOVA O S, TKACHUK , V A . Plasminogen Activators in Vascular Remodeling and Angiogenesis. **Biochemistry (Moscow).** v. 67, p. 119-134, 2002. Translated from **Biokhimiya.** v. 67, p. 139-156, 2002.. Original Russian Text Copyright © by Parfyonova, Plekhanova, Tkachuk.2002.

PARKKINEN J, KORHONEN TK . Binding of plasminogen to *Escherichia coli* adhesion proteins. **FEBS Lett.** v. 250, p. 437-440, 1989.

PARKKINEN J, HACKER J, KORHONEN T K. Enhancement of tissue plasminogen activator-catalyzed plasminogen activation by *Escherichia coli* S fimbriae associated with neonatal septicaemia and meningitis. **Tromb Haemost.** v. 65, p. 483-486, 1991.

PLOTKOWSKI M C, TOURNIER J M, PUCHELLE E. *Pseudomonas aeruginosa* strains possess specific adhesins for laminin . **Infect Immun.**1996; 64:600-605.

PLOTKOWSKI M C, COSTA A O, MORANDI V, DE BENTZMANN S, NADER H B, PUCHELLE E. Heparan sulfate proteoglycans are potential receptors for nonpiliated *Pseudomonas aeruginosa* adherence to non polarized airway epithelial cells. **J Med Microbiol.** v. 50, p. 183-190, 2001.

REBIÈRE- HÜET J, DI MARTINO P , GALLET O, HULEN C. Interactions de protéines de membrane externe de *Pseudomonas aeruginosa* avec la fibronectine plasmatique. Recherche d'adhésines bactériennes. **C R Acad Sci III.**v. 322, p. 1071-1080, 1999.

REED G L, HOUNG A K, LIU L, PARHAMI-SEREN B, MATSUEDA L H, WANG S, HEDSTROM L. A catalytic switch and the conversion of streptokinase to a fibrin-targeted plasminogen activator. **Proc Natl Acad Sci.** v. 96, p. 8879-8883, 1999.

RINGDAHL U, SJOBRING U. Analysis of plasminogen-binding M proteins of *Streptococcus pyogenes*. **Methods**. 21:143-150.2000.

ROGER P, PUCHELLE E, BAJOLET-LAUDINAT O, DEBORDEAUX C, KLOSEK J M, PLOTKOWSKI M C, COHEN J H M, SHEPPARD D, DE BENTZMANN S. Fibronectin and $\alpha 5\beta 1$ integrin mediate the binding of *Pseudomonas aeruginosa* to airway epithelial cells. **Eur Respir J**. v. 13, p. 1301-1309, 1999.

RUGGERI Z M, DENT J A, SALDÍVAR E. Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood . **Blood**. v. 94, p. 172-178, 1999.

SAIMAN L., PRINCE A. *Pseudomonas aeruginosa* pili bind asialo GM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells. **J Clin Invest**. v.92, p. 1875-1880, 1993

SANTALA A, SAARINEN J , KOVANEN P, KUUSELA P. Activation of interstitial collagenase , MMP-1 by Staphylococcus aureus cells having surface – bound plasmin: a novel role of plasminogen receptors of bacteria. **FEBS Lett**. v. 461, p. 153-156,1999.

SJOBRING U, POHL G, OLSEN A. Plasminogen, absorbed by *Escherichia coli* expressing curli or by *Salmonella enteritidis* expressing thin aggregative fimbriae, can be activated by simultaneously captured tissue-type plasminogen activator (t-PA). **Mol Microbiol**. v. 14, p. 443-52, 1994.

SODEINDE OA, SUBRAHMANYAM YV, STARK K, QUAN T, BAO Y, GOGUEN JD. A surface protease and the invasive character of plaque. **Science** v. 258, p. 1004-1007, 1992.

STARHOPOULOS C, HENDRIXSON D R, THANASSI D G, HULTGREN S J., AST GEME III J W, CURTISS III R . Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in Gram- negative pathogens : an evolving story. **Microb Infect**. v. 2, p. 1061-1072, 2000.

STEPANOVA V V, TKACHUK V A. Urokinase as a multidomain protein and polyfunctional cell regulator. **Biochemistry (Moscow)**. v. 67, p. 127 -138, 2002. Translated from **Biokhimiya**. v. 67, p. 127 -138, 2002.Original Russian Text Copyright © by Stepanova , Tkachuk.2002.

TAKAHASHI K, SAWASAKI Y, HATA J. Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. **In vitro Cell Dev Biol** v. 26, p. 265-274.1990.

TANG H B, DIMANGO E, BRYAN R, GAMBELLO M, IGLEWSKI B H, GOLDBERG J B, PRINCE A. Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. **Infect Immun**.v. 64, p. 37-43, 1996.

TAPPER H, HERWALD H. Modulation of hemostatic mechanisms in bacterial infectious diseases. **Blood**.v. 96, p. 2329-2337, 2000.

TERNYNCK T, AVRAMEAS S. **Techniques Immuno- Enzymatiques**. 2^a edition. Inserm. 1991.

ULLBERG M, KRONVALL G, WIMAN B. New receptor for human plasminogen on gram positive cocci. **APMIS**.v. 97, p. 996-1002, 1989.

ULLBERG M, KRONVALL G, KARLSSON I, WIMAN B . Receptor for human plasminogen on gram negative bacteria . **Infect Immun**.58:21-25.1990.

ULLBERG M, KUUSELA P, KRISTIENSEN B, KRONVALL G. Binding of plasminogen to *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* and formation of surface-associated plasmin. **J Infect Dis**.v. 166, p. 1329-1334, 1992.

ULLBERG M, WIMAN B, KRONVALL G . Binding of tissue plasminogen activator (t-PA) to *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae*. **FEMS Immunol Med Microbiol**.v. 9, p. 171-177, 1994.

VALLET I, OLSON J W, LORY S , LAZDUNSKI A , FILLOUX A. The chaperone / usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa* : Identification of fimbrial gene clusters (*cup*) and their involvement in biofilm formation. **Proc Natl Acad Sci**.v. 98, p. 6911-6916, 2001.

VAN DELDEN C, IGLEWSKI BH . Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections . **Emerging Infect Dis**. v. 4, p. 551-560, 1998.

VERLICH Y, FRANCIS C W, WHITE J, WEISEL J W. Structural studies of fibrinolysis by electron microscopy. **Blood**. v. 92, p. 4721-4729, 1998.

VIRKOLA R, LÄHTEENMÄKI K, EBERHARD T, KUUSELA P, VAN ALPHEN L, ULLBERG M, KORHONEN T K. Interaction of *Haemophilus influenzae* with the mammalian extracellular matrix. **J Infect Dis**. v.173, p. 1137-1147, 1996.

WANG H, LOTTENBERG R. Analysis of plasmin(ogen) acquisition by clinical isolates of group A streptococci incubated in human plasma. **J Infect Dis**. v. 169, p. 143-149, 1994.

WATNICK P, KOLTER R. Biofilm, city of microbes. **J Bacteriol**.v. 182, p. 2675-2679, 2000.

YAVLOVICH A, HIGAZI ABD A-R, ROTTEM S. Plasminogen binding and activation by *Mycoplasma fermentans* . **Infect Immun**. v. 69, p. 1977-1982, 2001.

YARZÁBAL A, AVILÁN L, HOELZL K, MUÑOZ M, PUIG J, KANSAU I. A study of the interaction between *Helicobacter pylori* and components of the human fibrinolytic system. **Braz J Med Biol Res**. v. 33, p. 1015-1021, 2000.

ZAVISION B, WHITE J H, BRAMLEY A J. *Staphylococcus aureus* stimulates urokinase-type plasminogen activator expression by bovine mammary cells. **J Infect Dis**. v. 176, p. 1637-1640, 1997.

ZIEGLER E J, DOUGLAS H. *Pseudomonas aeruginosa* vasculitis and bacteremia following conjunctivitis: a simple method of fatal *Pseudomonas* infection in neutropenia. **J Infect Dis**. v. 139, p. 218-296, 1979.

Available online at www.sciencedirect.com

Microbial Pathogenesis 36 (2004) 59–66

www.elsevier.com/locate/micpath

Binding of plasminogen to *Pseudomonas aeruginosa* results in formation of surface-associated plasmin and enhanced bacterial invasiveness

Cecília Maria Ferreira da Silva, Luciana de Abreu Vidipó,
Rebeca Nishi, Maria Cristina Plotkowski*

Department of Microbiology and Immunology, State University of Rio de Janeiro, FCM/UERJ, Av. 28 de Setembro,
87 fundos, 3º andar., Rio de Janeiro 20 551-030, Brazil

Received 20 January 2003; received in revised form 13 August 2003; accepted 3 September 2003

Abstract

The interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with plasminogen (Plg) is herein reported. Plg bound similarly to laboratory and clinical *P. aeruginosa* isolates from blood of septicemic patients and stools of asymptomatic carriers. No difference in Plg capture was detected between the pilated PAK strain and its isogenic nonpilated mutant. Western immunoblotting results suggested that low molecular weight nonpilus adhesins from the bacterial outer membranes accounted for the Plg capture. Bacteria-bound Plg was converted to bioactive plasmin in the presence of exogenous urokinase-type Plg activator. The presence of surface-bound plasmin enhanced significantly the *P. aeruginosa* capability to invade fibrin gels and a reconstituted basement membrane matrix. These findings support the concept that Plg capture by *P. aeruginosa* may represent a mechanism which offers advantages to bacterial invasiveness through tissue barriers.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *P. aeruginosa*; Bacterial invasiveness; Plasminogen; Fibrinolysis

1. Introduction

Pseudomonas aeruginosa is the epitome of an opportunistic pathogen of humans. The bacterium almost never infects uncompromised tissues, yet there is hardly any tissue that it cannot infect, if the tissue defenses are compromised in some way. In compromised patients most *P. aeruginosa* infections are composed of three stages: bacterial attachment and colonization, local invasion and disseminated systemic infections. The broad range of proteolytic enzymes produced by *P. aeruginosa* [1] is likely to favor the spread of the bacteria throughout the host organism. However, in a study investigating the relationship between the production of proteases and the course of infection in neutropenic rabbits, protease-negative *P. aeruginosa* strains were as invasive as protease producers and some elastase-negative strains were associated with a high incidence of vasculitis

[2]. These results suggested the existence of additional mechanisms favoring *P. aeruginosa* invasiveness.

Plasmin is a trypsin-like serine proteinase that plays a major role in hemostasis by mediating the digestion of fibrin blood clots. Plasmin can also digest other proteins, including laminin, a major component of basement membranes. Plasminogen (Plg), the zymogen form of plasmin, is activated by the tissue-type (tPA) and the urokinase-type (uPA) Plg activators (PA) [3]. Activation of Plg depends on the cleavage of the Arg⁵⁶⁰-Val⁵⁶¹ peptide bond, resulting in a molecule exhibiting two peptide chains, which remain connected by disulfide bridges. The A chain contains five triple-loop structures (kringles) that mediate the interaction of plasmin (ogen) with a variety of ligands and with the plasmin physiological inhibitors α 2-antiplasmin (α 2-AP) and α 2-macroglobulin (α 2-M), via lysine-binding sites in the kringle domains and exposed COOH-terminal lysines in the receptor molecules.

Receptors for Plg have been detected on the surface of all types of leukocytes, platelets and on other types of somatic cells. Activation of cell-bound Plg generates localized pericellular proteolytic activity that may favor cell

* Corresponding author. Tel.: +55-21-2587-6380; fax: +55-21-2587-6476.

E-mail address: mcplot@uerj.br (M.C. Plotkowski).

migration in a number of physiological and pathological processes, such as embryonal development, inflammation, wound healing and metastatic invasion of basement membranes by cancer cells [3].

Although Plg in solution is poorly susceptible to host activators, immobilization on fibrin clots or on eukaryotic cell surfaces is associated with conformational changes, with increased susceptibility to PA-mediated activation and with increased resistance to the physiological inhibitors α 2-AP and α 2-M.

Recently, it became evident that several Gram-positive and Gram-negative invasive pathogens also exhibit Plg receptors (reviewed in Ref. [4]). Activation of Plg bound to bacterial surface is supposed to enhance virulence by turning bacteria into proteolytic organisms. A microorganism with plasmin bound to its surface is likely to escape easily from a fibrin network that serves to contain a focus of infection. Immobilized plasmin may also favor the degradation of extracellular matrix (ECM) proteins, facilitating the bacterial invasiveness [5].

In this report, we described Plg binding to different strains of *P. aeruginosa* isolated from infected patients and from asymptomatic carriers and demonstrated that the binding is mediated by nonpilus adhesins from the bacterial outer membranes. Bound Plg could be converted to active plasmin on the surface of *P. aeruginosa* cells. We also showed that bacterial migration through fibrin and Engelbreth–Holm–Swarm (EHS) reconstituted basement membrane matrices was greatly enhanced by the presence of surface-associated plasmin. Based on these results we speculate that the formation of surface-associated plasmin may enhance *P. aeruginosa* invasiveness through host tissues.

2. Results

2.1. Plg capture

A number of *P. aeruginosa* strains were tested for their ability to bind Plg by a modified enzyme-linked immunosorbent assay [6] in which microtiter wells coated with the different isolates were exposed to Plg and to anti-Plg antibodies. The results obtained are exhibited in Fig. 1 as the percentage of the $A_{490\text{ nm}}$ detected in microtiter wells coated with Plg (positive control; 1.735 ± 0.3), normalized as 100%. Mean uptake value detected in wells uncoated with bacteria but coated with BSA (negative control) represented $10.4 \pm 0.3\%$ of the $A_{490\text{ nm}}$ detected in positive control wells. All strains isolated from stools of asymptomatic carriers and from blood of septicemic patients reacted substantially with Plg, with uptake values ranging from 95.7 ± 8.6 to $77.5 \pm 5.2\%$ and from 91.5 ± 9.1 to $68.4 \pm 8.1\%$ for stool and blood isolates, respectively. Bacterial isolates from blood and stools did not differ from each other in their ability to bind Plg, as determined by

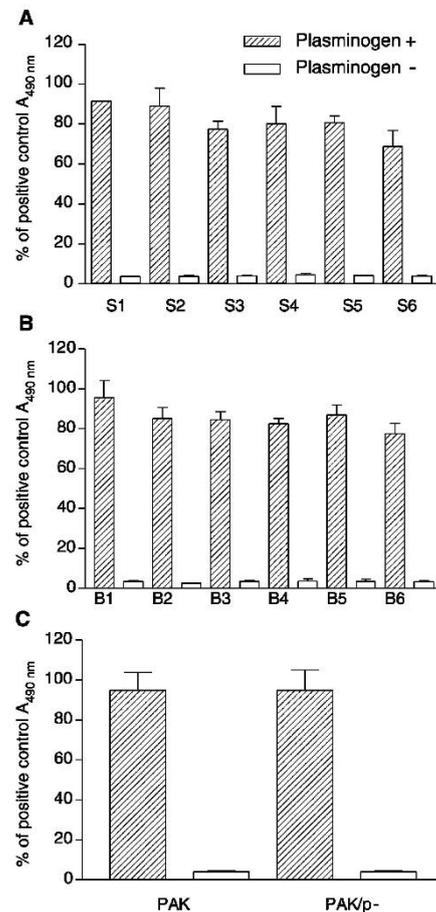


Fig. 1. Binding of Plg to *P. aeruginosa* isolates from stools of asymptomatic carriers (A) and blood of septicemic patients (B) and to laboratory pilated PAK and nonpilated PAK/p- strains (C). Figures show the percentage of the $A_{490\text{ nm}}$ obtained in microtiter wells coated with the different isolates, setting the $A_{490\text{ nm}}$ obtained in wells coated with Plg as 100%. Data represent mean values \pm SEM of two assays carried out in triplicate.

a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett test. No difference in Plg binding was observed between the pilated strain PAK ($94.9 \pm 8.8\%$) and the isogenic non-piliated mutant PAK/p- ($95.0 \pm 10.0\%$; Fig. 1C). The surface structures of bacteria are known to interfere with their binding to solid surfaces [7]. To ascertain that the microtiter wells coated with PAK and PAK/p- contained similar amount of bacterial cells, wells were submitted to mild detergent treatment, to desorb bound bacteria, and the content of each well was plated to determine the concentration of adherent bacteria. Since no

difference in the number of adherent microorganisms was detected between PAK ($7.5 \times 10^4 \pm 1.8$ CFU/well) and PAK/p- ($5.9 \times 10^4 \pm 3.5$ CFU/well), our finding that these two strains did not differ from each other in their ability to bind Plg was taken as an evidence that Plg capture by *P. aeruginosa* is not mediated by pili. The Plg specific binding to the surface of *P. aeruginosa* cells was further substantiated by the immunoperoxidase staining of Plg-treated bacteria (data not shown). Plg bound to bacteria after an incubation period as short as 10 min, and the binding increased substantially with time (Fig. 2A). ϵ -Aminocaproic acid (EACA), a lysine analog known to inhibit Plg uptake by various bacteria [5], was a very efficient inhibitor of Plg capture by PAK and PAK/p- *P. aeruginosa* (Fig. 2B), suggesting that the binding is specific and that the lysine-binding sites of the Plg kringle domains are involved in the bacteria-Plg interaction. This is of importance because α 2-AP, the main physiological inhibitor of plasmin, also binds to the lysine-binding sites of kringle domains 1-3.

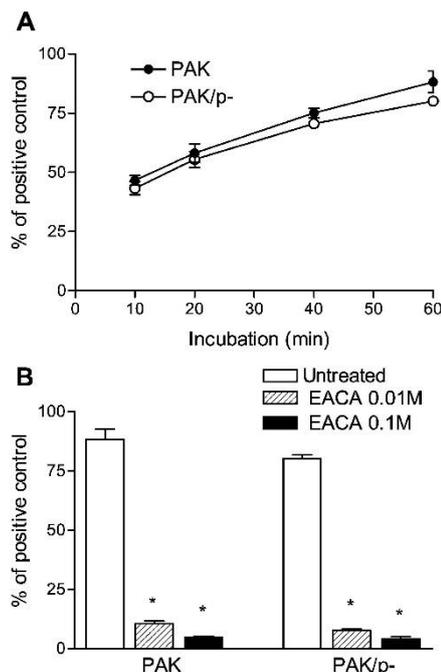


Fig. 2. Kinetics of the Plg capture by pilated PAK and nonpilated PAK/p- *P. aeruginosa* strains (A) and effect of the lysine analogue EACA in Plg capture by PAK and PAK/p- strains (B). Figures show the percentage of the $A_{490\text{ nm}}$ obtained in microtiter wells coated with the different strains, setting the $A_{490\text{ nm}}$ obtained in wells coated with Plg as 100%. Data represent mean values \pm SEM of two assays carried out in triplicate. * $P < 0.001$ when data obtained in the presence of EACA were compared with those from untreated wells.

Therefore, *P. aeruginosa*-bound Plg is likely to be protected from α 2-AP binding and from host regulation.

2.2. Multiple polypeptides from *P. aeruginosa* outer surface bound Plg

Since no association between the expression of pili and Plg capture could be established, we next investigated the role of proteins from the bacterial outer surface (OSPs) as receptors for Plg through the analysis of bacterial extracts by SDS-PAGE and Western blotting. When polyacrylamide gels were stained with Coomassie blue, bacterial extracts exhibited a complex array of polypeptide chains, with molecular masses ranging from ≈ 24 to 120 kDa

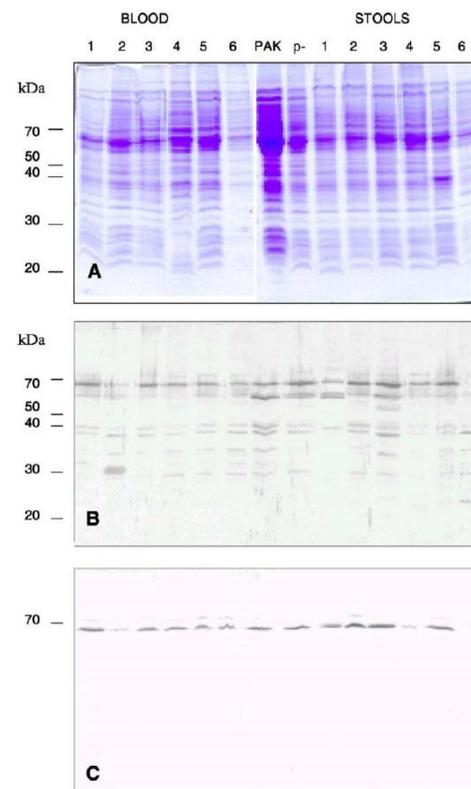


Fig. 3. Interaction of bacterial outer surface proteins (OSPs) with Plg. (A) Coomassie blue stained SDS-PAGE analysis of polypeptides from the outer surface of the different *P. aeruginosa* isolates. (B) Western blotting analysis of the binding of biotinylated-Plg to the bacterial polypeptides. Note that OSPs from all isolates exhibit only minor differences in their Plg-reactive profiles. (C) Negative controls in which the incubation of nitrocellulose sheets with biotinylated Plg was omitted. Molecular masses are indicated on the left in kilo daltons.

(Fig. 3A). Western blot analysis with biotinylated Plg showed that OSPs isolated from PAK, PAK/p- and the different clinical isolates exhibited only minor differences in their Plg-reactive profiles (Fig. 3B). All strains exhibited several reactive low molecular weight proteins, with molecular mass ranging from 30 to 40 kDa. Most strains exhibited also a ≈ 65 –68 kDa reactive doublet. With the exception of the 68 kDa polypeptide, no other band appeared when the incubation with biotinylated Plg was omitted and the nitrocellulose membranes were incubated only with the streptavidin–HRP complex (Fig. 3C). This result indicated that the reaction was dependent on the previous interaction of blotted proteins with Plg. No band was seen when blots were incubated with biotin instead of biotinylated Plg or when blots were incubated with Plg in the presence of 0.1 M EACA (data not shown). These results further confirmed the specificity of the reaction and the role of lysine residues in Plg binding to *P. aeruginosa*.

2.3. Conversion of Plg to plasmin on the surface of bacterial cells

To determine whether Plg-bound to *P. aeruginosa* could be converted to enzymatically active plasmin, bacteria-coated microtiter wells were treated successively with Plg, with urokinase (uPA +) or PBS (uPA -) and finally with a plasmin synthetic substrate (Chromozym PL). After incubation, the hydrolysis of the substrate was measured spectrophotometrically. Controls were run without uPA and Plg, to assess a direct bacterial degradation of the substrate. As shown in Fig. 4, most uPA-treated bacteria exhibited a mild ability to cleave the chromogenic substrate, generating significantly higher amounts of colored products than those generated in wells uncoated with bacteria but treated with Plg, uPA and the Plg substrate (negative control; $A_{405\text{ nm}} = 0.170 \pm 0.020$). For most isolates, the plasmin activity generated by uPA + bacteria was significantly higher than the activity generated by uPA - microorganisms. Two bacterial isolates, one from blood (B6) and the other from stools (S4), exhibited a marked capability to generate plasmin in the absence of uPA similar to the capability of uPA-treated bacteria, suggesting these isolates may contain an intrinsic Plg activator that could convert the zymogen into the active enzyme. Work to test this hypothesis and characterize this activity is in progress.

2.4. Plasmin-coated *P. aeruginosa* exhibited *in vitro* enhanced invasiveness

To ascertain whether bound plasmin may contribute to bacterial invasiveness, PAK *P. aeruginosa* untreated or treated successively with Plg and streptokinase, to generate proteolytic activity at the surface of bacterial cells, were inoculated in Millicell-PCF inserts covered with fibrin gels. After different incubation periods, samples collected from the wells containing the inserts were diluted and plated, to

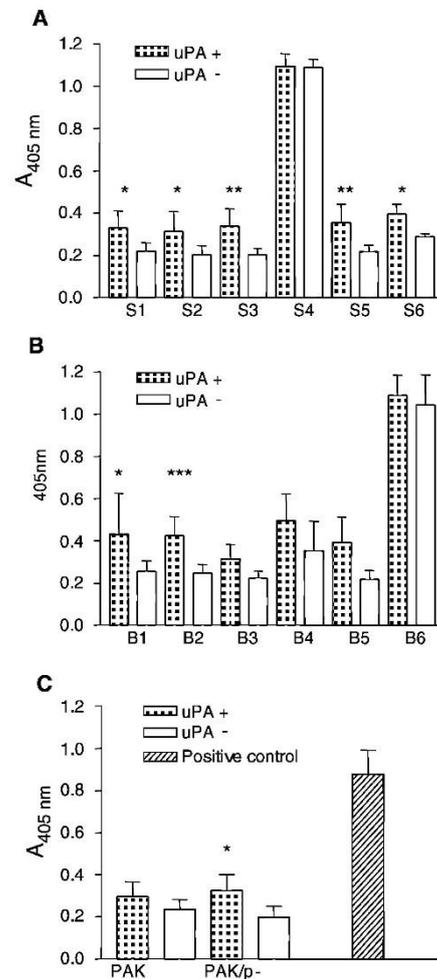


Fig. 4. Conversion of Plg to plasmin on the surface of *P. aeruginosa* isolates from stool (A) and blood (B) and on the surface of reference strains (C), in the presence (uPA +) or in the absence (uPA -) of exogenous uPA. Positive control represents the $A_{405\text{ nm}}$ obtained in microtiter wells coated with Plg after incubation with uPA and the chromogenic substrate. Data represent mean values \pm SEM of six assays carried out in duplicate. $P < 0.05$ (*), 0.01 (**), and 0.001 (***) when data obtained with uPA + bacteria were compared with those from uPA - bacteria.

assess bacterial penetration through the gels. As shown in Fig. 5A, the bacterial concentrations in the microtiter wells containing inserts infected with Plg-treated PAK strain (Plg +) were significantly higher than the concentrations detected in wells containing inserts inoculated with untreated bacteria (Plg -). Similar results were obtained

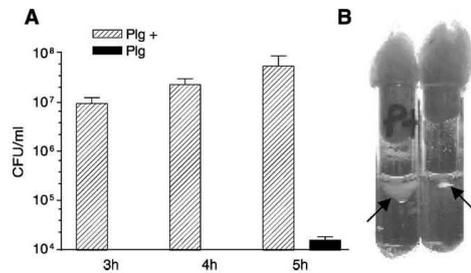


Fig. 5. Matrix penetration by plasmin-coated bacteria. Data in (A) represent the concentration of Plg-treated (Plg +) and PBS-treated (Plg -) PAK *P. aeruginosa* detected in microtiter wells containing fibrin-coated Millicell-PCF inserts, after different incubation periods. (B) Light micrograph of fibrin gels contained in glass tubes stab-inoculated with plasmin-coated (P +) and uncoated bacteria, after 3 h incubation period. Arrows show the diffuse and localized bacterial growth in tubes inoculated with Plg- and PBS-treated bacteria, respectively. Data in (A) represent means values \pm SEM obtained in a typical assay carried out in triplicate.

with inserts covered with the EHS reconstituted basement membrane matrix. The bacterial concentrations detected at 4 h post-infection in microtiter wells containing inserts infected with Plg + bacteria ($1.3 \pm 0.3 \times 10^4$ CFU/ml) were significantly higher than in wells containing untreated microorganisms ($7.2 \pm 0.2 \times 10^2$ CFU/ml). To further investigate the advantage conferred by plasmin to bacterial penetration of fibrin matrices, plasmin-coated and uncoated bacteria were stab-inoculated in the upper surface of fibrin gels contained in glass tubes. After 3 h of incubation, diffuse bacterial growth was seen away from the site of inoculation in gels inoculated with plasmin-coated bacteria whereas in gels inoculated with uncoated microorganisms, growth was seen only at the site of inoculation (Fig. 5B).

3. Discussion

Proteolytic activity of infecting agents is an important factor in the pathogenesis of infectious diseases contributing to local damage of host tissues, microbial spread through tissue barriers and metastasis into secondary infection sites [8].

P. aeruginosa produces aggressive metalloproteases that are highly active against collagenous and non-collagenous proteins of ECM [1]. However, the production of these proteases depends upon *quorum sensing*, that allows the bacterial community to modulate gene expression in accordance with cell density [9]. At the beginning of the infectious processes, when *P. aeruginosa* finds itself within its host at a low cell density and does not initiate the elaboration of their own protease, the interaction with components of protease-dependent cascade pathways of their hosts can confer upon bacteria the ability to escape easily from a fibrin network and hydrolyse matrix proteins, permitting their spread through connective tissues.

A number of pathogenic bacteria have binding sites for human Plg [4]. Since plasmin-derived surface protease activity allows both normal and tumor cells to cross tissue barriers and invade tissues [10], it has been postulated that the ability to bind Plg might correlate with the bacterial invasive potential as well.

In the beginning of the years 90 Ullberg et al. [11] demonstrated that 70% of 10 *P. aeruginosa* isolates bound ¹²⁵I-labeled Plg. A single Plg receptor was detected, with affinity reported to be 1–2 orders of magnitude higher than the affinity of receptors detected on eukaryotic cells. However, this receptor was not characterized on the molecular level and the effects of Plg capture on bacterial virulence had not yet been established. Therefore, the purpose of this study was to further investigate the interaction of *P. aeruginosa* with Plg.

Our data established that all blood and stool *P. aeruginosa* isolates, as well as the type collection PAK and PAK/p- strains bound Plg, suggesting that affinity for Plg might be a stable genetic bacterial property. This finding is in tone with a recent study showing that clinical and environmental *P. aeruginosa* possess a highly conserved genome [12]. Plg bound to the surface of all *P. aeruginosa* isolates was activated by exogenous uPA and plasmin that was generated on the surface of the bacteria cells retained its bioactivity.

P. aeruginosa is known to produce several different adhesions (reviewed in Ref. [13]) and this large repertoire of ligands may confer a great degree of plasticity and adaptability in its interaction with the host. Among these adhesins, pili seem to be one of the most important. Since in most Gram-negative bacteria, pili and flagella form a major class of Plg receptor molecules [4], we first evaluated the role of pili in *P. aeruginosa* interaction with Plg by comparing the Plg capture by a nonpiliated strain with that of its piliated parental strain. Both bacteria bound Plg similarly, suggesting the existence of a nonpilius ligand. To characterize *P. aeruginosa* nonpilius Plg ligand(s), we examined the interaction of electrophoretically separated proteins from the surface of all bacterial strains, obtained by mild detergent extraction, with biotin-labeled Plg. All strains exhibited several reactive low molecular weight proteins, with molecular mass ranging from 30 to 40 kDa. Multiple Plg-binding low molecular weight cell surface proteins have also been detected in other human pathogens. *Borrelia burgdorferi* has been shown to bind Plg via a 20–22 kDa [14] and a \approx 31 kDa [15] cell surface protein. *Mycobacterium tuberculosis* exhibits four Plg-reactive cell wall proteins of 30–66 kDa [16] whereas two Plg-reactive peptides of \approx 32 and 55 kDa were detected in cell extracts of *Mycoplasma fermenta* [17].

A key requirement of the pathways leading to bacterial escape from a fibrin network is that the bacteria-associated enzyme functions in the presence of host physiological inhibitors [18]. In preliminary studies, the treatment of Plg-coated *P. aeruginosa* isolates with human plasma, which

contain high concentrations of the plasmin inhibitors α 2-macroglobulin (2.5 mg/ml) and α 2-antiplasmin (60–70 mg/ml) [3], had no effect on the degradation of the plasmin chromogenic substrate (data not shown). This result suggests that once generated on the surface of bacterial cells, plasmin was protected from inhibition, probably because the lysine binding site used for cell adhesion was identical or in close proximity to the site targeted by the plasmin inhibitors, as reported for other microorganisms [19].

Taken together, our results suggest that *P. aeruginosa*, by capturing and activating host Plg in the infected host may acquire a selective advantage for crossing tissue barriers and causing disseminated infections. However, the full range of biologic consequences of our observations is yet to be defined.

As *P. aeruginosa* usually enters the host at a site of tissue injury and local inflammation, it is conceivable that Plg can be bound shortly after entry of the organisms and subsequently converted to plasmin by activators released in the inflammatory focus or by endogenous activator, favoring the bacterial invasiveness. *P. aeruginosa* elastase is known to inactivate human proteinase inhibitors [20]. The combined ability of bacteria to create proteolysis, to inactivate protease inhibitors and to adhere to target molecules of proteolysis may significantly enhance bacterial migration in the body (4).

4. Material and methods

4.1. Bacterial strains and culture conditions

Piliated *P. aeruginosa* and the pilus-lacking isogenic PAK/p- strains, constructed by gene replacement, were kindly provided by Dr Parenchych (University of Alberta, Canada). The other strains used have been freshly isolated from blood of septicemic patients or from stools of asymptomatic carriers. Bacteria were grown overnight at 37 °C in Trypticase Soy Broth (Difco Laboratories), harvested by centrifugation and resuspended in 0.1 M carbonate buffer (pH 9.6) or in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) to $A_{660\text{ nm}} = 0.1$, corresponding to 10^8 CFU/ml. Bacterial concentration was confirmed by quantitative culture on Trypticase Soy Agar (Difco).

4.2. Plg binding assays

Bacterial suspensions in carbonate buffer (100 μ l per well) were used to coat the wells of polystyrene microplates (Polysorp, Nunc). Following overnight incubation at 4 °C, the wells were rinsed once with 200 μ l of PBS containing 0.05% (v/v) Tween 20 (Sigma Chemical Corp.; PBS-T) and incubated with 2% bovine serum albumin (BSA; Sigma A7030) in carbonate buffer for 2 h at room temperature. Thereafter, wells were washed three times with 200 μ l of PBS-T and incubated with

Plg (Sigma) at 25 μ g/ml in PBS-T containing 1% BSA (PBS-T–1% BSA). Following incubation for different periods at 37 °C, the wells were rinsed three times with 200 μ l of PBS-T and successively incubated for 1 h with an anti-Plg antibody (Calbiochem) at 1:2500 in PBS-T–BSA and with an anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate (Sigma) at 1:5000 in PBS-T–BSA. Peroxidase activity was revealed with hydrogen peroxide and *O*-phenylenediamine (OPD). The enzymatic reaction was stopped with HCl and read spectrophotometrically at 490 nm. The Plg binding was expressed as the percentage of the $A_{490\text{ nm}}$ of positive control wells that were coated with Plg at 25 μ g/ml in carbonate buffer, quenched with 2% BSA in carbonate buffer and incubated successively with the anti-Plg antibody, with the anti-rabbit IgG-peroxidase complex and with OPD. In negative controls, (i) the Plg addition to bacteria-coated wells was suppressed or (ii) Plg was incubated with wells uncoated with bacteria but coated with BSA in carbonate buffer.

To assess the participation of lysine residues in Plg binding to *P. aeruginosa*, incubation of bacterial cells with Plg was also done in the presence of 0.01 and 0.1 M ϵ -aminocaproic acid (EACA; Sigma), a lysine analog.

4.3. Bacterial desorbing assay

The surface properties of bacteria are known to interfere with their binding to solid surfaces. To ascertain that similar amount of cells of PAK and PAK/p- strains bound to the microtiter wells, 100 μ l of PAK and PAK/p- suspensions in sterile carbonate buffer were added to microtiter wells. Following overnight incubation at 4 °C, the wells were washed five times with sterile PBS-T, to remove unbound bacteria, and treated for 30 min at room temperature with 100 μ l of 0.5% Triton X-100 in sterile PBS, to desorb adherent bacteria. The content of each well was mixed, diluted and plated to determine the concentration of adherent bacteria.

4.4. Plg activation assay

Microtiter wells were coated with *P. aeruginosa* cells in carbonate buffer, and incubated with Plg at 25 μ g/ml in PBS-T–1% BSA, as described above. Following 1 h at 37 °C, the wells were rinsed three times with 200 μ l of PBS-T and incubated with 100 μ l of uPA (Sigma) at 10 μ g/ml in PBS for 1 h at 37 °C. Following three washes with PBS-T, the bacteria-coated wells were exposed to 100 μ l of the plasmin chromogenic substrate Chromozym PL (tosylglycyl-prolyl-lysine-4-nitranilide acetate; Roche Diagnostic) at 500 μ M. After incubation at 37 °C for 24 h, the hydrolysis of the substrate, resulting in the formation of 4-nitroaniline, was measured spectrophotometrically at 405 nm. Controls were run without uPA, to assess an intrinsic bacterial ability to activate Plg, and without uPA and Plg, to assess a direct bacterial degradation of the substrate.

4.5. Interaction of bacterial outer surface proteins with Plg

To investigate whether nonpilus ligands with affinity for Plg are proteins from the outer membranes of *P. aeruginosa* cells, bacterial outer surface proteins (OSPs), extracted as described by Carnoy et al. [21], were analysed by SDS–PAGE with a Minigel system (Mini-Protean II; BioRad Laboratories) under non-reducing conditions. The 10-kDa protein ladder calibration kit (Gibco BRL) was used as a protein size standard. After electrophoresis, proteins were electrotransferred to nitrocellulose sheets (Immobilon N; Millipore Corporation). Nitrocellulose replicas were incubated overnight at 4 °C in PBS-T–2% BSA, washed once with PBS-T and incubated for 1 h at room temperature with biotin-labeled Plg, prepared as described by Temyck and Avrameas [22], and used at a concentration of 2.5 µg/ml in PBS-T–1% BSA. The blots were washed four times for 10 min each with agitation and exposed to a streptavidin–peroxidase complex (Amersham) at 1:2500 in PBS-T–1% BSA for 30 min at room temperature. Binding of Plg to bacterial OSPs was detected by developing the reactive bands with a solution containing imidazole (Sigma), hydrogen peroxide and 3,3 diaminobenzidine (Sigma) at 0.1%. In negative controls, the incubation of nitrocellulose sheets with biotinylated Plg was omitted.

4.6. Bacterial coating with active plasmin

PAK *P. aeruginosa* grown overnight in TSB were harvested by centrifugation, resuspended in PBS to $A_{660\text{ nm}} = 0.4$ and treated successively for 1 h with Plg at 25 µg/ml and with streptokinase (Sigma) at 100 U/ml in PBS. After centrifugation, bacterial pellets were resuspended in PBS containing 10 mM EDTA, to inhibit the activity of *P. aeruginosa* metalloproteases. Control bacteria, untreated with Plg and streptokinase, were also suspended in EDTA-containing PBS.

4.7. Matrix penetration by plasmin-coated bacteria

Two different approaches were used to investigate whether active plasmin bound to bacterial surface would confer invasive ability to bacterial cells. In the first, 300 µl of fibrinogen (Sigma) at 3 mg/ml and thrombin (Sigma) at final concentration of 10 U/ml were pipetted onto the membranes of culture chamber Millicell-PCF inserts (12 mm diameter; 3 µm pore size; Millipore). After gelling overnight at 37 °C, 100 µl of the plasmin-coated or uncoated bacterial suspensions, prepared as described above, were pipetted on the fibrin gels whereas 100 µl of PBS were added to the microplate wells containing the fibrin-coated culture chamber inserts. Three samples of 10 µl, collected from each bottom wells at 1 h intervals during 5 h incubation period at 37 °C, were serially diluted and plated on Cled agar, to assess bacterial penetration through the fibrin gels. The limit of detection was

1×10^2 CFU per ml of sample. In a few assays, Millicell inserts coated with 100 µl of an extract of the EHS tumor containing 10 mg of protein/ml were exposed to 100 µl of the plasmin-coated or uncoated bacterial suspensions. In the second approach used to determine the effect of bound plasmin on *P. aeruginosa* invasiveness, 2 µl of the suspensions of plasmin-coated and uncoated bacteria in EDTA-containing PBS were stab-inoculated, with a micro-pipette, in the upper 2 mm of fibrin gels contained in glass tubes. The tubes were observed after different incubation periods at 37 °C.

4.8. Statistical analysis

Differences between means were determined by the Mann Whitney test, unless otherwise indicated. A *P* value of <0.05 was considered significant.

Acknowledgements

This research was supported by grants # E26/171.900/00 from FAPERJ and # 470 097/01-9 from CNPq (Brasil). RB was supported by a fellowship from CNPq.

References

- [1] Parmely MJ. *Pseudomonas* metalloproteases and the host–microbe relationship. In: Fick RB, editor. *Pseudomonas aeruginosa: the opportunist. Pathogenesis and disease*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1993. p. 80–94.
- [2] Ziegler EJ, Douglas H. *Pseudomonas aeruginosa* vasculitis and bacteremia following conjunctivitis: a simple meted of fatal *Pseudomonas* infection in neutropenia. *J Infect Dis* 1979;139: 288–96.
- [3] Saksela O, Rifkin DB. Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annu Rev Cell Biol* 1988;4: 93–126.
- [4] Lähdenmäki K, Kuusela P, Korhonen TK. Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol Rev* 2001;25:531–52.
- [5] Lottenberg R, Minning-Wenz D, Boyle MDP. Capturing host plasmin(ogen): a common mechanism for invasive pathogens? *Trends Microbiol* 1994;2:20–4.
- [6] Plotkowski MC, Tournier JM, Puchelle E. *Pseudomonas aeruginosa* strains possess specific adhesions for laminin. *Infect Immun* 1996;64: 600–5.
- [7] O'Toole G, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 1998;30:295–304.
- [8] Travis J, Potempa J, Maeda H. Are bacterial proteinases pathogenic factors? *Trends Microbiol* 1995;3:405–7.
- [9] Kievit TR, Iglewsky B. Bacterial quorum-sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun* 2000;68:4839–49.
- [10] Blasi F. Molecular mechanisms of protease-mediated tumor invasiveness. *J Surg Oncol* 1993;Suppl 3:21–3.
- [11] Ullberg M, Kronvall G, Karlsson I, Wiman B. Receptors for human plasminogen on gram-negative bacteria. *Infect Immun* 1990;58:21–5.
- [12] Wolfgang MC, Kulasekara BR, Liang X, Boyd D, Wu K, Yang Q, Miyada CG, Lory S. Conservation of genome content and virulence

- determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:8484–9.
- [13] Plotkowski MC, Bajolet-Laudinat O, Puchelle E. Cellular and molecular mechanisms of bacterial adhesion to respiratory mucosa. Eur Respir J 1993;6:903–16.
- [14] Coleman JL, Sellati TJ, Testa JE, Kew RR, Furie MB, Benach JL. *Borrelia burgdorferi* binds plasminogen, resulting in enhanced penetration of endothelial monolayers. Infect Immun 1995;63:2478–84.
- [15] Fuchs H, Wallich R, Simon MM, Kraemer MD. The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) receptor. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:12594–8.
- [16] Monroy A, Amador A, Ruiz B, Espinoza-Cueto P, Xolalpa W, Mancilla R, Espitia C. Binding and activation of human plasminogen by *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 2000;68:4327–30.
- [17] Yavlovich A, Higazi AAR, Rottem S. Plasminogen binding and activation by *Mycoplasma fermentans*. Infect Immun 2001;69:1977–82.
- [18] Ullberg M, Kuusela P, Kristiansen BE, Kronvall G. Binding of plasminogen to *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* and formation of surface-associated plasmin. J Infect Dis 1992;166:1329–34.
- [19] Lähteenmäki K, Virkola R, Pouitt R, Kuusela P, Kukkonen M, Korhonen TK. Bacterial plasminogen receptors: in vitro evidence for a role in degradation of the mammalian extracellular matrix. Infect Immun 1995;63:3659–64.
- [20] Tournier JM, Jacquot J, Puchelle E, Bieth JG. Evidence that *Pseudomonas aeruginosa* elastase does not inactivate the bronchial inhibitor in the presence of leukocyte elastase. Am Rev Respir Dis 1985;132:524–8.
- [21] Carnoy C, Scharfman A, Van Brussel E, Lamblin G, Ramphal R, Roussel P. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane adhesions for human respiratory mucus glycoproteins. Infect Immun 1994;62:1896–900.
- [22] Temyck T, Avrameas S. Techniques immuno-enzymatiques. Paris: Les Éditions INSERM; 1991. p. 89–101.