

Envolvimento da proteína A purificada e do *Staphylococcus aureus* na patogênese corneana

Purified protein A and Staphylococcus aureus in corneal pathogenesis

Ginaine Farjallah Bazzi ⁽¹⁾
Fabio Prado Sabbag ⁽²⁾
Marcelo Luiz Gehlen ⁽²⁾
Pablo Fabian Aviles Cabrera ⁽²⁾
Luciane Bugmann Moreira ⁽³⁾
Cinthia Oyama Branco ⁽⁴⁾
João Carlos Domingues Repka ⁽⁵⁾
Hamilton Moreira ⁽⁶⁾

RESUMO

Estudou-se a atividade da Mieloperoxidase em ceratite induzida em modelo animal (cobaias). Constitui-se de três grupos com cinco cobaias cada. No primeiro inoculou-se a cepa de *Staphylococcus aureus* DU5723 isenta de Proteína A e Delta-Toxina. O segundo grupo foi inoculado com Proteína A purificada (SIGMA) e o terceiro, grupo controle, foi inoculado com soro fisiológico. Todos os grupos sofreram inoculações intra-estromais com volume constante de 10µl.

Os níveis de atividade da Mieloperoxidase após 25 horas foram mensurados através de método espectrofotométrico, e as graduações de lesões corneanas foram determinadas por análise biomicroscópica a cada 5 horas pós-inoculação, durante 25 horas. Os resultados obtidos demonstram que a Proteína A purificada é um fator de virulência importante, e que a cepa de *Staphylococcus aureus* isenta de Proteína A e Delta-toxina induz lesão corneana em níveis ainda mais elevados. Em ambos os grupos constatou-se Ceratite.

Palavras-chave: Proteína A; *Staphylococcus aureus*; Ceratite infecciosa.

INTRODUÇÃO

Ceratite causada por *Staphylococcus aureus* é problema comum, especialmente em córneas comprometidas ². *Staphylococcus sp* são habitantes comuns da face, narinas e conjuntivas, como microbiota residente e do leito peri-ungueal, como microbiota transitória. Sendo assim, apresentam acesso aos olhos, podendo colonizar o tecido ocular danificado ⁶.

Estudos bacteriológicos quantitativos em córnea infectadas com *S. aureus*, demonstram crescimento logarítmico em 4 a 5 vezes o número de organismos viáveis 24 horas após a inoculação intra-estromal ⁷. As infecções bacterianas por *S. aureus* na córnea apresentam elevado risco em função do processo cicatricial residual

pós-infecção, bem como as alterações inflamatórias decorrentes dos fatores de virulência da cepa infectante ⁹. O *S. aureus* apresenta como fatores de virulência a enzima coagulase, proteína A, toxinas alfa, beta, gama, delta e leucocidinas. Com exceção à coagulase, os demais fatores poderão ocorrer ou não em distintas cepas, propiciando diferentes padrões de virulência quando estiverem relacionados em processos infecciosos ⁶.

A proteína A é uma exoproteína associada à parede celular bacteriana e consiste em uma única cadeia polipeptídica que pode ser dividida em duas porções: estrutural e funcional. A porção N terminal tem capacidade seletiva de ligação às imunoglobulinas G humanas. A porção C terminal fixa a Proteína A à parede celular bacteriana.

Trabalho realizado pelas disciplinas de Oftalmologia e Imunologia da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná.

⁽¹⁾ Médica residente de Oftalmologia do Hospital Evangélico de Curitiba, formada em 1993, pela FEMPAR.

⁽²⁾ Acadêmicos do 5º ano de Medicina da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná.

⁽³⁾ Oftalmologista colaboradora da disciplina de Oftalmologia da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná, formada em 1992, pela FEMPAR.

⁽⁴⁾ Oftalmologista colaboradora da disciplina de Oftalmologia da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná, formada em 1989, pela FEMPAR.

⁽⁵⁾ Professor Titular da disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná, formado em 1978, pela UEPG.

⁽⁶⁾ Professor Adjunto da disciplina de Oftalmologia da Universidade Federal do Paraná e, Professor Assistente da disciplina de Oftalmologia da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná, formado em 1984, pela UFPR.

Endereço para correspondência: Dr. Hamilton Moreira - Rua Carlos de Carvalho, 1310 - CEP: 80730-200 - Curitiba - Paraná

Uma molécula de Proteína A pode ligar-se a duas moléculas de IgG simultaneamente e então formar complexos similares a antígenos e anticorpos. Desta forma, como os imunocomplexos, a Proteína A - IgG, ativam as vias clássica e alternativa do Sistema Complemento e consequentemente instalam um processo inflamatório².

Entre os efeitos biológicos comumente observados na reação inflamatória observa-se vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, migração de leucócitos e outras células para a área afetada⁶. No decurso da reação inflamatória corneana verificam-se os mesmos fenômenos, sendo ressaltado o influxo de neutrófilos, como atributo secundário da ativação do Sistema Complemento e catabólitos do Ácido Araquidônico^{3,9}. Os polimorfonucleares neutrófilos são células ricas em enzimas proteolíticas, lipases e peroxidases. O vacúolo fagocítico formado, na tentativa de destruir o agente infeccioso, torna-se ativador de ânions superóxidos que por sua vez, ativam a enzima Mieloperoxidase (MPO). Para estimar a extensão da reação inflamatória da córnea, diversos autores relatam a quantificação espectrofotométrica da atividade da Mieloperoxidase dos polimorfonucleares neutrófilos^{5,10}.

O presente estudo tem por objetivo verificar a reação inflamatória corneana induzida por uma cepa de *Staphylococcus aureus* livre de Proteína A e Delta-toxina, em comparação aos efeitos induzidos pela Proteína A purificada.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento Experimental

Realizou-se inoculação intra-estromal de cepa de *Staphylococcus aureus* livre de Delta-toxina e Proteína A em cinco cobaios. Em outros cinco animais inoculou-se a Proteína A isolada. O grupo controle recebeu injeção intra-estromal de soro fisiológico a 0,9% em 5 cobaios.

Este modelo experimental foi avaliado por observações biomicroscópicas sequenciais a cada 5 horas após indução, em estudo Duplo-cego, constituído por 3 observadores. Após retirada e homogeneização das córneas realizou-se a determinação espectrofotométrica da atividade da mieloperoxidase corneana 25 horas após a indução.

Animais Utilizados

Utilizou-se 15 cobaios (*Cavia porcella*), albinos procedentes do Biotério do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), com idade média de 100 dias, pesando \pm 50g.

Staphylococcus aureus não portador de Proteína A e Delta-toxina

Fez-se uso da cepa DU5723, oriunda da coleção do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná.

A amostra foi cultivada em Caldo Caseína Soja (BIOBRÁS), por 24 horas a 35°C. A seguir, foi repicada para placas de Petri com Agar Caseína Soja (BIOBRÁS), e incubados por 18 horas a 35°C. O inóculo foi preparado a partir de colônias isoladas, previamente identificadas e ressuspendidas em solução fisiológica esterilizada. O inóculo continha 10⁷ Unidades Formadoras de Colônias, (UFC)ml, tendo sido inoculados 10 μ l (10⁵ UFC) por via intra-estromal no olho direito de todos os cinco cobaios.

Proteína A

Utilizou-se o inóculo da Proteína A a partir do extrato da cepa Cowen (SIGMA P.8143), a 8 μ g/10 μ l, inoculados no olho direito de cada um dos cinco cobaios.

Soro fisiológico

Utilizou-se para grupo controle, inoculação de 10 μ l de soro fisiológico a 0,9% intraestromal.

Inoculação intra-estromal

Anestesiou-se os animais por inala-

ção de éter sulfúrico, e a inoculação foi realizada sob microscópio (D.F.VASCONCELOS) com objetiva de 40 aumentos. Todos os animais receberam inóculos de 10 μ l, através de seringa de 0,25ml (BECTON-DICKINSON) e agulhas 13x4,5mm. Durante a realização da inoculação, tencionou-se sempre que o trajeto da agulha fosse o mais longo possível, desde a córnea periférica trafegando através do estroma até a área central. A profundidade da injeção não foi controlada com nenhum instrumento especial, porém pretendeu-se realizá-la ao mesmo nível no meio do estroma. A retirada da agulha foi sempre lenta para favorecer o colapso do tecido ao redor, evitando o vazamento retrógrado do líquido.

Avaliação da atividade da Mieloperoxidase (MPO)

Foi realizada determinação espectrofotométrica da atividade da MPO corneana após 25 horas da inoculação. Adotou-se o método descrito por WILLIAMS¹⁰, que consiste nas seguintes etapas:

- Homogeneização das córneas em 2,9ml de tampão Brometo de hexadeciltrimetilamônio a 0,5% em tampão fosfatos 50mM pH6,0, por 30 segundos.

- Ultra-sonificação da emulsão por 3 repetições de 10 segundos com um minuto de intervalo à temperatura de 2°C.

- Centrifugação dos homogenatos por 15 minutos a 40.000xg em centrífuga Sorval RC5B a 2°C.

- Retirou-se 100 μ l do sobrenadante onde foram adicionados 2,9ml de tampão fosfatos 50mM pH6,0 acrescido de 0,167mg/ml de 0-Dianisidina (SIGMA), peróxido de hidrogênio (MERCK) a 0,0005%.

- Transferiu-se 150 μ l da solução anterior para um orifício da placa de Terazaki em duplicatas para cada amostra e leu-se a Densidade Óptica a 450nm de comprimento de onda frente ao branco, que foi preparado conforme as etapas anteriores, sendo substituídos os 100 μ l da amostra homogeneizada por 100 μ l

de solução fisiológica.

- Utilizou-se leitor de microplacas BIOTEK-BT100 para obter as Densidades Ópticas.

Análise Biomicroscópica

A análise foi realizada por 3 observadores em estudo Duplo-cego a cada 5 horas por 25 horas a partir da inoculação. Adotou-se os critérios de avaliação de irritação ocular segundo a escala McDONALD-SHADDUCK⁸, onde os seguintes itens foram observados: congestão conjuntival, edema conjuntival, secreção conjuntival, efeito Tyndall, envolvimento da íris, nebulosidade da córnea, superfície da córnea atingida, pano e fluoresceína, graduados em níveis crescentes de 0 a 4 de acordo com a intensidade.

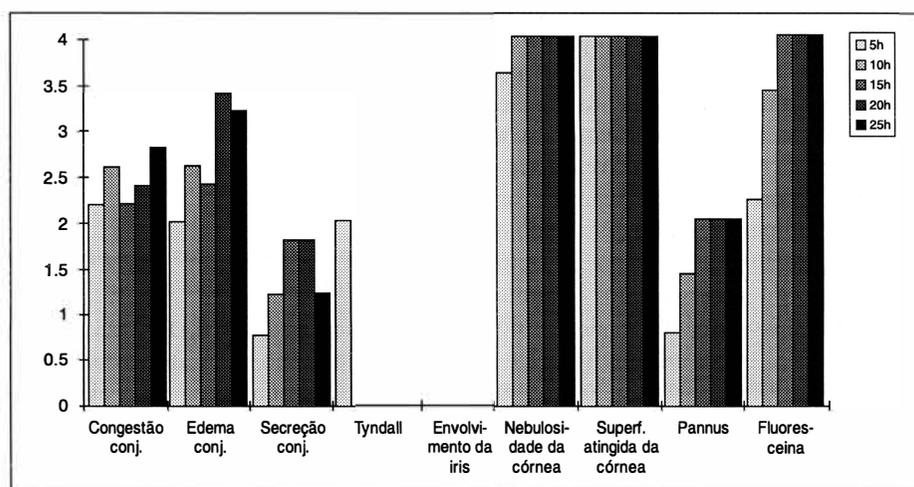
DISCUSSÃO

O gênero *Staphylococcus sp* contém espécies habilitadas ou não à indução de processos patológicos, que

por sua vez estão intrinsicamente relacionadas a peculiaridades da célula bacteriana como: adesão às células do hospedeiro, opsonização, ativação do Sistema Complemento e liberação de toxinas, elementos esses que em conjunto denominam-se fatores de virulência. Algumas cepas de *S. aureus*

possuem em seus revestimentos a Proteína A, que tem sido descrita como um fator de virulência importante quando o local de colonização bacteriana é a córnea.

CALLEGAN et al. demonstraram a capacidade virulenta de cepas mutantes que continham ou não a Proteína A,



Avaliação biomicroscópica da irritação ocular conforme escala de McDonald-Shadduck durante o período de 25 horas pós-inoculação intra-estromal de suspensão de *S. aureus* em cobaias.

TABELA 1

Avaliação Biomicroscópica da irritação ocular conforme escala de McDONALD-SHADDUCK⁸ durante o período de 25 horas pós-inoculação intra-estromal de Proteína A purificada, suspensão de *Staphylococcus aureus* e solução fisiológica em cobaias:

Critério para Avaliações	Avaliação por grupo de animais a cada 5 horas														
	Proteína A					<i>Staphylococcus aureus</i>					Controle				
	5	10	15	20	25	5	10	15	20	25	5	10	15	20	25
Congestão conjuntival	1,25 ±0,50	1,25 ±0,50	1,50 ±1,00	1,50 ±0,57	1,00 0	2,20 ±0,83	2,60 ±0,54	2,20 ±0,44	2,40 ±0,89	2,80 ±0,44	0	0	0	0	0
Edema conjuntival	1,25 ±1,25	1,25 ±0,50	1,25 ±0,50	1,75 ±0,50	1,00 0	2,00 ±0,70	2,60 ±0,54	2,40 ±0,54	3,40 ±0,54	3,20 ±0,83	0	0	0	0	0
Secreção conjuntival	1,00 ±0,81	1,25 ±0,50	1,00 ±1,41	0,75 ±0,95	0,75 ±0,50	0,75 ±0,44	1,20 ±1,09	1,80 ±1,09	1,80 ±1,64	1,20 ±0,89	0	0	0	0	0
Tyndall	0,50 ±1,00	0,50 ±0,57	0	0	0	2,00 ±1,00	*	*	*	*	0	0	0	0	0
Envolvimento de íris	0	0	0	0	0	0	*	*	*	*	0	0	0	0	0
Nebulosidade da córnea	1,25 ±1,25	0,50 ±0,57	0,50 ±0,57	0,50 ±0,57	0,50 ±0,57	3,60 ±0,54	4 0	4 0	4 0	4 0	0	0	0	0	0
Superfície atingida da córnea	1,50 ±1,00	0,25 ±0,50	0,25 ±0,50	0,50 ±0,57	0,75 ±0,57	4 0	4 0	4 0	4 0	4 0	0	0	0	0	0
Pannus	0,75 ±0,50	1,00 ±0,81	0,75 ±0,50	0,75 ±0,50	0,75 ±0,50	0,75 ±0,50	1,40 ±0,54	2 0	2 0	2 0	0	0	0	0	0
Fluoresceína	1,60 ±0,89	1,40 ±0,89	1,40 ±0,89	0,20 ±0,44	0,20 ±0,44	2,20 ±0,83	3,40 ±0,54	4 0	4 0	4 0	1 0	0,60 ±0,89	0	0	0

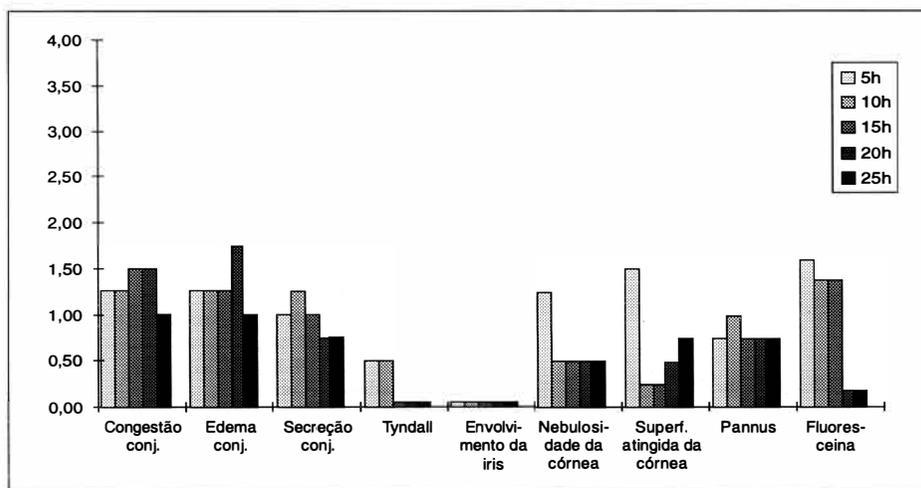
* Leucoma impossibilitando a avaliação.

Os valores estão expressos pela média do grupo e o respectivo desvio padrão.

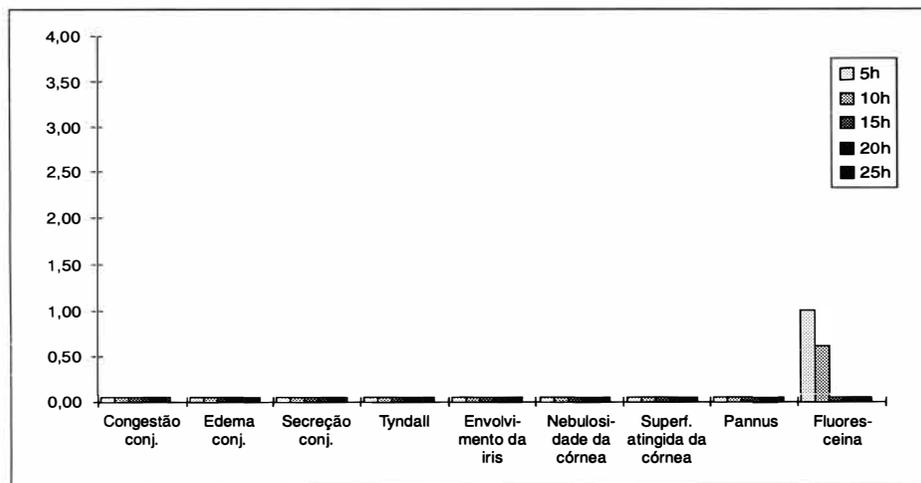
Envolvimento da proteína A purificada e do Staphylococcus aureus na patogênese corneana

TABELA 2
Determinação espectrofotométrica da atividade da Mieloperoxidase em Córnea de cobaias, 25 horas após a indução de processo inflamatório.

Grupo	Número de Animais	Atividade da Mieloperoxidase (Média ± Desvio padrão da densidade óptica a 450nm)
Controle	5	0,32 ± 0,04
Proteína A	5	0,78 ± 0,02
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	1,36 ± 0,08



Avaliação biomicroscópica da irritação ocular conforme escala de McDonald-Shadduck durante o período de 25 horas pós-inoculação intra-estromal de Proteína A purificados em cobaias.



Avaliação biomicroscópica da irritação ocular conforme escala de McDonald-Shadduck durante o período de 25 horas pós-inoculação intra-estromal de Solução Fisiológica em cobaias.

em córnea de coelhos, e concluíram ser a Proteína A o fator desencadeante de alterações importantes no tecido corneano². Da mesma forma o fizeram BRAMLEY et al. com relação à toxina estafilocócica¹ e HARALDSSON et al.

em quadros de mastites⁴.

Na reação inflamatória aguda corneana o primeiro evento é a infiltração de leucócitos polimorfonucleares³. As fontes dos polimorfonucleares envolvidos são os capilares limbares e o filme

lacrimal⁹.

O grupo de animais onde foi inoculado 10⁵ UFC de *S. aureus*/10µl demonstrou alterações mais graves em relação ao grupo da proteína A. Dentre as alterações mais significativas destacaram-se a nebulosidade e superfície da córnea atingida, além da fluoresceína.

Observou-se no grupo *S. aureus* a graduação máxima da escala utilizada (Tabela 1), de acordo com os resultados de CALLEGAN et al e CHUSID et al.

Em nosso estudo, a ação inflamatória da Proteína A demonstrada pela atividade da Mieloperoxidase foi 2,43 vezes superior ao grupo controle (p<0,005), porém 1,74 vezes inferior ao grupo do *S. aureus* (p<0,01). Este fato pode ser associado à sobreposição dos efeitos infecciosos sobre os inflamatórios, culminando com reações teciduais intensas. Podemos observar também que a atividade da MPO no grupo do *S. aureus* em relação ao grupo controle, foi 4,25 vezes superior (p<0,001).

Ficou evidente a participação da Proteína A na patogênese corneana, através da reação inflamatória mensurada pela atividade da mieloperoxidase.

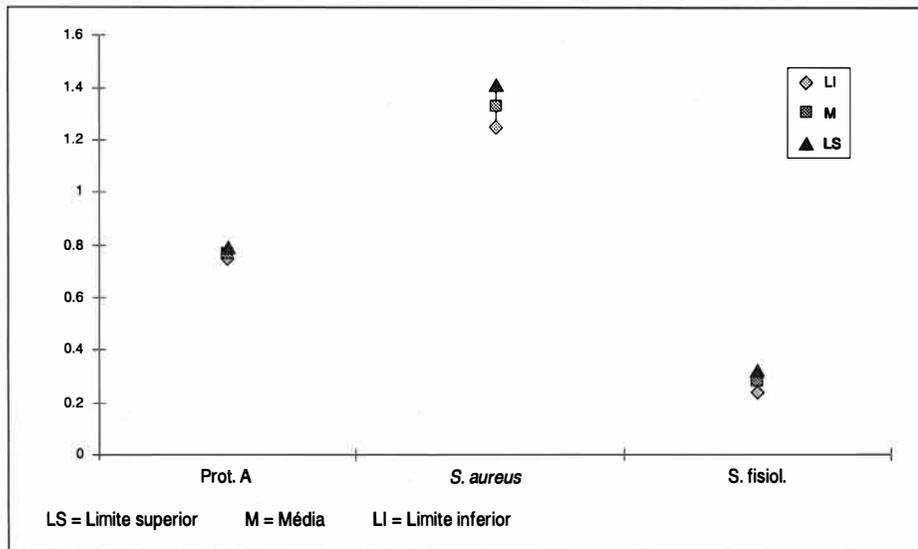
O grupo que recebeu somente *S. aureus* isento de Proteína A e Delta-toxina demonstrou efeito invasivo com danos significativos para o tecido corneano, evidenciando sua capacidade virulenta residual.

Entre os fatores de virulência do *S. aureus*, a Proteína A destaca-se por evocar reações inflamatórias comparáveis as reações inerentes da infecção por *S. aureus*.

SUMMARY

Myeloperoxidase activity in experimental keratitis (Guinea Pigs) was studied. Staphylococcus aureus strain DU 5723 without Protein A nor Delta-toxin (Group A), purified Protein A (SIGMA) (Group B), and vehicle were injected within corneal stroma, with a final

Envolvimento da proteína A purificada e do Staphylococcus aureus na patogênese corneana



Determinação espectrofotométrica da atividade da Mieloperoxidase em córnea de cobaias, 25 horas após a indução do processo inflamatório.

volume of 10µl. Levels of myeloperoxidase activity after 25 hours were measured by spectrophotometric method and the tissue damage was determined by biomicroscopic analysis. These results suggest that purified Protein A and S. aureus without Protein A nor Delta-toxin induces high levels of

tissue damage and both inocula may be mediators of keratitis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRAMLEY, A. J.; PATEL, A. H.; O'REILLEY, M.; FOSTER, T. J. - Roles of alpha toxin and beta-toxin in virulence of *Staphylococcus aureus* of the mouse mammary gland. *Infection and Immunity.*, **57**: 2489-2494, 1989.
2. CALLEGAN, M. C.; ENGELL, L. S.; HILL, J.

- N.; CALLAGHAN, R. J. - Corneal virulence of *Staphylococcus aureus*: Roles of alpha-toxin and Protein A in pathogenesis. *Infection and Immunity.*, **6**: 2478-2482, 1994.
3. CHUSID, M.; DAVIS, S. D. - Polymorphonuclear lymphocyte kinetics in experimentally induced keratitis. *Arch Ophthalmol.*, **103**: 270-274, 1989.
4. HARALDSSON, I.; JONSSON, P. - Histopathology and pathogenesis of mouse mastitis induced with *Staphylococcus aureus* mutants. *J. Comp Pathol.*, **94**: 183-196, 1984.
5. JONSSON, P.; LINDBERG, M.; HARALDSSON, I.; WDASTON, T. - Virulence of *Staphylococcus aureus* in a mouse mastitis model: studies of alpha hemolysin, coagulase and Protein A as possible virulence determinants with protoplast fusion and gene cloning. *Infect Immun.*, **49**: 765-769, 1993.
6. KLEIN, J. - *Immunology*. Blackwell Scientific Publications. Boston Oxford. *Cap.*, 188, 1990.
7. KUPFERMAN, A.; LEIBOWITZ, H. M. - Topical antibiotic therapy of *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. *Arch Ophthalmol.*, **97**: 1699-1702, 1979.
8. McDONALD, T. O.; SHADDUCK, J. A. - Eye Irritation. In: *Advances in Modern Toxicology* vol. 4, 139-191, Washington: Hampshire Publishing Corporation, 1989.
9. MOREIRA, H.; McDONNELL, P. J.; FASANO, A. P.; SILVERMAN, D. L.; COARES, T. D.; SEVAMAN, A. Treatment of experimental *Pseudomonas* keratitis cyclo-oxygenase and Lipoxigenase Inhibitors. *Ophthalmol.* **98**(11): 1693-1697, 1991.
10. WILLIAMS, R.; PATERSON, C. A.; EAKINS, K. E.; BHATTHERJEE, P. - Quantification of ocular inflammation: evaluation of polymorphonuclear leucocyte infiltration by measuring myeloperoxidase activity. *Curr Eye Res.*, **2**: 465-470, 1982.