

PROTEASES EXTRACELULARES PRODUZIDAS POR ISOLADOS AMBIENTAIS E CEPAS PADRÃO DE *ACANTHAMOEBA*

Carolina De Marco Veríssimo¹; Ana Paula Folmer Correa²; Marilise Brittes Rott³

¹Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: caroldmv@yahoo.com.br; ²Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ³Professora orientadora - Laboratório de Parasitologia, Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia – Instituto de Ciências Básicas da Saúde – UFRGS;

Resumo – Considerando-se que o padrão de secreção de proteases extracelulares de diferentes isolados de *Acanthamoeba* pode estar associado ao potencial patogênico do gênero, o objetivo deste trabalho foi verificar a presença de proteases extracelulares produzidas por isolados ambientais de estojos de lentes de contato e cepas padrão de *Acanthamoeba*. Neste estudo foram usadas cepas padrão de *Acanthamoeba* patogênicas, ATCC 30461, e não patogênicas, ATCC 30010 e 30872 e isolados ambientais pré-existentes no Laboratório de Parasitologia – UFRGS, provenientes de estojos de lentes de contato. A partir de cultivos axênicos e monoclonais, obteve-se o meio condicionado (MC) de cada isolado, que foi utilizado para avaliação da atividade proteolítica por SDS-PAGE não desnaturante (zimograma), bem como para determinação de proteínas totais de todos os isolados. Os resultados demonstram que os isolados estudados produzem proteínas extracelulares, parte destas com atividade proteolítica.

Palavras-chave: *Acanthamoeba*; Proteases Extracelulares; Ceratite

Introdução

Dentre as amebas de vida livre (AVL), o gênero *Acanthamoeba* é o mais isolado da natureza (Khan, 2006). AVL deste gênero são isoladas dos mais diversos ambientes, como solo, poeira, fontes naturais de água, reservatórios, água do mar, água de torneira, piscinas, soluções de lentes de contato, ambientes hospitalares, entre outros (Marciano-Cabral & Cabral, 2003; Caumo *et al.*, 2009; Carlesso *et al.*, 2010). Estes protozoários são ditos anfitriões, devido à sua capacidade de existir normalmente como organismos de vida livre, mas serem capazes de sobreviver em tecidos de seres humanos e outros animais, causando doenças como ceratite e encefalite (Visvesvara & Schuster, 2008).

Ceratite amebiana é uma doença progressiva e dolorosa que ameaça a visão, estando associada ao uso de lentes de contato. Seus principais sintomas são vermelhidão, lacrimejamento, fotofobia e edema nas pálpebras, podendo progredir para perda da visão e enucleação (Awwad *et al.*, 2007).

Diversos estudos têm associado a patogenia causada por *Acanthamoeba* à produção e secreção de proteases (He *et al.*, 1990; Ferreira *et al.*, 2009). Rocha-Azevedo *et al.* (2009), observaram que uma espécie patogênica de *Acanthamoeba* reconhece proteínas da matriz extracelular (MEC), como colágeno I e laminina, de maneira mais eficiente, quando comparadas à espécie não-patogênica. Considerando-se que o padrão de secreção de proteases extracelulares de diferentes isolados de *Acanthamoeba* pode estar associado ao potencial patogênico destas amebas, o objetivo deste trabalho foi verificar a presença de proteases

extracelulares produzidas por isolados ambientais de estojos de lentes de contato e cepas padrão de *Acanthamoeba*.

Materiais e Métodos

Organismos: Neste estudo foram usadas cepas padrão de *Acanthamoeba* patogênicas, ATCC 30461, e não-patogênicas, ATCC 30010 e 30872 e isolados ambientais pré-existent no Laboratório de Parasitologia – UFRGS, provenientes de estojos de lentes de contato. Todas as amostras foram avaliadas a partir de um cultivo axênico e monoclonal.

Cultivo e Obtenção do Meio Condicionado (MC): Os organismos foram cultivados em meio PYG (proteose peptona, extrato de levedura e glicose) contendo antibiótico penicilina-estreptomicina na concentração de 40 µL/mL e mantidos em estufa a 30 °C, por 72 horas. Após este período o MC foi centrifugado a 250 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado através de uma membrana de 0,22 µm e estocado a 4°C. As amostras foram liofilizadas e posteriormente ressuspensas em tampão fostato, pH 7,0.

Perfil de Atividade proteolítica – Zimograma: Os MC liofilizados de diferentes isolados foram misturados ao tampão de amostra (1:1) (sem SDS ou β-mercaptoetanol) e analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 12%, contendo 2 mg/mL de gelatina. Após a separação, os géis foram incubados em solução de Triton X-100 2,5% (w/v) por 60 minutos, sendo em seguida transferidos para o tampão de desenvolvimento (50 mM de Tris-HCl, pH 7.5, contendo 10 mM de CaCl₂) na temperatura de 37°C por 18 horas. Após esse período, o gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue*. As áreas de digestão foram visualizadas como regiões não coradas.

Quantificação de proteínas: As proteínas totais foram determinadas pelo método de Lowry.

Resultados e Discussão

A produção de proteases é reconhecida como fator de virulência para diversos protozoários, incluindo *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia* (Khan, 2006; Lejeune *et al.*, 2009; Ankarklev *et al.*, 2010). Em *Acanthamoeba* a presença e a quantidade de proteases tem sido relacionadas a sua capacidade invasora, talvez determinantes para o fenótipo virulento apresentado por alguns isolados (Ferreira *et al.*, 2009; Rocha-Azevedo *et al.*, 2009).

Em nosso estudo, de acordo com os resultados dos zimogramas das amostras (figura 1), pode-se observar que todos os isolados possuem atividade proteolítica (bandas brancas). Os resultados das dosagens de proteínas totais, apresentados na tabela 1, demonstram os altos níveis de proteínas produzidas e secretadas por estes protozoários.

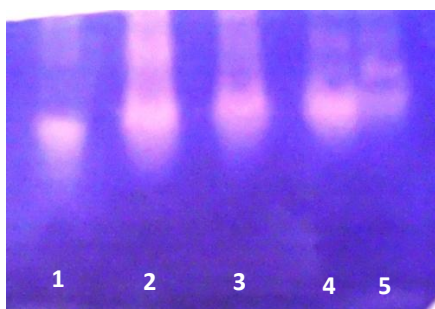


Figura 1. Zimograma dos isolados de ECL e cepas padrão de *Acanthamoeba*. 1= ATCC 30461P; 2 = ATCC 30010NP; 3= ATCC 30872NP; 4= ELC32; 5= ELC48

Tabela 1. Proteínas Totais nos isolados de ECL e cepas padrão de *Acanthamoeba*

Isolados	Proteínas Totais (mg/mL)
ATCC 30461 P	47,4
ATCC 30010 NP	61,6
ATCC 30872 NP	42,2
ELC32	52,6
ELC48	51,4

*ECL = estojos de lentes de contato; P= patogênica; NP= não-patogênica

Muitos estudos têm conseguido isolar e caracterizar proteases extracelulares de espécies variadas de *Acanthamoeba*, como determinado por Na *et al* (2001) que isolaram e caracterizaram uma serino-protease de 12 kDa de *A. castellanii*, capaz de degradar proteínas da MEC, entre outras proteínas da córnea de coelho. Em outro trabalho, também estudando *A. castellanii* foi isolada uma protease de 133 kDa, capaz de lisar células do epitélio corneano humano e de roedores (Hurt *et al*, 2003). Entretanto nenhum estudo buscou a comparação entre diversos isolados em relação às proteases produzidas, o que poderia possibilitar a descoberta de um possível marcador de patogenicidade para este gênero.

Conclusão

Os resultados demonstram que os isolados estudados produzem proteínas extracelulares e que parte destas possui forte atividade proteolítica. Estudos complementares fornecerão melhores dados sobre a caracterização destas proteases e suas funções.

Apoio

CNPq

Referências

- ANKARKLEV J, JERLSTRÖM-HULTQVIST J, RINGQVIST E, TROELL K, SVÄRD SG. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of Giardia species. *Nat Rev Microbiol* 8: 413-22, 2010.
- AWWAD, S. T.; PETROLL, W. M.; McCULLEY, J. P.; CAVANAGH, H. D. Updates in *Acanthamoeba* keratitis. *Eye Contact Lens*. 33:1-8, 2007.
- CARLESSO, A. M.; ARTUSO, G. L.; CAUMO, K.; ROTT, M. B. Potentially Pathogenic *Acanthamoeba* Isolated from a Hospital in Brazil. *Curr Microbiol*. v. 60: 185-190, 2010.
- CAUMO, K.; A. P. FRASSON, C. J. PENS, L. F. PANATIERI, A. P. G. RAZZON; M. B. ROTT. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. v. 103 (6): 477-485, 2009.
- FERREIRA, G. A.; MAGLIANO, A. C. M.; PRAL, E. M. F.; ALFIERI, S. C. Elastase secretion in *Acanthamoeba polyphaga*. *Acta Tropica*. v. 112: 156-163, 2009.
- HE, Y.; NIEDERKORN, J. Y.; McCULLEY, J. P.; STEWART, G. L.; MEYER, D. R.; SILVANY, R.; DOUGHERTY, J. In Vivo and In Vitro Collagenolytic Activity of *Acanthamoeba castellanii*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. v. 31 (11), 1990.
- HURT, M.; NIEDERKORN, J.; ALIZADEH, H. Effects of Mannose on *Acanthamoeba castellanii* Proliferation and Cytolytic Ability to Corneal Epithelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. v. 44 (8), 2003.
- KHAN, N. A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. Federation of European Microbiological Societies. *Microbiological Review*. v. 30: 564-595, 2006.
- LEJEUNE M, RYBICKA JM, CHADEE K. Recent discoveries in the pathogenesis and immune response toward *Entamoeba histolytica*. *Future Microbiol* 4: 105-18, 2009.
- NA, B-K.; KIM, J-C.; SONG, C-Y. Characterization and pathogenetic role of proteinase from *Acanthamoeba castellanii* *Microbial Pathogenesis*. v. 30: 39-48, 2001.
- ROCHA-AZEVEDO, B.; JAMERSON, M.; CABRAL, G. A.; SILVA-FILHO, F. C.; MARCIANO-CABRAL, F. *Acanthamoeba* Interaction with Extracellular Matrix Glycoproteins: Biological and Biochemical Characterization and Role in Cytotoxicity and Invasiveness. *J. Eukaryot. Microbiol*. 56(3): 270-278, 2009.
- VISVESVARA, G.S. & SCHUSTER, F.L. Opportunistic Free-living Amebae, Part I. *Clinical Microbiology Newsletter*. 30 (20), 2008.