

CITOTOXICITAT DE L'ACANTHAMOEBA CASTELLANNI EN CÈL·LULES EPITELIALS HUMANES

ANTONELLA MATTANA,¹ STEFANIA USAI,² ANGELA MARIA ROCCHIGIANI,²
PIER LUIGI FIORI,² FLAVIA FRANCONI,¹ PIERO CAPPUCCINELLI²

¹Institut de Química Biològica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Sàsser, Sardenya

²Institut de Microbiologia i Virologia, Facultat de Medicina, Universitat de Sàsser, Sardenya

INTRODUCCIÓ

Els protozous del gènere *Acanthamoeba* causen infeccions cròniques en humans com: meningoencefalitis granulomatoses, patologia respiratòria, corneal, dels sins de la cara, dels ossos. Les infeccions d'*Acanthamoeba* presenten aspectes no clars sigui relativament als mecanismes de defensa de l'hoste, sigui relativament als factors de patogenicitat i virulència del protozou.

L'efecte patògen de les amebes, com també dels altres microorganismes, depèn de l'adhesió a les cèl·lules epitelials de l'hoste i d'eficients mecanismes d'invasió. Aqueixos últims poden ésser conseqüència del lliurament d'enzims lítics (proteases, lipases, etc.) i de la capacitat de damnejar les cèl·lules infectades amb fagocitosis o amb toxines o altres molècules que modifiquen la permeabilitat de la membrana cel·lular.

Amb la intenció d'especificar els factors de patogenicitat d'*Acanthamoeba*, havem estudiat in vitro l'efecte citopàtic de l'*Acanthamoeba castellanii*, utilitzant com model cèl·lules epitelials humanes d'origen amniòtic (Wish). Són estats examinats sigui l'efecte citopàtic directe, causat per la incubació conjunta dels trofozoïts amb les cèl·lules de colpir, sigui l'efecte indirecte (citotòxic) causat de les substàncies lliurades en el medi de cultiu.

Dirigint l'atenció amunt dels produïts citotòxics excretats/secretats del protozou, és estada valorada llur acció sobre: (a) el creixement, vitalitat i morfologia cel·lular; (b) l'índex mitòtic; (c) la concentració del calci intracel·lular lliure ($[Ca^{2+}]_i$); (d) el DNA.

MATERIALS I MÈTODES

Els trofozoïts d'*Acanthamoeba castellanii*, isolats d'un pacient amb queratitis bilateral, en l'Institut de Microbiologia d'Ancona (Itàlia), són estats cultivats

en *Acanthamoeba* Medium a 25°C, utilitzant ampolles T-25 estèrils. Abans de cada experiment, les amebes, mentre creixien en manera logarítmica, eren rentades dues vegades amb tampó fosfat salí (PBS) a pH 7,4 i sospeses en Roswell Park Memorial Institut Medium 1640 (RPMI), dit també PBS.

Havem mantengut les cèl·lules Wish en RPMI 1640 sumat amb el 10 per cent de sèrum de bou fetal (FCS), amb 100 UI de Penicil·lina G e 100 µg/cc de streptomycina sulfat i cultivades en ampolles T-25 estèrils a 37°C, enriquides al 5 per cent amb CO₂. Quan les cèl·lules formen un estratus compacte, previ tractament amb tripsina-EDTA al 25 per cent en PBS, se dilueixen en el medi de cultiu i se transfereixen en noves ampolles. Abans de cada experiment se comptaven les cèl·lules en Nageotte e se prenen en consideració si el percentatge de vitalitat era superior al 95 per cent. És estat utilitzat un colorant a la nigrosina.

L'activitat citopàtica dels trofozoïts i aquella citotòxica causada de part de substàncies produïdes de les amebes dins el medi de cultiu, és estada mesurada amb un mètode radiomètric. Una suspensió de cèl·lules Wish marcades amb 3H-uridina, a la concentració de $2,5 \times 10^4$ cèl·lules/cc, se repartiven en plaques microtiter de 96 places. Després de 4 dies d'incubació, tret el medi de cultiu i rentades amb RPMI, se infectaven les Wish o amb amebes en suspensió de RPMI que contenien Hepes 20 mM, o amb el medi mateix modificat per 15 h de part dels protozous, però sense trofozoïts. La concentració del superjacent se obtenia filtrant-lo amb microconcentradors centricon-10 que tenien un límit de exclusió de 10.000 Daltons. A 24 h de la infecció se mesurava la radioactivitat del cultiu, utilitzant tècniques d'escintil·lació líquida. La quantitat de 3H-uridina que era deslliurada de les cèl·lules marcades era proporcional a la citogenicitat de les amebes.

L'acció de les substàncies de l'*A. castellanii* sobre la proliferació i la vitalitat cel·lular és estada estudiada analitzant com creixien les Wish amb o sense el midium metabolitzat dels trofozoïts. Les cèl·lules Wish en plaques estèrils de 24 places (1×10^5 /plaça) i cultivades per 10 h com havem dit, tret el medi de cultiu eren cultivades amb 1cc de RPMI + Hepes mM o 1 cc de superjacent d'*A. castellanii* obtingut cultivant els protozous (3×10^6 /cc) en el mateix medi per 15 h. De seguit se comptaven les cèl·lules en Nageotte, per valorar'n el percentatge de vitalitat.

L'índex mitòtic de les cèl·lules Wish, cultivades amb o sense superjacent d'*A. castellanii*, és estat calculat al microscopi, analitzant el percentatge dels fusos mitòtics presents colorats amb tècniques de immunofluorescència indirecta. Com anticòs primari havem utilitzat el monoclonal antitubulina TU-01; com anticòs secundari, IgG antirata lligades amb fluorescina (FITC).

La quantitat [Ca²⁺]i és estada mesurada per espectrofluorometria amb un aparell Hitachi F2000, aprofitant de la propietat fluorescent de l'indicador calci-sensible Fura-2AM. Una solució de 0,5 de suspensió de cèl·lules fitó marcades amb FURA-2AM són estades posades en solució tampó Hepes (NaCl 137 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 1,5 mM, KCl₅ mM, Glucosa 15 mM, pH 7,4) a la concentració de $2,5 \times 10^6$ cèl·lules/cc, després lligides a l'Hitachi per 500

segons. En aqueix temps, afegint els produïts de les amebes incubades en PBS, o solament la solució tampó, se controlava la fluorescència i la concentració del calci lliure en les cèl·lules utilitzades i en els controls.

L'efecte de les substàncies solubles produïdes de l'*A. castellanii* sobre el DNA de les cèl·lules Wish usades, és estat analitzat després de haver tractat les Wish per 17 h amb RPMI 20 mM Hepes. Amb el DNA obtingut, purificant segons el Current Protocol en Biology Molecular Unit 2.2.1 i 2.2.2 (1994), se feva una electroforesis sobre gel de agarosa (1,2%), emprant com DNA estàndard λ VI (2176-154 pb) e λ FHIX (1358-72 pb).

Tots els experiments són estats efectuats almanco 3 vegades. Les diferències entre els grups són estades precisades amb el text de Student, definint amb significança estatística aquelles amb $p < 0,05$.

RESULTATS

Activitat citopàtica i citotòxica: les cèl·lules Wish, preventivament marca-des amb 3H-uridina, infectades de l'*A. castellanii*, causen un augment de radioactivitat en el medi de cultiu proporcionat a la quantitat de trofozoïts presents en l'inòcul (Fig. 1). La microscòpia a contrast de fases indica que les cèl·lules fitó (Wish), després del contacte amb les amebes, són lisades i en gran part fagocitades (Fig. 2a, 2b).

Els superjacents, obtinguts incubant els trofozoïts en el mateix medi utilitzat per les cèl·lules epitelials, causen, també si un poc menys, una cessió de 3H-uridina; augmentant-ne la concentració, creixi l'efecte tòxic que és més o manco igual a aquell provocat pel contacte directe dels protozous amb les cèl·lules. L'efecte citotòxic és augmentat preincubant les amebes amb inhibidors de la proteasa (0,5 μ g/cc leupeptyn, 20KU/cc trasylol; 10 μ M PMSF) (Fig. 1). Les cèl·lules Wish després d'aqueix tractament, prenen una forma quasi rodona i presenten blebs en la membrana cel·lular (Fig. 2c).

La proliferació cel·lular és estada analitzada per 9 h consecutives; temps més llargs interferien amunt de la crescuda de les cèl·lules de control, per la manca de sèrum en el medi de cultiu d'aqueixes últimes.

Els superjacents d'*A. castellanii* després de 90 minuts de incubació provoquen un bloc significatiu de la divisió cel·lular, ma no una disminució del percentatge de vitalitat; aqueix efecte continua per tot el temps considerat (Fig. 3a, 3b). L'índex mitòtic de les cèl·lules en contacte de les produïts de l'*A. castellanii* és significativament major confrontat amb els controls (Fig. 4).

Havem vist que el tampó PBS en contacte per 1, 2, 3 h amb trofozoïts d'*A. Castellanii*, provoca un augment important de la $[Ca^{2+}]_i$ en les cèl·lules Wish, mentre el PBS de sol o posat en contacte amb altres trofozoïts (*Trichomonas vaginalis*) no canvia aqueix paràmetre (Fig. 5). Però l'augment de la $[Ca^{2+}]_i$ dura solament 2 minuts, també si no se torna completament a la situació de partença. L'augment del $[Ca^{2+}]_i$ no se verifica si les cèl·lules Wish se incuben per 20 minuts amb Rajonidina (100 mM) i després se mesclen amb les substàn-

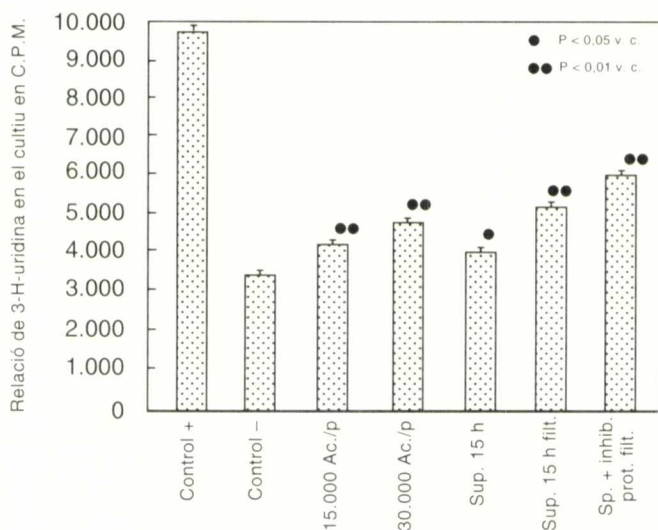


FIG. 1. Citopatogenicitat d'*Acanthamoeba castellanii* sobre cèl·lules Wish, després de 24 h de incubació.

cies produïdes de l'*A. castellanii*. En els nostres experiments, les cèl·lules vingudes en contacte dels metabolits d'*A. castellanii* mostren una parcial degradació del DNA amb l'aparició d'un fragment de quasi 400 pb, cosa que no se veu en els controls (Fig. 6).

CONCLUSIONS

Els resultats mostren que l'*A. castellanii* té una acció citopàtica sobre les cèl·lules epitelials Wish que havem emprat. El dany cel·lular és degut sigui al contacte directe protozou / cèl·lula fitó, sigui a la síntesis i a la secreció de part del protozou de substàncies tòxiques. L'efecte citopàtic directe és caracteritzat per l'adhesió a les cèl·lules colpides, per la lisi cel·lular i per la fagocitosi.

L'efecte citotòxic és causat per substàncies deslliurades d'amebes vitals i no en conseqüència d'una llur lisi, dat que les amebes mantenen la forma trofozoítica sigui en RPMI que en PBS. L'augment de citotoxicitat en presència d'enzims proteolítics sensibles al leupeptyn, trasylol i PMSF, pot fer pensar que les substàncies tòxiques produïdes de la nostra ameba siguin parcialment de natura proteica i fàcilment degradables. L'acció citotòxica s'explica per:

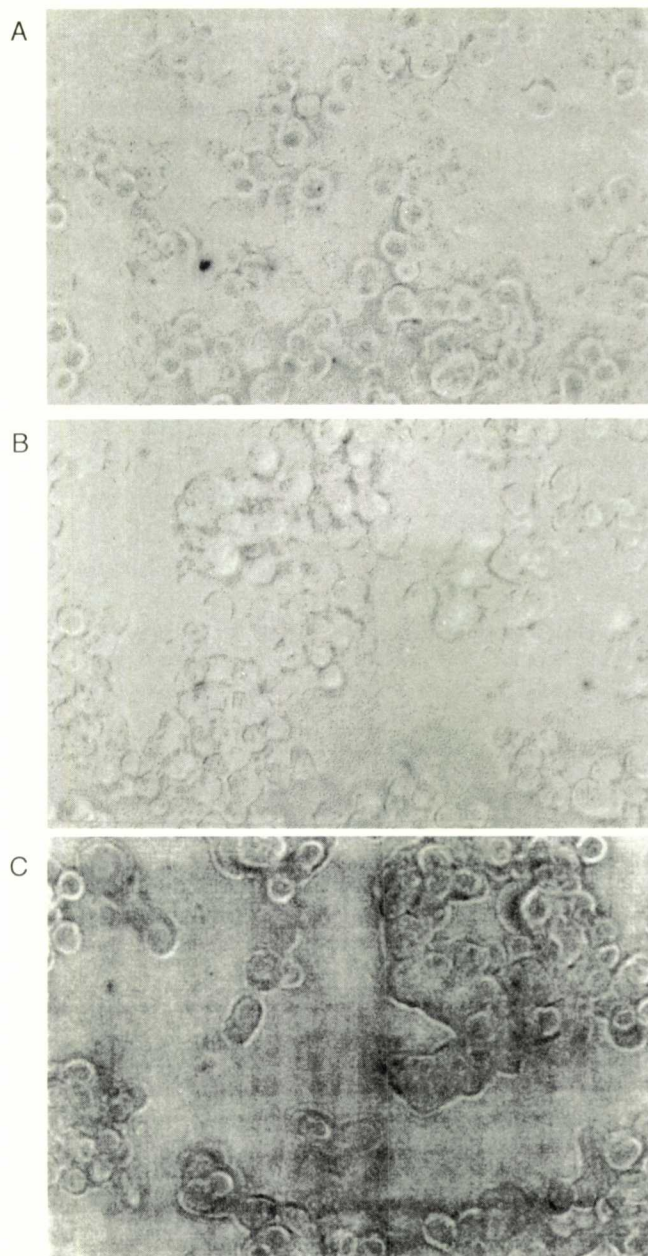


FIG. 2. Microscòpia òptica de contrast de fases. A) Cèl·lules de control; B) Després d'una incubació per 24 h amb 3×10^4 de trofozoïts per placa; C) En incubació per 24 h amb RPMI 20 mM Hepes metabolitzat per 15 h de 3×10^6 trofozoïts/cc.

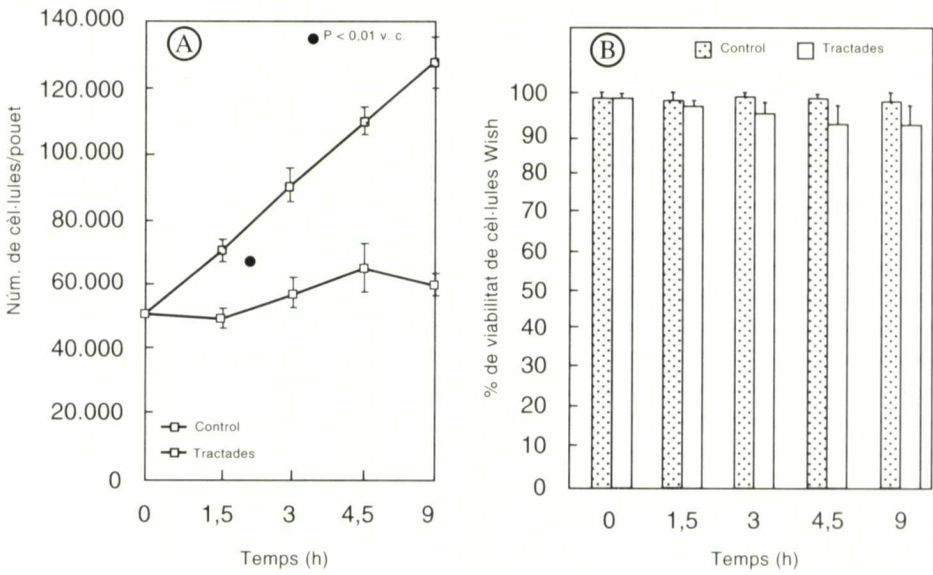


FIG. 3. A) Corba de creixement de cèl·lules Wish tractades amb RPMI 20 mM Hepes metabolitzades per 15 h per *Acanthamoeba castellanii*; B) Percentatge de vitalitat de cèl·lules Wish tractades amb RPMI 20 mM Hepes metabolitzades per 15 h per *A. castellanii*.

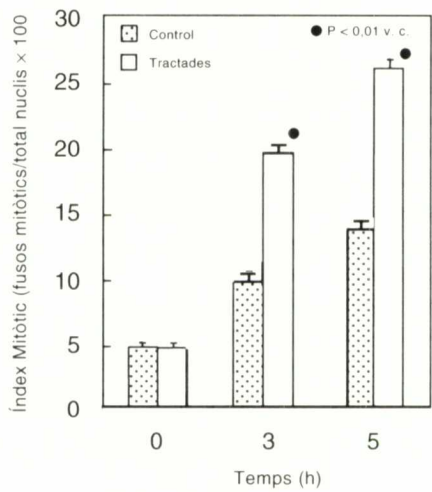


FIG. 4. Índex mitòtic de cèl·lules Wish tractades amb RPMI 20 mM Hepes metabolitzades per 15 h per *Acanthamoeba castellanii*.

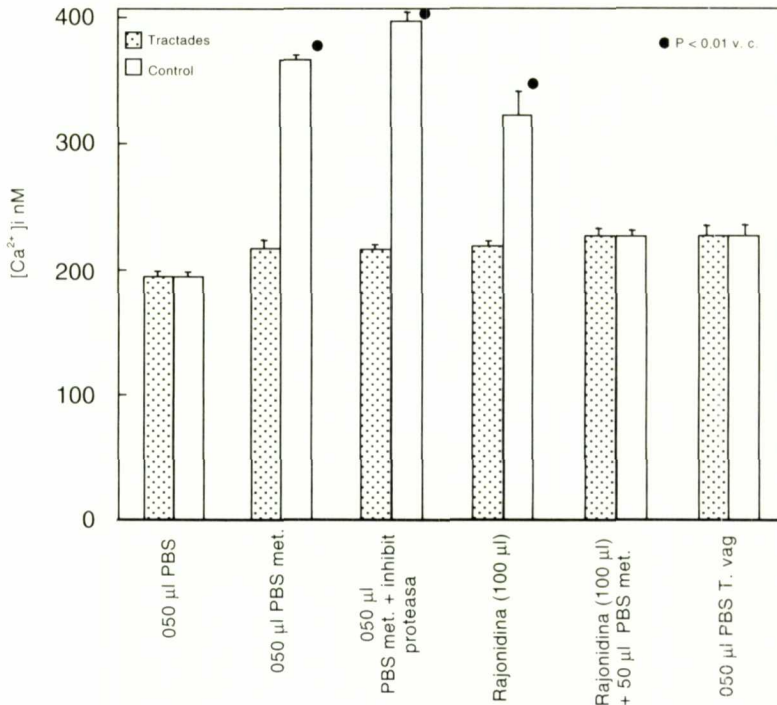


FIG. 5. Variació de la $[Ca^{2+}]_i$ en cèl·lules Wish en contacte amb les substàncies produïdes en PBS d'*Acanthamoeba castellanii*.

– immediat increment del calci intracel·lular lliure. Aqueix fenomen, per ara, pareix degut a la cessió d'ions en el reticle endoplasmàtic (RE) i no a un passatge a través de la membrana cel·lular; efectivament, després del tractament amb Rajonidina (que causa la replesió del Ca^{2+} del RE), les substàncies escretes per l'*A. castellanii* són inactives;

– modificacions morfològiques amb la formació de blebs a nivell de la membrana cel·lular;

– ràpid bloc de la capacitat de proliferar, deduït controlant els fusos mitòtics;

– degradació del DNA.

Aqueixos fets porten un dany cel·lular que després de 24 h és irreversible.

El calci té un important paper, controlant moltes activitats enzimàtiques i regulant el mecanisme dels gens. Les modificacions de les característiques morfològiques i bioquímiques, de l'activitat proliferativa i la fragmentació del DNA, són tots processos causats per la modificació de l'homeostasi del calci. Per això pensem que el gran i ràpid augment de la $[Ca^{2+}]_i$ és la base de l'acció citotòxica de l'*A. castellanii*.

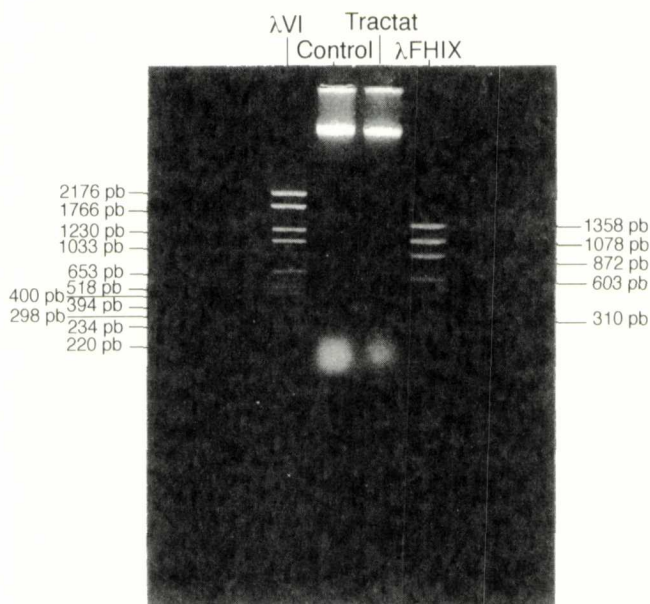


FIG. 6. Electroforesis sobre gel d'agarosa (1,2%) del DNA extracte de cèl·lules Wish tractades (17 h) i no amb RPMI 20 mM Hepes metabolitzat per 5×10^6 trofozoïts/cc.

BIBLIOGRAFIA

- Auran, J. D., Starr, M. B., Jakobiec, F. A. (1987). *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea* **6**, 2-26.
- De Jonckheere, J. F. (1980). Growth characteristics cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. *Applied Environment Microbiology* **39**, 681-685.
- Ferrante, A. (1991). Free-living amoebae: Pathogenicity and Immunity. *Parasite Immunology* **13**, 31-47.
- John, D. T. (1993). Opportuniscally pathogenic free-living amebae. In Kreier, J. P., Baker, J. R. (ed.), *Parasitic Protozoa*, 2nd ed. Academic Press, Inc., San Diego, CA. p. 143.
- Larkin, D. F. P., Berry, M., Easty, D. L. (1991). *In vitro* corneal pathogenicity of *Acanthamoeba*. *Eye* **5**, 560-568.
- Ma, P., Visvesvara, G. S., Martinez, A. J., Theodore, F. H., Dagget, P. M., Sawyer, T. K. (1990). *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections. *Review of Infections Diseases* **12**, 490-513.
- Page, F. C. (1976). An illustrated key to freshwater and soil amoebae. *Freshwater Biological Association, scientific publication n° 34*. Freshwater Biological Association, Ambleside, England.
- Singh, B. N. (1975). *Pathogenic and non-pathogenic amoeba*. Macmillan, London.