

## ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI

Estratto dai *Rendiconti della Classe di Scienze fisiche, matematiche e naturali*  
Serie VIII, vol. LXXIV, fasc. 3 - Marzo 1983

**Zoologia.** — *Studi sul metabolismo ossidativo in Amoeba proteus durante la fagocitosi* (\*). Nota di SILVIA D'ANCONA, PAOLO BELLAVITE e SIMONETTA MERLO, presentata (\*\*) dal Socio S. RANZI.

SUMMARY. — During phagocytosis of *Chlorella* and of *Tetrahymena* by *Amoeba proteus* in the presence of homovanillic acid and of horseradish peroxidase the formation of fluorescent compounds has been detected. Such compounds can be attributed to the production of  $H_2O_2$  by *Amoeba proteus*. The activation induced by phagocytosis in *Amoeba* is less evident than that of Mammals phagocytic cells, but it can be assumed that also in these *Protozoa* a similar metabolic system is acting.

## INTRODUZIONE

È noto che il processo della fagocitosi nei granulociti e nei macrofagi dei Mammiferi è associato a una stimolazione del metabolismo ossidativo con produzione di intermedi di riduzione dell' $O_2$  come l'anione superossido ( $O_2^-$ ), il radicale idrossile ( $OH^*$ ), l'acqua ossigenata ( $H_2O_2$ ) e l'ossigeno singoletto ( $^1O_2$ ). Tali specie molecolari altamente reattive sono utilizzate dalle stesse cellule fagocitiche per l'uccisione di microorganismi o di cellule tumorali [1-5].

Scopo di questa ricerca è stato quello di indagare se la fagocitosi è accompagnata da simili modificazioni metaboliche anche in un'ameba (*Amoeba proteus*) filogeneticamente lontana dalle cellule specializzate del sangue o del sistema reticolo endoteliale degli animali superiori.

Sono state perciò cimentate amebe con varie particelle; si è osservata al microscopio ottico la fagocitosi e si è contemporaneamente seguito il comportamento metabolico delle cellule. Quale parametro di valutazione di un'eventuale attivazione metabolica è stata misurata la produzione di  $H_2O_2$ , in quanto è possibile utilizzare un metodo fluorimetrico molto sensibile, che consente di rilevare anche minime quantità di  $H_2O_2$  [6]. Il metodo si basa sulla reazione, catalizzata da perossidasi, tra  $H_2O_2$  e acido omovanillico con formazione, in quantità stechiometriche, del composto 2, 2' diidrossi 3,3' dimetossifenil 5,5' acido acetico. Tale composto è fluorescente e stabile e si accumula perciò nel mezzo di incubazione, consentendo misurazioni anche a tempi relativamente lunghi.

## MATERIALI E METODI

*Metodo di coltura.* Le amebe (*Amoeba proteus* Pallas) gentilmente fornite dalla Prof. Marisa Cigada Leonardi del Dipartimento di Biologia dell'Università

(\*) Ricerche eseguite nell'Istituto di Patologia generale dell'Università di Verona con contributo n. 81.01803.04 CNR.

(\*\*) Nella seduta del 12 marzo 1983.

di Milano [7-8] erano coltivate in terreno di Chalkley [9] costituito da NaCl 1,37 mM, KCl 0.027 mM, NaHCO<sub>3</sub> 0.047 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.007 mM, CaPO<sub>4</sub> 0.007 mM, in vaschette di vetro del diametro di cm. 10-12. A questa soluzione erano aggiunti 2-3 chicchi di riso per vaschetta. Dopo alcuni giorni di coltura, le amebe si disponevano intorno ai chicchi, sui quali erano nate delle ife fungine. Le vaschette di coltura, dove erano presenti pure dei Ciliati, Rotiferi, Nematodi, che servivano da pabulum per le amebe, erano tenute a temperatura ambiente in semiombra. Tre giorni prima di ogni esperimento, le amebe erano isolate, lavate ripetutamente e raccolte in vaschette con il solo terreno di coltura in modo da tenerle, per quanto possibile, in condizioni di digiuno.

*Pabulum usato per la fagocitosi.* Per la fagocitosi sono stati provati vari pabulum: amido di patata, lievito di birra (*Saccharomyces cerevisiae*) bolliti, lavati e centrifugati; inoltre *Chlorella* e *Tetrahymena pyriformis* (Ehrbg.).

Le clorelle essiccate (Ditta Specchiasol, Verona) erano lavate mediante centrifugazione per 3 volte a 3500 g per 6 minuti nel terreno di Chalkley. In alcuni esperimenti le clorelle venivano pretrattate mediante riscaldamento a 60 °C per 30 minuti. Le clorelle erano infine risospese in terreno di Chalkley alla concentrazione di 10 mg/ml.

I *Tetrahymena pyriformis*, forniti dalla Prof. Cigada, erano coltivati sterilmente in 1% proteoso peptone e conservati a 4 °C. Al momento dell'esperimento erano lavati mediante centrifugazione per 3 volte a 3500 g per 8 minuti nel terreno di Chalkley; i *Tetrahymena* erano uccisi con trattamento a 60 °C per 30 minuti e risospesi nello stesso terreno alla concentrazione di 5.10<sup>4</sup> a 10.10<sup>4</sup> ml.

*Misura dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.* Per la misura dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è stato applicato il metodo fluorimetrico adottato da Rossi e coll. per misura della produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> da parte di macrofagi [6].

Per ogni esperimento si allestivano 4 serie di pozzetti secondo il seguente schema: 1) amebe (800-3000) per misurare l'attività basale, 2) amebe + particelle da fagocitare per misurare l'attività fagocitaria, 3) particelle fagocitabili (Clorelle 0.5 mg/pozzetto-Tetrahymena 2.5.10<sup>4</sup>-5.10<sup>4</sup>/pozzetto), 4) terreno.

I saggi erano condotti a temperatura ambiente in pozzetti (multiwells Falcon) in un volume totale di ml 0.5 di terreno di Chalkley contenente 5 mM tampone fosfato a pH 7.4, 0.25 mM di sodio azide (NaN<sub>3</sub>), 0.2 mM acido omovanillico, 16 µg di perossidasi di rafano (HRP), 10 µg di superossidodismutasi. In alcuni esperimenti (quando indicato) al mezzo di incubazione erano aggiunti 1.3 10<sup>4</sup> U di catalasi oppure veniva omissa l'HRP o l'NaN<sub>3</sub> <sup>(1)</sup>.

I pozzetti erano incubati per 5 ore al buio a temperatura ambiente. Il contenuto di ogni pozzetto veniva quindi centrifugato a 8000 g per 2 minuti in microcentrifuga Eppendorff. Aliquote (50-200 ml) del supernatante venivano

(1) Reagenti: NaN<sub>3</sub>, acido omovanillico, HRP, SOD, catalasi sono della SIGMA Chemical COMPANY St. Lewis, MO (U S A).

aggiunte a ml 2.5 di tampone fosfato 0.1 M a pH 7.4 e la fluorescenza era misurata con un fluorimetro Ciampolini modello DC 3000/1 con  $\lambda$  eccitazione = 315 nm,  $\lambda$  di emissione 425 nm.

La produzione di  $H_2O_2$  è stata espressa con nanomoli di  $H_2O_2$  prodotta da  $10^4$  amebe in base al raffronto con una curva standard ottenuta aggiungendo al terreno di incubazione quantità note di  $H_2O_2$ . La produzione di  $H_2O_2$  da parte di amebe o da parte di amebe + particelle fagocitate era calcolata sottraendo i valori di fluorescenza dei relativi bianchi; rispettivamente terreno e terreno + particelle.

#### RISULTATI E DISCUSSIONE

La Tabella I dimostra che amebe incubate per 5 ore in terreno di Chalkley rilasciano  $H_2O_2$ . Tale rilascio è incrementato se nel terreno di incubazione sono aggiunte clorelle. Non si sono osservate differenze di stimolazione metabolica indotta da clorelle trattate a 60 °C rispetto a quelle indotte da clorelle non trattate.

L'osservazione microscopica ha dimostrato che si è avuta contemporaneamente la fagocitosi delle clorelle (Tav. I, fig. 1).

TABELLA I

*Produzione di  $H_2O_2$  durante la fagocitosi di Clorella da parte di Amoeba proteus.* Le amebe erano incubate in assenza ed in presenza di clorelle (0.5 mg/pozzetto) e l' $H_2O_2$  misurata come descritto nei metodi. I valori sono in n moli di  $H_2O_2/5$  ore/ $10^4$  amebe.

Esperimento	Amebe	Amebe + Clorelle
1	5.8	12.14
2	7.73	10.9
3	4.5	25.00
4	10.00	17.63
5	10.00	6.04
6	0	43.43
7	0	47.00
8	7.6	58.00
M	5.7	27.52
SD	3.98	19.52
		$t = 3.17$ $p \leq 0.01$ $N = 14$

Dai dati riportati dalla Tab. I si rileva che in alcuni esperimenti si è avuto uno scarso aumento della risposta metabolica. Al controllo microscopico si è riscontrato che ad una risposta metabolica bassa corrispondeva una scarsa fagocitosi. Non è stato possibile determinare quale fosse il vero fattore responsabile della grande variabilità dei dati. Si suppone che essa sia probabilmente dovuta alla notevole sensibilità di questi Protozoi alle diverse condizioni ambientali: pH, temperatura, superaffollamento, carica batterica. A volte le amebe hanno presentato fenomeni di sofferenza evidenziati dal raggrinzimento della membrana e dall'assunzione di una forma rotondeggiante.

L'incremento di fluorescenza è minore se nel mezzo di incubazione si omette HRP, che catalizza la reazione  $H_2O_2 + \text{acido omovanillico} \rightarrow \text{acido } 2'2' \text{ diidrossi } 3,3' \text{ dimetossifenil } 5,5' \text{ acido acetico (fluorescente)}$ .

Esperimenti eseguiti in presenza di catalasi che degrada l' $H_2O_2$  in  $1/2 O_2 + H_2O$  ed in assenza di  $NaN_3$  (inibitore della catalasi) hanno dimostrato minor produzione di  $H_2O_2$  da parte di amebe in fagocitosi (Tab. II).

TABELLA II

*Produzione di  $H_2O_2$  da parte di amebe incubate con clorelle in assenza di  $NaN_3$  ed in presenza di catalasi.*

Valori in  $n$  moli di  $H_2O_2/5$  ore/ $10^4$  amebe. Media SD di 4 esperimenti.

Condizioni	Produzione di $H_2O_2$
+ Sodio azide 0.25 mM . . . . .	$12.5 \pm 7.2$
No Sodio azide . . . . .	$3.38 \pm 5.5 \quad t = 2.01 \text{ ns}$
No Sodio azide + catalasi $1.3 \cdot 10^4$ U . . . . .	$4.03 \pm 3.16 \quad t = 2.15 \text{ ns}$

Anche negli esperimenti nei quali il pabulum era costituito da *Tetrahymena* (Tab. III) si è rilevata una significativa stimolazione metabolica. Al microscopio si osservava chiaramente che i *Tetrahymena pyriformis* venivano fagocitati dalle amebe con formazione di vacuoli nutritivi (food cups) (Tav. I, fig. 2).

Usando come pabulum amido e lievito la produzione di  $H_2O_2$  era minima e non si discostava da quella delle sole amebe, anche se queste particelle venivano in parte fagocitate dalle amebe (controllo microscopico).

Il riscontro di un aumento di fluorescenza quando le clorelle ed i *Tetrahymena* erano aggiunti alle amebe in coltura può far formulare due ipotesi. In base alla prima durante la fagocitosi verrebbero emesse sostanze ossidanti da parte delle amebe, in base alla seconda avverrebbe la produzione di  $H_2O_2$  evidenziata dalla reazione mediata dalla perossidasi di rafano (HRP). Noi propendiamo per la seconda ipotesi. Una dimostrazione indiretta è la diminuzione di fluorescenza quando è omessa  $NaN_3$  o quando è aggiunta catalasi (vedi Tabella II). La scarsa

produzione di fluorescenza evidenziata quando il mezzo di incubazione è privo di  $\text{NaN}_3$  è dovuta probabilmente al fatto che sono lasciati liberi i sistemi enzimatici cellulari che degradano l' $\text{H}_2\text{O}_2$ .

TABELLA III

*Produzione di  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante la fagocitosi di Tetrahymena pyriformis da parte di Amoeba proteus.*

Le amebe erano incubate in assenza ed in presenza di *Tetrahymena* ( $2.5 \cdot 10^4$ – $5 \cdot 10^4$ /pozzetto) e l' $\text{H}_2\text{O}_2$  misurata come descritto nei metodi. Valori in  $n$  moli di  $\text{H}_2\text{O}_2$ /5 ore/ $10^4$  amebe.

Esperimento	Amebe	Amebe + Tetrahymena
1	2.75	10.45
2	1.44	9.55
3	1.44	10.4
4	0	22.52
5	1.79	10.17
6	0	38.64
7	10.72	11.22
8	7.6	8.8
M	3.22	15.22
SD	3.87	10.44

$t = 3.05$   
 $N = 14$        $p \leq 0.01$

La stimolazione del sistema respiratorio dell'ameba risulta basso in confronto a quello delle cellule fagocitiche dei Mammiferi [10]. Si rileva inoltre che l'emissione di pseudopodi indotta dalla fase di adesione alle particelle da fagocitare e il processo di fagocitosi avvengono lentamente. Questo fatto potrebbe spiegare la differenza nella bassa produzione di  $\text{H}_2\text{O}_2$  da parte delle amebe. L'osservazione microscopica permette di rilevare che l'ameba impiega un lungo periodo di tempo per completare il processo della fagocitosi: *Tetrahymena* inglobati hanno conservato i movimenti ciliari per quasi un'ora. La lentezza del processo fagocitario nelle amebe è stato documentato anche da altri Autori; così Wise e coll. [11] hanno evidenziato in amebe trattate con ferritina presenza della sostanza nei vacuoli nutritivi 4 ore dopo l'inizio dell'esperimento. Inoltre Oates e coll. [12] hanno rilevato che tutte le particelle fagocitate si accumulavano in un singolo grande vacuolo 3–4 ore dopo la presa della particella.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] C. W. BALDRIDGE e R. W. GERARD (1933) - *The extrarespiration of phagocytosis*. « Am. J. Physiol. », 105, 235.
- [2] G. Y. N. IYER, M. F. ISLAM e H. J. QUASTEL (1961) - *Biochemical aspects of phagocytosis*. « Nature » (London), 192, 535.
- [3] A. J. SBARRA e M. L. KARNOVSKY (1951) - *The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes*. « J. Biol. Chem. », 234, 1355.
- [4] F. ROSSI e M. ZATTI (1964) - *Changes in the metabolic pattern of polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis*. « Br. J. Exp. Pathol. », 45, 548.
- [5] B. M. BABIOR (1978) - *Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes*. « N. Engl. J. Med. », 298, 659.
- [6] F. ROSSI, G. ZABUCCHI, P. DRI, P. BELLAVITE e G. BERTON (1980) -  $O_2^-$  and  $H_2O_2$  production during the respiratory burst in alveolar macrophages. In: *Macrophages and Lymphocytes « Nature, Functions and Interaction »*, Part A (M. R. Escobar and H. Friedman eds.), 53-74, Plenum Press, New York.
- [7] M. CIGADA LEONARDI (1958) - *Ricerche biologiche e morfologiche sulle Amebe*. « Istituto Lombardo », Scienze (B), 92, 431.
- [8] M. CIGADA LEONARDI (1964) - *Le Amebe d'acqua dolce*. « Natura e Montagna », Anno IV, 3, 111.
- [9] M. S. BINGLEY (1966) - *Membrane potentials in Amoeba proteus*. « J. Exp. Biol. », 45, 251.
- [10] F. ROSSI (1981) - *L'attività respiratoria dei fagociti. Meccanismi e funzioni*. In: *L'immunità nella patogenesi delle malattie*. « Atti XVI Congr. Naz. Soc. It. Patol. », Torino-Saint-Vincent, 13-15 ottobre, 165-192.
- [11] G. E. WISE e C. J. FLICKINGER (1970) - *Relation of the Golgi apparatus to the cell coat in Amoebae*. « Exp. Cell. Res. », 61, 13.
- [12] P. J. OATES e O. TOUSTER (1976) - *In vitro fusion of Acanthamoeba phagolysomes. I. Demonstration and quantitation of vacuole. Fusion in Acanthamoeba homogenates*. « J. Cell Biol. », 68, 319.

## SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

Fig. 1. - Fagocitosi di *Chlorella* da parte di *Amoeba proteus*.

- a) 100×.  
b) 200×.

Fig. 2. - Fagocitosi di *Tetrahymena pyriformis* da parte di *Amoeba proteus*.

- a) 100×.  
b) 400×.

