

Ultraestructura de *Acanthamoeba* sp. (Amebozoa, Acanthamoebidae)

Gertiser ML, Visciarelli E, Costamagna SR

Cátedra de Parasitología Clínica. Dpto. de Biología, Bioquímica y Farmacia.

Universidad Nacional del Sur. San Juan 670, (8000).Bahía Blanca, Buenos Aires.

Título abreviado: Ultraestructura de *Acanthamoeba*.

Correspondencia: e-mail: rcosta@uns.edu.ar

RESUMEN

Acanthamoeba sp., protozoo de amplia distribución ambiental, aislado de aguas dulces, salobres, aire y polvo atmosférico, alterna entre estadios de trofozoíto, pre-quiste y quiste. En el hombre causa queratitis, encefalitis granulomatosa amebiana y acanthamoebosis cutánea. El objetivo del presente estudio fue documentar la ultraestructura de *Acanthamoeba* sp., mediante Microscopía Electrónica de Transmisión. Para ello 50 ml de un aislamiento en medio MYAS de *Acanthamoeba* sp., aislada de un paciente con queratitis de la ciudad de Bahía Blanca (Argentina), se centrifugaron a 2000 RPM, 15 minutos y se fijaron en glutaraldehído 4%, post-fijaron con OsO₄, deshidrataron con etanol e incluyeron en resina Spurr. Los cortes ultrafinos fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las observaciones fueron realizadas utilizando un microscopio electrónico de transmisión marca JEOL modelo 100 CXII a 80 KV. Los resultados mostraron trofozoítos con diámetros de 5,1 a 11,1 µm, rodeados por membrana plasmática y forma irregular. Para la incorporación de partículas sólidas, se documentó el proceso fagocítico. No se evidenció endocitosis mediada por receptores. En el citoplasma se visualizaron ectoplasma y endoplasma, abundantes mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso y vacuolas digestivas. Las vacuolas de exclusión de agua presentaron contenidos lípidos, y aparecen rodeadas por un sistema de túbulos y vesículas. El núcleo se observó con un nucléolo central esférico. El pre-quiste, con diámetro de 5,8 a 8,8 µm se observó redondeado, sin proyecciones citoplasmáticas y rodeado de una sustancia amorfa. El quiste, de 4,1 a 8,9 µm de diámetro, con doble pared, compuesta por un exoquiste ondulado y un endoquiste poliédrico o estrellado, separados por un espacio. Este estadio

conservó las organelas de los trofozoítos, en un citoplasma más denso y algunos autofagosomas. El estudio de la estructura fina de *Acanthamoeba* sp., como la disposición de las mitocondrias y la organización de la pared quística ayudarían a comprender mejor su biología.

PALABRAS CLAVE: *Acanthamoeba*, Protozoos, Parásitos, Amebas de Vida Libre

ABSTRACT

Acanthamoeba sp. is a protozoan that is widely distributed in different compartments of the environment such as bodies of freshwater and brackish water, air and atmospheric particles. In humans cause keratitis, granulomatous amoebic encephalitis and cutaneous acanthamoebosis. The parasite is found as a trophozoite or a cystic, with a pre-cystic, transitional form between the two. The objective of the present work is to describe the ultrastructure of *Acanthamoeba* sp. isolated from a patient with keratitis, in the city of Bahía Blanca, Argentina. Fifty ml of an isolate of *Acanthamoeba* sp. were separated and placed in MYAS medium, centrifuged at 2,000 rpm for 15 min, fixed in 4% glutaraldehyde, additionally fixed with OsO₄, dehydrated with ethanol and embedded in Spurr resin. Ultrafine slices were contrasted using uranyl acetate and lead citrate. Preparations were observed using a transmission electron microscope (JEOL, 100 CXII a 80 KV). Result showed the presence of trophozoites that were irregularly shaped, measured 5.1-11.1 µm in diameter, and were surrounded by a plasmatic membrane. We observed phagocytosis in association with engulfment of solid particles, but no receptor mediated endocytosis was evident. Ectoplasm, endoplasm, abundant mitochondria, Golgi apparatus, rough endoplasmic reticulum, and digestive vacuoles were observed in the cytoplasm. Water exporting vacuoles presented clear contents and were surrounded by tubules and vesicles. The nucleus had a central and spherical nucleolus. The pre-cyst was spherical, with a diameter of 5.5-8.8 µm, it was surrounded by amorphous substance and lacked cytoplasmic projections. The cyst was 4.1-8.9 µm in diameter, with a double wall composed of an undulated exocyst and a polyhedric or star-shaped endocyst, both separated by a space. In this stage, *Acanthamoeba* sp., preserved the trophozoite organelles and some pre-cyst autophagosomas inside a denser cytoplasm. The ultrastructural study of *Acanthamoeba* sp., the position of mitochondria and the arrangement of cystic wall are important to better understand the biology of this parasite.

KEY WORDS: *Acanthamoeba*, Protozoan, Parasites, Free-living amoebae.

INTRODUCCION

Dentro del grupo de las Amebas de Vida Libre (AVL) capaces de actuar como patógenos para el hombre, *Acanthamoeba* sp., (Amebozoa, Acanthamoebidae) [1] representa la especie aislada con mayor frecuencia. Fue hallada en agua dulce, salada, envasada, en sedimentos oceánicos, en muestras de polvo y aire [2].

El estudio de esta AVL ha ido en ascenso desde el descubrimiento de su potencial como patógeno en 1958 [3]. *Acanthamoeba* puede ocasionar: Encefalitis Granulomatosa Amebiana (EGA), Acanthamoebosis Cutánea (AC) y Sinusitis en pacientes inmunocomprometidos, además de Queratitis Amebiana (QA) en individuos inmunocompetentes [4-6]. El número de casos de QA ha aumentado en los últimos años debido al uso masivo de lentes de contacto que representa su principal factor de riesgo [7].

En su ciclo de vida *Acanthamoeba* presenta dos estadios bien definidos: trofozoítos y quistes. El trofozoíto es el estadio metabólicamente activo, capaz de replicarse y responsable del daño en los tejidos infectados. El quiste es el elemento de resistencia y diseminación [8, 9].

Inicialmente, los estudios sobre este género se hicieron por microscopía óptica de campo claro, lo que permitió la descripción de sus características morfológicas [10-12]. En los trofozoítos es característica la presencia de acantópodos, que son proyecciones citoplasmáticas espinosas, presentan núcleo único con cromatina central esférica, y vacuolas de exclusión de agua. El quiste se presenta con una doble pared característica compuesta por exoquiste y endoquiste. Estos caracteres morfológicos fueron enunciados por Page como criterio para su ubicación taxonómica a nivel de género [13-15].

Posteriormente, las características morfológicas de sus quistes, se utilizaron para la clasificación de las especies de *Acanthamoeba* en tres Grupos [16].

En cuanto a la ultraestructura de los diferentes estadios de *Acanthamoeba*, los principales estudios fueron realizados en la década del 60' por Bowers y Korn [13, 17] quienes describieron sus caracteres estructurales y posteriormente se realizaron estudios por microscopía electrónica de los procesos de enquistamiento y desenquistamiento [18-20]. El objetivo de este trabajo fue realizar el análisis

morfológico ultraestructural, por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de una cepa de *Acanthamoeba* sp., aislada de un paciente con QA en la ciudad de Bahía Blanca, Argentina.

MATERIALES Y METODOS

Cepa de *Acanthamoeba*: se trabajó con el cultivo de una cepa aislada de un paciente con queratitis producida por este protozoo, en la ciudad de Bahía Blanca, Argentina, el cual fue clasificado morfológicamente como perteneciente al género *Acanthamoeba*, Grupo II. La ubicación genérica fue confirmada mediante PCR según los protocolos publicados por Schroeder et al., 2001 [21] y Booton 2002 [22]. Se utilizó el par JDP1 (5'-GGC CCA GAT CGT TTA CCG TGA A-3')/JDP2 (5'-TCT CAC AAG CTG CTA GGG GAG TCA-3'), específicos para el género *Acanthamoeba*. La cepa se repicó en medio líquido MYAS (extracto de maltosa 0,1 gr, extracto de levadura 0,1 gr y solución de Page 1000 ml) con una suspensión de *Escherichia coli*. Se incubó durante 2 meses a 37 °C para la obtención de quistes maduros.

Para el análisis de quistes se tomó una alícuota de 20 ml de este cultivo. Para estudiar los trofozoítos, 48 hs antes de procesar las muestras para TEM, se tomó una alícuota de 20 ml en frasco

estéril y se le agregó una suspensión de bacterias para inducir el desenquistamiento.

Microscopía electrónica: Para TEM, las alícuotas (20 ml) se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 minutos descartando el sobrenadante. Desde ese momento y hasta el final de la deshidratación el procesamiento se realizó a 4°C.

Se procedió según la técnica publicada por Costamagna and Prado Figueroa, 2001 [23]. El sedimento (0,5 ml) se fijó con igual volumen de glutaraldehído al 2% en solución de Page. Luego se efectuó la post fijación con OsO₄ al 1%. A continuación se lavó con Page y posteriormente con buffer maleato 0,05M, pH5. Luego se colocó en solución de acetato de uranilo al 0,5% en buffer maleato. A continuación se procedió a la deshidratación con etanol en graduaciones crecientes, 25; 50 y 75%. Se dejó por 24 horas a 4°C y luego se realizó un pasaje por etanol al 75%, para finalizar con una deshidratación en etanol al 100%.

El pellet final fue incluido en resina Spurr. Los cortes ultrafinos (100 micrones) recogidos sobre grillas de cobre de 200 Mesh, fueron contrastados con acetato de uranilo 3% y citrato de plomo. Las observaciones fueron

realizadas utilizando un microscopio electrónico de transmisión marca JEOL modelo 100 CXII a 80 KV. Las micrografías fueron tomadas con SO-163 Kodak electrón Image-film.

RESULTADOS

Trofozoítos (Figura 1)

Debido a la emisión de pseudópodos y acantópodos, los trofozoítos se presentaron con formas diversas y contorno irregular.

En las micrografías se documentaron trofozoítos de 4,3 a 11 μm de diámetro.

La masa citoplasmática se observó dividida en dos zonas: citoplasma hialino, o ectoplasma, adyacente a la membrana plasmática, conteniendo pequeños elementos formes, como gránulos, ribosomas libres y pequeñas vesículas; y un endoplasma, compuesto por la porción de citoplasma más interna que contiene todas las organelas y vacuolas de mayor tamaño.

En el endoplasma se visualizaron: gotas de lípidos (GL) de 0,2 a 0,85 μm de diámetro, dispersas en el citoplasma, y glucógeno (Glu) como gránulos simples o formando rosetas. Retículo Endoplásmico Rugoso (RER), pudo observarse rodeando el endoplasma. Vacuolas digestivas (VD): en su interior fue posible observar material ingerido en diferentes grados de descomposición.

Su tamaño varió entre 0,2 μm y 1,7 μm de diámetro.

Vacuolas de exclusión de agua (VEA), cuya función es la de mantener la osmolaridad de la célula, se distinguen de las anteriores por su contenido lípido, presentes con diferentes tamaños, menores a 0,1 μm a 2,7 μm y distribuidas por todo el endoplasma. También pudieron observarse numerosas mitocondrias (Mit), redondas o esféricas, de 0,1 μm a 1,2 μm de diámetro, algunas rodeando las VEA.

Un único núcleo (N) se observó, de 1,9 μm a 3,8 μm de diámetro, con un nucléolo compacto, central y esférico, de 1,4 μm a 1,9 μm , característica distintiva del género (Figura 1).

En la Figura 1 (círculos) también pueden visualizarse bacterias en contacto con el citoplasma, las que probablemente serán ingeridas, y una serie de vacuolas digestivas con material en distintos grados de descomposición que indican el camino que siguen las partículas fagocitadas.

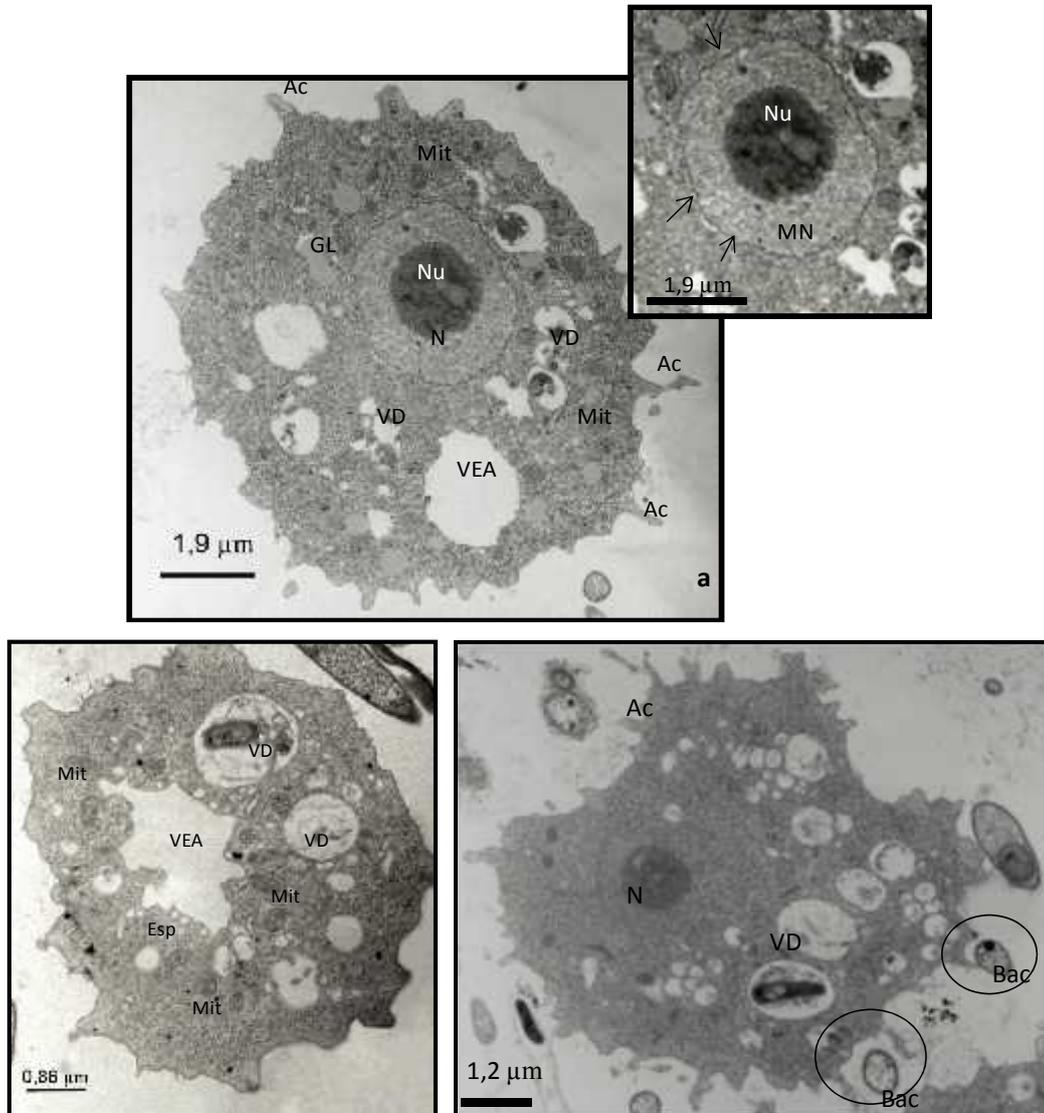


Figura 1: Trofozoítos de *Acanthamoeba* al TEM. Ac: acantópodos, Mit: mitocondrias, GL: gotas de lípidos, VD: vacuolas digestivas, VEA: vacuolas de exclusión de agua, MN: membrana nuclear, N: núcleo. Nu: nucléolo, G: complejo de Golgi, Ec: ectoplasma, En: endoplasma, Seu: seudópodo, RER: retículo endoplásmico rugoso, Esp: Espongioma, Bac: bacterias, Glu: glucógeno.

Prequiste y Quiste (Figura 2)

Frente a situaciones de stress tales como cambios en la osmoralidad del medio, alteraciones del pH, variaciones de temperatura o falta de nutrientes, *Acanthamoeba*, dispara un mecanismo de diferenciación que concluye con la formación del quiste. Básicamente este proceso consiste en una deshidratación, con reducción del volumen celular y eliminación de material celular innecesario para el mismo [17, 18, 24]. Inicialmente se produce la reabsorción de seudópodos y acantópodos, con lo que la célula se redondea, constituyéndose el prequiste. Alrededor del cual se forma una capa amorfa (SA) que en el quiste maduro forma el exoquiste [17, 19, 20]. Durante el enquistamiento se forman los autofagosomas (AF), con las funciones de eliminar material celular en exceso y de proveer energía para la maduración del quiste [25]. Como resultado de este proceso de diferenciación se obtiene un elemento muy resistente, que es el quiste maduro, con un diámetro de 4,1 μm a 8,9 μm . Éste está rodeado por una doble pared compuesta por el exoquiste, de 0,1 a 0,3 μm de grosor, más externo y el endoquiste, de 0,06 a 0,2 μm , más interno. Entre las dos paredes que presenta el quiste maduro se observa un espacio, de 0,35 a 2,2 μm , que sólo es

interrumpido en los puntos en que se forman los ostiolos (Os). También se puede observar un espacio, no electrondenso, bien definido entre la pared interna del quiste, el endoquiste, y la membrana plasmática, de 0,06 a 0,1 μm . Las imágenes muestran (Figura 2) que en un punto se fusionan exo y endoquiste, para delimitar un espacio libre de pared, aunque la capa más externa del exoquiste se continúa sobre esta zona que en el centro está ocupada por el opérculo (Op), una porción de 0,8 a 1,3 μm de diámetro de ambas capas fusionadas, que actúa a modo de tapón. En su citoplasma el quiste conserva las organelas del trofozoíto, además de algunos autofagosomas de la etapa prequística, inmersos en un citoplasma más denso. Las VEA se destacan por su contenido lípido en el citoplasma condensado, observándose colapsadas y rodeadas de pequeñas vesículas. Las mitocondrias, de 0,2 a 0,8 μm , se observan reducidas en tamaño, pero conservando su estructura, aunque con una matriz mucho más densa. Núcleo y nucléolo también reducen su tamaño; en el quiste sus diámetros son de 2, 4 y 1,1 μm , respectivamente (Figura 2).

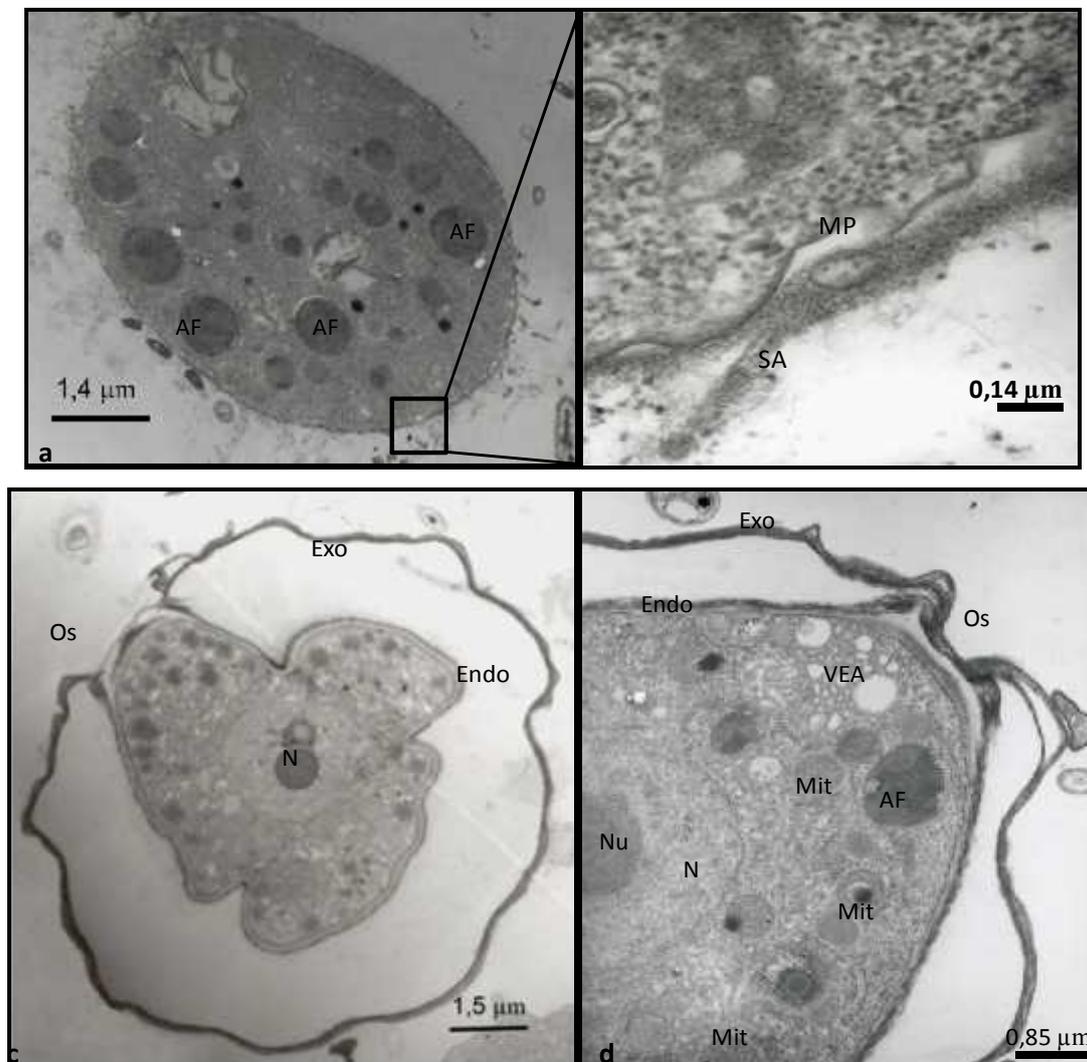


Figura 2: micrografías por TEM del estadio prequiescente de *Acanthamoeba* (arriba). Abajo: Quistes maduros de *Acanthamoeba* al TEM. AF: autofagosomas, MP: membrana plasmática, SA: sustancia amorfa, Exo: exoquiste, Endo: endoquiste, Os: ostiolo, VEA: vacuola de exclusión de agua, Mit: mitocondrias, N: núcleo, Nu: nucléolo, GL: gotas de lípidos, Op: opérculo.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

En los trofozoítos de *Acanthamoeba* la locomoción se realiza por la emisión de pseudópodos hialinos [26]. Además, desde su superficie se forman subpseudópodos, tipo filópodos: proyecciones ectoplasmáticas espinosas, denominados acantópodos, derivado del griego *acanth*: aguja, que es lo que le da nombre al género [27, 28]. Como muestran las imágenes obtenidas por nosotros, esto resulta en una amplia variabilidad de formas y tamaños en el trofozoíto.

Estas prolongaciones citoplasmáticas intervienen también en la captura del alimento y su posterior endocitosis, y en la adhesión de la ameba a células hospedadoras u otras superficies [29].

Estructuralmente la membrana plasmática de *Acanthamoeba* es común a la de otras células eucariotas.

En nuestras micrografías se puede observar que numerosas mitocondrias rodean este sistema, lo cual resulta lógico por el gran gasto de energía que supone mantenerlo activo y regular así la osmolaridad de la ameba. El quiste representa el elemento de resistencia, esto se debe principalmente a su doble pared, la que actúa como una barrera impermeable impidiendo el contacto de la célula con las sustancias del medio.

Se sabe que la salida del trofozoíto se produce a través de ostiolo y con remoción

del opérculo [30]. El ostiolo, con un diámetro de 1,6 a 2,4 μm , es un espacio libre de pared quística que sirve de puerta de salida al trofozoíto naciente y permite el monitoreo del medio externo para conocer en qué momento iniciar el desenquistamiento [19, 29].

En este trabajo demostramos que la técnica modificada por Costamagna, *et al* [23] para el procesamiento de protozoos para la observación por MET es adecuada para el estudio de *Acanthamoeba* sp., en todos sus estadios.

El análisis de las microfotografías confirma los resultados de Bowers & Korn [13, 17], demostrando que la ultraestructura de los trofozoítos de *Acanthamoeba* no difiere significativamente de la de otras células eucariotas.

La formación de quistes ante situaciones adversas de crecimiento es una estrategia de supervivencia, compartida con otros protozoos, extremadamente exitosa, que le permite resistir ambientes hostiles por tiempo prolongado conservando su viabilidad y capacidad infectiva.

Las características estructurales del quiste ayudan a comprender la resistencia de *Acanthamoeba* sp., en condiciones desfavorables

El estudio del proceso de enquistamiento y desenquistamiento, tanto ultraestructural

como molecular, permitiría conocer estados o etapas de mayor vulnerabilidad de *Acanthamoeba* para lograr tratamientos efectivos que conduzcan a la resolución favorable de los casos clínicos.

BIBLIOGRAFIA CITADA

1. Adl et al. The International Society of Protozoologists, 2005. (J. Eukariot. Microbiol. 52(5): 399-451)
2. Marciano-Cabral, F., Cabral, G., 2003. *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. Clin. Microbiol. Rev. 16 (2), 273-307.
3. Culbertson, C.G., Smith, J.W., Minner, J.R., 1958. *Acanthamoeba*: observations on animal pathogenicity. Science 127, 1506.
4. Scaglia, M., 1997. Human pathology caused by free-living amoebae. Ann. Ist. Super. Sanita. 33 (4), 551-66.
5. Helton, J., Loveless, M., White, C.R., 1993. Cutaneous *Acanthamoeba* infection associated with leukocytoclastic vasculitis in an AIDS patient. Am. J. Dermatopathol. 15, 146-149.
6. Dunand, V.A., Hammer, S.M., Rossi, R., Poulin, M., Albrecht, M.A., Doweiko, J.P., et al. 1997. Parasitic sinusitis and otitis in patients infected with human immunodeficiency virus: report of five cases and review. Clin. Infect. Dis. 25, 267-272.
7. Niederkorn, J.Y., Alizadeh, A., Leher, H., McCulley, J.P., 1999. The pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. Microbes and Infection. 437-43.
8. Visvesvara, G.S., Moura, H., Schuster, F.L., 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*; and *Sappinia diploidea*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 50, 1-26.
9. Oddó, D.B. 2006. Infecciones causadas por amebas de vida libre. Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anátomo-clínicos. Rev. Chil. Infec. 23 (3), 200-214.
10. Singh, B.N., 1952. Nuclear division in nine species of small free-living amoebae and its bearing on the classification of the order amoebida. Phil. Trans. Roy. Soc. (London) Ser. B. 236:405.
11. Neff, R.J., 1957. Purification, axenic cultivation, and description of a soil amoeba, *Acanthamoeba* sp. J. Protozool. 4, 176.
12. Page, F.C., 1967. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. J. Protozool. 14, 709-724.
13. Bowers, B., Korn, E., 1968. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii*. I The Trophozoite. J. Cell. Biol. 39, 95-111.
14. Byers, T.J., 1979. Growth, reproduction, and differentiation in *Acanthamoeba*. Int. Rev. Cytol. 61, 283-338.
15. Page, W.C., 1976. An illustrated key to freshwater and soil amoebae, with notes on

- cultivation and ecology. Fresh. Boil. Ass. Sci. Publ. 34, 1-155
16. Pussard, M., Pons, R., 1977. Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*. 13, 557-610.
17. Bowers, B., Korn E., 1969. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain) II Encystment. *J. Cell. Biol.* 41, 786-805.
18. Lloyd, D., Turner, N.A., Khunkitti, W., Hann, A.C., Furr, J.R., Russell, A.D., 2001. Encystation in *Acanthamoeba castellanii*: development of biocide resistance. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48, 11–16.
19. Chávez-Munguía, B., Omaña-Molina, M., González-Lázaro, M., Gonzáles-Robles, A., Bonilla, P., Martínez-Palomo, A., 2005. Ultrastructural Study of Encystation and Excystation in *Acanthamoeba castellanii*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52 (2), 153-158.
20. Chávez-Munguía, B., Omaña-Molina, M., González-Lázaro, M., González-Robles, A., Cedillo-Rivera, R., Bonilla, P., Martínez-Palomo, A., 2007. Ultrastructure of cyst differentiation in parasitic protozoa. *Parasitol. Res.* 100, 1169–1175
21. Schroeder, J.M., Booton, G.C., Hay, J., Niszl, I.A., Seal, D.V., Markus, M.B., et al. 2001. Use of Subgenic 18S Ribosomal DNA PCR and Sequencing for Genus and Genotype Identification of *Acanthamoebae* from Humans with Keratitis and from Sewage Sludge. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1903-11.
22. Booton, G.C., Kelly, D.J., Chu, Y.W., Seal, D.V., Houang, E., Lam, D.S.C., Byers, T.J., Fuerst, P.A., 2002. 18S Ribosomal DNA Typing and Tracking of *Acanthamoeba* Species Isolates from Corneal Scrape Specimens, Contact Lenses, Lens Cases, and Home Water Supplies of *Acanthamoeba* Keratitis Patients in Hong Kong. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1622-1625.
23. Costamagna, S.R., Prado Figueroa, M., 2001. On the ultrastructure of *Trichomonas vaginalis*: cytoskeleton, endocytosis and hydrogenosomes. *Parasitol. al día.* 25(3-4), 100-108.
24. Gutiérrez, J.C., Callejas, S., Borniquel, S., Benítez, L., Martín-González, A., 2001. Ciliate crytobiosis: a microbial strategy against enviromental starvation. *Int. Microbiol.* 4, 151-157.
25. Neff, R.J., Benton, W.F., Neff, H., 1964. The composition of the mature cyst wall of the soil ameba *Acanthamoeba* sp. *J. Cell. Biol.* 23, 66A.
26. Khan, N.A., 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 564-595.
27. Khan, NA. 2009. *Acanthamoeba*: Biology and Pathogenesis. Caister Academic Press, Norfolk. UK. Castellani A., 1930. An amoeba found in culture of yeast: preliminary note. *J. Trp. Med. Hyg.* 33,160.

28. Alsan, S., Sissons, J., Dudeley, R., Khan, NA., 2005. Mechanisms associated with *Acanthamoeba castellanii* (T4) phagocytosis. *Parasitol. Res.* 96, 402-409.
29. Chambers, J.A., Thompson, J.E., 1972. A scanning electron microscopy study of the excystment process of *Acanthamoeba castellanii*. *Exp. Cell. Res.* 73, 415–421.