



Universidad
Nacional
de Loja

Universidad Nacional de Loja

Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables

Carrera de Ingeniería Ambiental

Viabilidad de *Acanthamoeba castellanii* frente a virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño

Trabajo de Integración Curricular,
previo a la obtención del título de
Ingeniera Ambiental

AUTOR:

Claudia Elizabeth Freire González

DIRECTORA:

Ing. Daniela Alejandra Román Cáceres., Mg.Sc.

Loja – Ecuador

2024



UNL

Universidad
Nacional
de Loja

Sistema de Información Académico
Administrativo y Financiero - SIAAF

CERTIFICADO DE CULMINACIÓN Y APROBACIÓN DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Yo, **ROMAN CACERES DANIELA ALEJANDRA**, director del Trabajo de Integración Curricular denominado **Viabilidad de Acanthamoeba castellanii frente a virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño.**, perteneciente al estudiante **CLAUDIA ELIZABETH FREIRE GONZALEZ**, con cédula de identidad N° **0705641322**.

Certifico:

Que luego de haber dirigido el **Trabajo de Integración Curricular**, habiendo realizado una revisión exhaustiva para prevenir y eliminar cualquier forma de plagio, garantizando la debida honestidad académica, se encuentra concluido, aprobado y está en condiciones para ser presentado ante las instancias correspondientes.

Es lo que puedo certificar en honor a la verdad, a fin de que, de así considerarlo pertinente, el/la señor/a docente de la asignatura de **Integración Curricular**, proceda al registro del mismo en el Sistema de Gestión Académico como parte de los requisitos de acreditación de la Unidad de Integración Curricular del mencionado estudiante.

Loja, 26 de Julio de 2024



Firmado electrónicamente por:
DANIELA ALEJANDRA
ROMAN CACERES

F)

DIRECTOR DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN
CURRICULAR



Certificado TIC/TT.: UNL-2024-001347

1/1

Educamos para **Transformar**

Autoría

Yo, **Claudia Elizabeth Freire González**, declaro ser autor/a del presente Trabajo de Integración Curricular y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos y acciones legales, por el contenido del mismo. Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación de mi Trabajo de Integración Curricular en el Repositorio Institucional – Biblioteca Virtual.

Firma:



Cédula de identidad: 0705641322

Fecha: 14 de noviembre de 2024

Correo electrónico: claudia.freire@unl.edu.ec

Teléfono: 0939913205

Carta de autorización por parte de la autora para la consulta, reproducción parcial o total y/o publicación electrónica del texto completo, del Trabajo de Integración Curricular

Yo **Claudia Elizabeth Freire González**, declaro ser autora del Trabajo de Integración Curricular titulado **Viabilidad de *Acanthamoeba castellanii* frente a virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño**, como requisito para optar el título de **Ingeniera Ambiental**, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que, con fines académicos muestre la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el Repositorio Institucional, en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja no se responsabiliza por el plagio o copia del Trabajo de Integración Curricular que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los catorce días del mes de noviembre del dos mil veinte y cuatro.

Firma:



Autora: Claudia Elizabeth Freire González

Cédula: 0705641322

Dirección: Ciudadela Julio Ordóñez, Loja, Ecuador

Correo electrónico: claudia.freire@unl.edu.ec

Celular: 0939913205

DATOS COMPLEMENTARIOS:

Directora del Trabajo de Integración Curricular: Ing. Daniela Alejandra Román Cáceres.,
Mg.Sc.

Dedicatoria

A mis seres queridos. A mis amados padres,
Danilo y Fátima. A mis amadas hermanas,
Danielita y Naylita. A mis amados abuelitos.

Claudia Elizabeth Freire González

Agradecimiento

Gracias a las circunstancias. A mi amada e incondicional familia, en especial a mis padres. A mis amigos y compañeros especiales. A cada buen docente. A cada cátedra y establecimiento. A cada persona que hizo de esta etapa, un instante hermoso y de enriquecimiento personal y académico.

Claudia Elizabeth Freire González

Índice de contenidos

Portada	i
Universidad Nacional de Loja	i
Certificación	ii
Autoría	iii
Carta de autorización	iv
Dedicatoria	v
Agradecimiento	vi
Índice de contenidos	vii
Índice de tablas.....	x
Índice de figuras	xi
Índice de anexos	xiv
1. Título	1
2. Resumen	2
Abstract	3
3. Introducción	4
4. Marco teórico	7
4.1. Virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño (NCLDV)s	7
4.2. Amebas de vida libre	8
4.3. Género <i>Acanthamoeba</i>	9
4.4. Ciclo de vida del género <i>Acanthamoeba</i>	10
4.5. <i>Acanthamoeba</i> en laboratorio.....	11
4.6. Aislamiento de virus gigantes (GV) y el género <i>Acanthamoeba</i>	11
4.7. <i>Acanthamoeba castellanii</i>	12
4.8. <i>Acanthamoeba castellanii</i> como medio de aislamiento GV	12
4.9. Ciclo de infección de <i>Acanthamoeba castellanii</i> con GV.....	13
4.10. <i>Acanthamoeba castellanii</i> y GV en el ambiente	14

5. Metodología.....	15
5.1. Área de estudio.....	15
5.2. Diseño de investigación	16
5.3. Desarrollo de cultivos monoxénicos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC 30010 de agua de diferentes ecosistemas lacustres.....	17
5.3.1. Muestreo de agua de ecosistemas lacustres.....	17
5.3.2. Filtración de la muestra	18
5.3.3. Cultivo axénico de <i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC 30010	18
5.3.4. Dilución del cultivo axénico de <i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC 30010	18
5.3.5. Contabilización de <i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC 30010.....	19
5.3.6. Inoculación de células de <i>Acanthamoeba castellanii</i> con muestras de agua ...	20
5.4. Identificación de los efectos citopáticos (CPE) en <i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC 30010 luego de la infección.....	22
5.4.1. Efectos citopáticos (CPE) en <i>Acanthamoeba castellanii</i>	22
5.4.2. Análisis de datos sobre la viabilidad de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	23
5.4.2.1. Análisis gráfico	23
5.4.2.2. Análisis estadístico	24
5.5. Identificación o determinación de virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño infectantes de acuerdo a los CPE de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	25
6. Resultados	25
6.1. Desarrollo de cultivos monoxénicos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC 30010 de agua de diferentes ecosistemas lacustres.....	25
6.2. Identificación de los efectos citopáticos (CPE) en <i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC 30010 luego de la infección.....	29
6.2.1. Efectos citopáticos (CPE) en <i>Acanthamoeba castellanii</i>	29
6.2.2. Análisis de datos sobre la viabilidad de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	33
6.2.2.1. Análisis gráfico	33
6.2.2.2. Análisis estadístico	42
6.3. Identificación o determinación de posibles virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño infectantes de acuerdo a los CPE de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	45
7. Discusión	49

8.	Conclusiones	56
9.	Recomendaciones	57
10.	Bibliografía	58
11.	Anexos	66

Índice de tablas

Tabla 1. Tratamientos y controles durante la inoculación de <i>Acanthamoeba castellanii</i> con muestras ambientales.....	22
Tabla 2. Parámetros resultantes de las muestras de agua de los cuatro ecosistemas lacustres de la ciudad de Loja	26
Tabla 3. Evidencia y descripción de los CPE identificados en los ecosistemas lacustres de la ciudad de Loja	31

Índice de figuras

Figura 1. Área de estudio, donde se muestran los ecosistemas lacustres de la ciudad de Loja, provincia Loja, Ecuador.	15
Figura 2. Disposición de controles negativos (C-) y positivos (C+), de blancos (B) y de los tres tratamientos de los inóculos ambientales (1:1, 1:10 y 1:20) de los cuatro ecosistemas lacustres de la ciudad de Loja, en la microplaca de 96 pocillos.....	20
Figura 3. Cultivo axénico de 100,00 µl de <i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC 30010 inoculada en 25,00 ml de medio PYG. Confluencia celular del 100 % mediante microscopía invertida A) lente 10 x, B) lente 20 x, y C) lente 40 x. Confluencia celular del 90 % mediante microscopía invertida D) lente 10 x, E) lente 20 x, y F) lente 40 x.....	27
Figura 4. Cultivo axénico de 10,00 µl de <i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC 30010 inoculada en 50,00 ml de medio PYG, con una confluencia celular del 60 % vista con microscopía invertida A) lente 10 x; B) y C) lente 40 x; y, D) lente 40 x, con evidencia de división celular	28
Figura 5. Conteo de <i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC 30010 por microlitro, inoculada en una proporción de 10,00 µl de amebas por 50,00 ml de medio PYG, en una cámara de Neubauer mediante microscopía invertida.....	29
Figura 6. Cultivos axénicos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC 30010 en pocillos de la microplaca de 96 pocillos para los controles y tratamientos de las cuatro lagunas, reflejando la viabilidad inicial de las amebas antes de infectarlas, vistas con microscopía invertida. A) lente 20 x; B) lente 40 x, con evidencia de división celular; y, C) lente 40 x.....	29
Figura 7. Cultivos monoxénicos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC 30010 en pocillos de la microplaca de 96 pocillos de los ecosistemas lacustres. A) Blanco (medio PYG). B) Control negativo con Hipoclorito de sodio al 0,5 %. Y los controles positivos de las lagunas con vista microscópica invertida con lente 10 x: C) y D).....	30
Figura 8. Curvas de infección del desprendimiento de la monocapa (CPE) producto del promedio de las tres repeticiones por cada uno de los tres tratamientos en función del tiempo, con sus barras de error respecto del control positivo. A) Laguna Daniel Álvarez Burneo, B) Laguna Jipiro, C) Laguna Carigán, D) Laguna Punzara	33
Figura 9. Curvas de infección de la reducción del tamaño celular (CPE) producto del promedio de las tres repeticiones por cada uno de los tres tratamientos en función del tiempo, con sus	

barras de error respecto del control positivo. A) Laguna Daniel Álvarez Burneo, B) Laguna Jipiro, C) Laguna Carigán, D) Laguna Punzara	35
Figura 10. Curvas de infección de la reducción de las vacuolas (CPE) producto del promedio de las tres repeticiones por cada uno de los tres tratamientos en función del tiempo, con sus barras de error respecto del control positivo. A) Laguna Daniel Álvarez Burneo, B) Laguna Jipiro, C) Laguna Carigán, D) Laguna Punzara	36
Figura 11. Curvas de infección del redondeo celular (CPE) producto del promedio de las tres repeticiones por cada uno de los tres tratamientos en función del tiempo, con sus barras de error respecto del control positivo. A) Laguna Daniel Álvarez Burneo, B) Laguna Jipiro, C) Laguna Carigán, D) Laguna Punzara	37
Figura 12. Curvas de infección del redondeo celular agrupado (A) y agrupamiento celular (B) producto del promedio de las tres repeticiones por cada uno de los tres tratamientos en función del tiempo, con sus barras de error respecto del control positivo, de la laguna Daniel Álvarez Burneo	38
Figura 13. Curvas de infección de la lisis celular (CPE) producto del promedio de las tres repeticiones por cada uno de los tres tratamientos en función del tiempo, con sus barras de error respecto del control positivo. A) Laguna Daniel Álvarez Burneo (lisis en agrupamiento), B) Laguna Jipiro, C) Laguna Carigán, D) Laguna Punzara	40
Figura 14. Curvas de células sanas producto del promedio de las tres repeticiones por cada uno de los tres tratamientos en función del tiempo, con sus barras de error respecto de las células sanas (trofozoíto) del control positivo. A) Laguna Daniel Álvarez Burneo, B) Laguna Jipiro, C) Laguna Carigán, D) Laguna Punzara	41
Figura 15. Gráfica de análisis multivariado <i>Non-metric Multidimensional Scaling</i> (MDS) aplicando distancias Euclidianas sobre la dispersión o variabilidad entre los grupos de datos de cada ecosistema lacustre (negro: Laguna Daniel Álvarez Burneo; verde: Laguna de Jipiro; turquesa: Laguna de Carigán; naranja: Laguna de Punzara).....	42
Figura 16. Gráficos de dispersión de puntos (PERMANOVA) sobre la similitud de infección viral (número de células de <i>Acanthamoeba castellanii</i> infectadas) de los diferentes CPE identificados entre ecosistemas lacustres (D: Laguna Daniel Álvarez Burneo; J: Laguna de Laguna de Jipiro; C: Laguna de Carigán; P: Laguna de Punzara). Las variables están agrupadas considerando los tiempos post infección, los tres tratamientos y las tres repeticiones	

correspondientes a cada tratamiento de cada ecosistema lacustre en función del número de células..... 43

Figura 17. Comparación entre variables o CPE registrados respecto de las medias significativamente diferentes mediante la prueba de Friedman 44

Índice de anexos

Anexo 1. Procedimiento para desarrollar cultivos axénicos y monoxénicos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC 30010	66
Anexo 2. Certificado de traducción del resumen	67

1. Título

Viabilidad de *Acanthamoeba castellanii* frente a virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño

2. Resumen

Los virus gigantes (GV) son entes ubicuos igual que sus hospederos. El reconocimiento de *Acanthamoeba castellanii* como hospedero de laboratorio por excelencia para identificar GV, es una herramienta para inquirir en ecosistemas aún inexplorados en materia de GV, la cual consiste en reconocer la viabilidad de la ameba frente a una posible infección viral. Esta investigación desarrolló cultivos axénicos de *Acanthamoeba castellanii* diluidos y cultivos monoxénicos de *Acanthamoeba castellanii* con inóculos ambientales con sospecha de presencia de GV provenientes de las lagunas de Daniel Álvarez, Jipiro, Punzara y Carigán, pertenecientes a la ciudad de Loja, Ecuador. Las inoculaciones de muestras ambientales se realizaron en tres concentraciones (1:1, 1:10, 1:20) por triplicado. Se efectuaron curvas de infección del número de células con efectos citopáticos (CPE) registrados del análisis de imágenes mediante microscopía de lapso de tiempo (148 h) y análisis estadísticos (MDS). Se compararon los CPE registrados en este estudio con los de estudios publicados, para determinar los posibles GV infectantes. Así, se logró obtener cepas activas de cultivos axénicos diluidos con una disposición espacial que posteriormente a la generación de cultivos monoxénicos, permitió la captura de imágenes microscópicas e identificación de CPE. Los inóculos ambientales 1:1 y 1:10 no fueron significativamente diferentes, mientras que los 1:20 sí. Los tratamientos de las lagunas de Jipiro, Carigán y Punzara mostraron desprendimiento de la monocapa, disminución del tamaño, redondeo celular y de vacuolas y, lisis celular, por la posible presencia de Mimivirus; mientras que los tratamientos de la laguna Daniel Álvarez Burneo, mostraron adicionalmente racimos celulares, por la presunta presencia de Tupanvirus. Así, se concluye que la viabilidad de *Acanthamoeba castellanii* se vio comprometida diferencialmente respecto de las muestras ambientales inoculadas, de las cuales se visualizaron CPE distintos ocasionados por la interacción entre amebas y posiblemente GV.

Palabras clave: *Acanthamoeba castellanii*, cultivos celulares, efectos citopáticos, infección viral, virus gigantes.

Abstract

Giant viruses (GV) are ubiquitous, just like their hosts. The recognition of *Acanthamoeba castellanii*'s as the laboratory host of excellence for GM identification is a tool to investigate yet unexplored GM ecosystems, which consists in recognizing the viability of amoeba against a possible viral infection. This research developed axenic cultures of *Acanthamoeba castellanii* diluted and monoxenic cultures of *Acanthamoeba castellanii* with environmental inoculums suspected of GM from the lagoons of Daniel Álvarez, Jipiro, Punzara and Carigán, belonging to the city of Loja, Ecuador. Inoculations of environmental samples were performed in three different concentrations (1:1, 1:10, 1:20) in triplicate. Infection curves were made for the number of cells with cytopathic effects (CPE) recorded from time-lapse microscopy (148h) and statistical analysis (MDS) imaging. The CPEs recorded in this study were compared with those of published studies to determine potential infective GVEs. Thus, it was possible to obtain active strains of diluted axenic cultures with a spatial arrangement that subsequently to the generation of monoxenic cultures, allowed the capture of microscopic images and identification of CPE. The 1:1 and 1:10 environmental inoculum were not significantly different, whereas the 1:20 did. The treatments of the Jipiro, Carigán and Punzara lagoons showed detachment of the monolayer, decrease in size, rounding of cells and vacuoles and cell lysis due to the possible presence of Mimivirus; while the treatments of the Daniel Álvarez Burneo lagoon also showed cell clusters, due to the suspected presence of Tupanvirus. Thus, it is concluded that the viability of *Acanthamoeba castellanii* was compromised differentially from the inoculated environmental samples, of which different CPEs were visualized caused by the interaction between amoebas and possibly GV.

Keywords: *Acanthamoeba castellanii*, cell cultures, cytopathic effects, viral infection, giant viruses.

3. Introducción

Entre la delgada línea de lo vivo y aquello que no lo está se hallan los virus, que ya poblaban la Tierra junto con las primeras células existentes, por lo que han tenido un largo proceso evolutivo alcanzando una diversidad viral global (1×10^{31}) aún desconocida (Alarcón y Flores, 2018), así como un árbol de linaje ancestral difícil de estructurar (Yamada, 2011; Brandes y Linial, 2019). Los virus son entidades biológicas replicantes que contienen un minúsculo material genético recubierto de una cápside que les permite infectar células, su único medio para crecer y replicarse, ya que son parasitarios intracelulares obligados (Contreras et al., 2017; Mateu, 2013). Inclusive, estas entidades forman parte de la evolución de sus hospederos y de importantes procesos ecológicos (Contreras et al., 2017).

Es por el estudio de la infección viral de *Acanthamoeba polyphaga* como una ameba hospedera que se reconoce a Mimivirus, el primer virus gigante (GV) descrito, los cuales se ubican como subcategoría en el grupo de virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño (NCLDVs, filo *Nucleocytoviricota*) creado en 2001, caracterizado por virus con genomas de ADN bicatenario (ADNs) diverso de mayor tamaño; de allí que se estudian a los hospederos para posteriormente lograr la identificación y el análisis genómico y proteómico de GV (Brandes y Linial, 2019; Dos Santos et al., 2021).

Los GV se proponen como una subcategoría porque son entes capaces de codificar para proteínas que no se conocía (genes huérfanos u ORFans) que los virus podían producir, dado que contienen genes que antes se pensaban exclusivos de organismos celulares (Colson et al., 2017; Philippe et al., 2013). Además de ser responsables de la infección de muchos huéspedes eucariotas para hacer uso de su maquinaria transcripcional y replicarse en su citoplasma (Andrade et al., 2018; Colson et al., 2012b). Es así como los GV han logrado el interés científico para poder lograr incluirlos dentro del canon (Boyer et al., 2010).

Se ha demostrado que tanto los GV como sus huéspedes protozoos son ubicuos (Aherfi et al., 2016; Khalil et al., 2016), es decir, que se encuentran en todos los continentes. Una pequeña parte de GV se encuentran en suelos forestales, mares de gran profundidad y ríos de gran longitud (Andrade et al., 2018; Bäckström et al., 2019); mientras que la gran mayoría pertenecen específicamente a ecosistemas acuáticos como unidades de refrigeración de aguas

residuales, océanos, piscinas y lagos (Andreani et al., 2018; Aherfi et al., 2016); afirmación que comparte Takashi (2011), quien también indica que la mayoría de GV están en ambientes acuáticos asociados a protistas.

En lo que corresponde al estudio de GV en la región, se registran potenciales estudios en Brasil, donde a pesar de ser un país explotado en cuanto al estudio de GV se refiere, solo se han aislado tres entidades, especialmente de Mimivirus (Andrade et al., 2018), siendo el Yaravirus el más reciente encontrado en 2020 (Boratto et al., 2020). En Ecuador únicamente la Región Insular presenta interés en estudios sobre la presencia de virus por el peligro que estos representan a su diversidad silvestre (Dornas et al., 2015), pero no se detallan investigaciones que indiquen la identificación de GV amebales en el territorio ecuatoriano.

Las investigaciones actualmente han centrado su interés en comprender y detallar cómo los GV actúan en las células del hospedero y en toda su maquinaria transcripcional para lograr expresar sus genes (Oliveira et al., 2017; Yutin et al., 2014) con el fin de asegurar su linaje, siendo el género *Acanthamoeba* identificado como un huésped idóneo para atrapar GV (Khalil et al., 2016). En esta línea, los cambios morfológicos y de comportamiento por los que atraviesan las células del huésped tras la infección viral del GV son conceptualizados como efectos citopáticos (CPE), los cuales se han observado en *Acanthamoeba* (Fukaya y Takemura, 2021). Los CPE generales producidos por un GV ocasionan cambios en el huésped tanto a nivel del contorno de la célula, volviéndola circular, como en las vacuolas, las cuales tienden a desintegrarse (Fukaya y Takemura, 2023).

Así es que estudios mencionan a *Acanthamoeba castellanii* como huésped de laboratorio por excelencia para identificar la mayoría de GV (La Scola et al., 2003) y según Khalil et al. (2016), esta ameba es un medio para aislar GV que antes no se habían podido aislar. Además, es claro que, el ciclo de infección en amebas ocurre de forma similar para muchos GV, pero es justamente la morfogénesis viral post infección donde ocurren variaciones según el GV que infecte (Boratto et al., 2020; Yoshikawa et al., 2019). De este modo el reciente estudio sobre GV y sus huéspedes representa nuevos desafíos para la comunidad científica y sobre todo para Ecuador, un país como muchos que aún no registran este tipo de investigaciones.

Además, el motor de este estudio fue brindar herramientas que permitan posteriormente indagar en recursos genéticos aún inexplorados en Ecuador. En este contexto, el estudio de *Acanthamoeba castellanii* como medio de identificación de GV y su posterior estudio genómico, representaría un recurso importante para las ciencias por ser controladores de las poblaciones amebales en las fuentes de agua, vectores de infecciones de este género (Nwachuku y Gerba, 2004), como el caso de la enfermedad “queratitis por *Acanthamoeba*” (Lorenzo-Morales et al., 2015). Es así que, el reconocimiento de las referencias sobre sus altos niveles de expresión abrirá posibilidades para fines biotecnológicos como factores demandados a la solución de desequilibrios en cuanto a salud humana y equilibrio ambiental (Oliveira et al., 2017).

A nivel ambiental, *Acanthamoeba castellanii* es precursora de los ciclos biológicos y biogeoquímicos (Santos y Carrapiço, 2011). Bonkowski (2004) indica que la ameba consume a los descomponedores primarios provenientes de la degradación de bacterias, liberando así minerales asimilables para el entorno. Además, establece que esta ameba apoya a la dinámica y equilibrio ecológico porque es depredadora amebal potencial de bacterias patógenas (*Cyanobacterias* y *Firmicutes*) y hongos en cuerpos de agua, además de ser predecesora de otras bacterias.

Si bien ya existen protocolos para el cultivo e infección de la ameba *Acanthamoeba castellanii*, el requerimiento actual es su descripción morfológica y de comportamiento luego de ser infectada, para ampliar la comprensión de cómo actúan estos entes replicantes en los hospederos para lograr identificarlos, siendo esto de lo cual trata la presente investigación. Así, la pregunta que surge es si ¿los efectos citopáticos en *Acanthamoeba castellanii* varían al ser infectada con posibles virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño (NCDLVs) provenientes de diferentes ecosistemas lacustres de la ciudad de Loja?, la cual pretende comprobar la conjetura de que el número de células viables de *Acanthamoeba castellanii* varían en el tiempo durante su exposición a posibles GV.

Para responder esta interrogante, se plantearon los siguientes objetivos: i) Desarrollar cultivos monoxénicos de *Acanthamoeba castellanii* y los posibles GV provenientes de la Laguna Carigán, la Laguna Jipiro, la Laguna Daniel Álvarez Burneo y la Laguna de Punzara, ecosistemas lacustres pertenecientes a la ciudad de Loja; además de ii) Identificar los CPE en

las células de *Acanthamoeba castellanii* luego de la infección, y describir las posibles especies de GV responsables de dichos CPE.

4. Marco teórico

4.1. Virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño (NCLDV's)

Aunque el 69 % de todos los virus descritos poseen un empaquetado genómico y una compresión de información tan pequeños con la capacidad de codificar para menos de 10 proteínas, también se presentan los virus gigantes (GV) que son más grandes a nivel proteómico, físico y genómico. De los cuales, de su escasa fracción reconocida, se sabe que presentan desde 500 hasta miles de genes codificadores de proteínas (Brandes y Linial, 2019).

Es en 2003 que se aísla el primer GV, el Mimivirus, gracias a la ameba *Acanthamoeba polyphaga*, el cual fue confundido en primera estancia, por la rareza de su gran tamaño en comparación con otros virus, con una bacteria. El tamaño del ADN bicatenario de estos virus varía de entre 350 kb hasta 2500 kb, con grandes partículas virales que presentan hasta 1,5 μm de longitud, esto según el GV analizado (Andrade et al., 2018). Lo anterior coincide con lo descrito por Fischer (2016), quien sugiere GV desde 100 kb hasta 2500 kb. Ese gran tamaño característico de los GV según estudios de Brandes y Linial (2019) hace que se puedan ver desde un microscopio óptico.

El grupo de virus nucleocitoplasmáticos de ADN grande o NCLDV's (filo *Nucleocytoviricota*) creado en 2001, presenta genomas de ADN bicatenario (ADNs) diverso de mayor tamaño capaces de codificar para proteínas que no se conocía (genes huérfanos u ORFans) que los virus podían producir (Colson et al., 2017; Philippe et al., 2013); además de ser responsables de la infección de muchos huéspedes eucariotas para hacer uso de su maquinaria transcripcional y poder replicarse en su citoplasma (Colson et al., 2012; Andrade et al., 2018). Es así como los GV han logrado el interés científico de estudiar los virus y clasificarlos para poder incluirlos dentro del canon (Boyer et al., 2010).

Los NCLDV's actualmente incluyen siete familias (Ascoviridae, Asfarviridae, Iridoviridae, Marseilleviridae, Mimiviridae, Phycodnaviridae y Poxviridae), las cuales se relacionan por las secuencias de la ADN polimerasa B y las longitudes del genoma de estos

virus. Así mismo, se ha revelado mediante análisis de amebas de *Acanthamoeba* en permafrost siberiano, que estos GV tienen una longevidad de 30 000 años, aunque su origen es aún un misterio evolutivo (Fischer, 2016).

En este contexto, Brandes y Linial (2019) explican que la mayoría de los GV se originan a partir de las células que parasitan secuestrando sus genes y secuencias genómicas, requiriendo un huésped, comúnmente una bacteria o una ameba para sobrevivir, desarrollarse y perpetuarse. Así también, estos GV se han identificado en ecosistemas diversos, pero mayormente acuáticos, incluyendo lagos y lagunas, y en otros diversos tipos de nichos geográficos y ecológicos. De igual forma, se debe recalcar que la similitud entre los GV y sus huéspedes es evidente en aquellos descritos hasta el momento, por lo que, al ser ubicuos, sus huéspedes comunes también lo son.

Por lo anterior, estos virus son reconocidos además como virus gigantes amebales, ya que sus hospederos típicos son las amebas, convirtiendo a estos protistas en un medio de aislamiento de GV (Andrade et al., 2018), razón por la que es necesario estudiar un GV en función de su huésped.

4.2. Amebas de vida libre

La investigación ejecutada por Salazar-Ardiles et al. (2022), recaba información sobre amebas describiéndolas como protistas unicelulares ubicuas, cuya presencia resalta en ambientes acuáticos, donde las estructuras comunitarias dependen de las condiciones del pH, de la temperatura, de la concentración de sulfuro de hidrógeno, de la salinidad, y por supuesto, de la propia capacidad de osmorregulación de las amebas gracias a su exitosa evolución de expresión de acuaporinas de vacuolas.

En función de las descripciones realizadas por Schuster y Visvesvara (2004) se explica que se dividieron a las amebas en dos grandes clases: aquellas parásitas que requieren de un huésped para desarrollarse, al cual le provocan patologías graves; y, por otra parte, la clase de vida libre (FLA), que no requiere estrictamente un huésped, por lo que viven en diferentes ambientes desenvueltamente, incluso, expuestas a agentes virales. Siendo la clase de interés las FLA.

Las FLA, no poseen pared celular en etapa de trofozoíto por lo que extienden su citoplasma para movilizarse formando así pseudópodos que les permiten alimentarse de partículas en descomposición o bacterias, razón por la que controlan biológicamente poblaciones bacterianas a nivel ambiente (Salazar-Ardiles et al., 2022). Según Boratto et al. (2020), un mecanismo de entrada de virus en amebas, es simular a bacterias haciendo que la ameba los fagocite naturalmente, logrando así apoderarse de la maquinaria transcripcional del huésped.

No así también, aunque esta clase de amebas no requieren un huésped obligatoriamente, existen algunas especies que pueden comportarse como patógenas oportunistas o no oportunistas para animales y humanos, como el caso del género *Acanthamoeba*, que puede interactuar con el medio como parásito patógeno o como ameba de vida libre, cuya versatilidad lo identifica como un género anfizoide (Salazar-Ardiles et al., 2022).

4.3. Género *Acanthamoeba*

En términos taxonómicos, Adl et al. (2018) establecen que la diferenciación de las amebas por morfología resulta en una inexacta clasificación, por lo que el avance de la secuenciación de genes específicos de la biología molecular permite clasificar a las amebas en tres Supergrupos. El supergrupo Excavata, que reúne a los heterótrofos flagelados; el Rhizaria, que conforma a los pseudópodos filamentosos; y el supergrupo Amoebozoa, que reúne a los organismos que producen pseudópodos lobulados (op. cit.). A su vez, el supergrupo eucariota Amoebozoa incluye a la familia Acanthamoebidae, y esta al género *Balamuthia* y *Acanthamoeba* (Castrillón y Orozco, 2013), este último, género de interés de este estudio.

Acanthamoeba se describe por primera vez en 1930 por Castellani quien observó una especie del género en un cultivo de la levadura de *Cryptococcus pararoseus*, pero es en 1931 cuando se establece como género *Acanthamoeba* propiamente dicho por Volkonsky, para ubicar en este grupo a las amebas que contenían acantopodios o morfologías espinales y/o quistes (Visvesvara, 1991). Estos protozoos con 17 especies descritas, son los más frecuentes en todos los medios naturales, además de poder habitar en sitios como hospitales, en elementos como lentes de contacto y en laboratorios como cultivos celulares (Castrillón y Orozco, 2013),

es decir, la ubicuidad de *Acanthamoeba* le permite sobrevivir bajo condiciones ambientales normales, extremas e inhóspitas (Garate et al, 2004), al igual que los GV.

4.4. Ciclo de vida del género *Acanthamoeba*

Este género presenta dos etapas en su ciclo de vida, Marciano-Cabral y Cabral (2003) indican que el primero es una forma activa llamada trofozoíto de entre 25 a 40 μm , el cual se caracteriza por una dieta mediante pseudópodos que fagocitan bacterias, algas y levaduras o, incluso por pinocitosis, es decir, captan elementos disueltos del medio; por otra parte se halla el quiste de entre 13 a 20 μm , que bajo condiciones adversas conforma una pared doble, una interna o endocisto, y una externa o ectocisto.

Las etapas anteriormente descritas sobre el ciclo de vida de *Acanthamoeba* coinciden con lo establecido por el estudio de Siddiqui y Khan (2012), quienes expresan que el género presenta una etapa de trofozoíto vegetativo de entre 15-45 μm , y una de quiste latente de entre 13-23 μm ; este último se divide mitóticamente bajo pH neutro y temperaturas de 30 °C. A más de ello, en el estudio se aclara que las dimensiones de ambas etapas varían y dependen de la especie de ameba que se analice.

La membrana plasmática de las amebas de *Acanthamoeba* está conformada por proteínas (33 %), fosfolípidos (25 %), esteroides (13 %) y lipopolisacárido (29 %) (Siddiqui y Khan, 2012), bajo la cual se hallan unas estructuras que les permite resistir la tensión superficial y dan lugar a las protuberancias citoplasmáticas típicas de estas amebas, a las cuales se les denomina microfilamentos de actina (Svitkina, 2018). Entre sus organelas destacan también las vacuolas contráctiles de carácter prominente para regular la presión osmótica, las vacuolas lisosomáticas, las vacuolas digestivas y de glucógeno (Siddiqui y Khan, 2012).

En cuanto a su metabolismo, este género para desarrollarse y crecer es capaz de sintetizar una gran variedad de aminoácidos, moléculas orgánicas, cofactores y nucleótidos; a su vez, su excelente adaptación a episodios de estrés, les permite diversificar sus fuentes de alimentación haciendo uso de habilidades como la de sintetizar enzimas como la alginatoliasa, para emplear los polihidroxicarboxilatos (PHA) de las bacterias fagocitadas como fuente nutricional (Anderson et al., 2005).

4.5. *Acanthamoeba* en laboratorio

El análisis de laboratorio de *Acanthamoeba*, de acuerdo a Schuster (2002), se estudia mediante diversas técnicas *in vitro* con microscopía, inoculando un medio de crecimiento en medios de cultivo, los cuales pueden ser de agar no nutritivo o de agar con nutrientes como la peptona (0,05 %), levadura (0,05 %), o glucosa (0,1 %) en bajas concentraciones, ambos medios en presencia de bacterias no mucoides, como *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.* y *Escherichia coli*, que coadyuven a una fagocitosis sin interferencias. Cuando se tratan de muestras de *Acanthamoeba* ambiental o clínica, Visversa et al. (2007) indican que se requieren medios de agar no nutritivos para evitar una proliferación de bacterias que inhiban el desarrollo de las amebas.

Tal como lo explican Castrillón y Orozco (2013), la morfología celular de estas amebas se analiza frecuentemente aplicando diferentes tipos de tinción en función del orgánulo celular amebal a analizar, por lo que se puede aplicar tinción PAS, tinción hematoxilinaeosina, tinción Gomori Grocott, tinción fluorescente con calflúor blanco o inmunofluorescencia. Además, el avance en cuanto a la precisión, efectividad, sensibilidad y resolución de equipos ha permitido el análisis mediante observación directa con microscopía confocal o la aplicación de la técnica PCR (polymerase chain reaction).

4.6. Aislamiento de virus gigantes (GV) y el género *Acanthamoeba*

Tanto la familia de GV de Mimiviridae, Marsellaviridae, Pandoravirus, Pitovirus como la Mollivirus tienen un huésped en común, el género *Acanthamoeba*, un medio para la identificación de gran parte de los GV descritos (Khalil et al., 2016). Según Brandes y Linial (2019), los GV de cada familia presentan similitudes genómicas y biológicas a nivel celular, pero también características específicas de familia como la forma, simetría y etapas del ensamblaje del virión, la implicación celular y el tiempo del ciclo de infección.

Adicionalmente, se tiene claro que todos los GV capaces de infectar amebas dependen de la fagocitosis no específica de la ameba, es decir, el tamaño de partícula que la ameba pueda receptar es un condicionante para el GV y su probabilidad de virulencia, lo cual debe ser consecuente con el tamaño de partícula de las bacterias que estas amebas consumen. Esta situación se considera como una posible fuerza impulsora del desarrollo del tamaño de los GV,

y así también el efecto extraño de lisis generado en la ameba que les ayuda a liberar viriones por medio de la fusión de membranas y la exocitosis activa (Brandes y Linial, 2019).

En tanto, para comprender y detallar cómo los GV actúan en las células del hospedero y en toda su maquinaria transcripcional para lograr expresar sus genes (Oliveira et al., 2017; Yutin et al., 2014), es propicio estudiar especies de este género como medio de identificación de GV. Por lo que los estudios del género *Acanthamoeba* como medio de aislamiento de GV ha dado resultados en cuanto a aquellos huéspedes del género más eficientes en el proceso (Khalil et al., 2016).

4.7. *Acanthamoeba castellanii*

La especie que contaminó la levadura que le permitió a Castellani en 1930 hacer las primeras descripciones del género *Acanthamoeba* fue la ameba que posteriormente pasó a denominarse *Acanthamoeba castellanii* (Visvesvara et al., 2007). Es decir, esta bacteria fue la primera especie de ameba ubicada dentro del género.

Acanthamoeba castellanii es un protozoo ubicuo abundante de vida libre capaz de replicar genes virales en el núcleo con un ciclo de vida típico del género *Acanthamoeba* ya descrito anteriormente (Fukaya y Takemura, 2021). Su distribución incluye hallazgos en aguas heladas de Oslo y Noruega, recalando así su carácter cosmopolita y resistente a ecosistemas de temperaturas desde 2 °C hasta 38 °C (Brown, 1997), semejante a lo descrito para GV.

4.8. *Acanthamoeba castellanii* como medio de aislamiento GV

De acuerdo a Khalil et al. (2016), el principio de aislamiento de GV reciente se basa en multiplicar los soportes de cultivo o células huésped que han mostrado capacidad para recolectar GV, el cual propone al cultivo en laboratorio de *Acanthamoeba castellanii* como una forma efectiva para incrementar el potencial de recolección de nuevos GV antes no descubiertos en aislados ambientales.

En este sentido, además, el estudio realizado por Fukaya y Takemura (2021) estableció que una *Acanthamoeba castellanii* típica presenta una distancia de movimiento de 6,95 a 23,72 píxeles, una circularidad de 0,541 a 0,678 y un tamaño de partícula de 777 a 1 832 píxeles, lo que hace que pueda ser observada y analizada mediante microscopía.

Las amebas *Acanthamoeba castellanii* y *Acanthamoeba polyphaga*, son los hospederos que han permitido aislar mayormente GV (Abrahão et al., 2014). No obstante, los análisis y estudios del género *Acanthamoeba* han identificado como huésped de laboratorio por excelencia para el aislamiento de algunos GV a *Acanthamoeba castellanii* (La Scola et al., 2003). Según Machado et al. (2022) es un huésped generalista de GV, y de acuerdo a lo descrito por Khalil et al. (2016), *Acanthamoeba castellanii* es un medio para aislar GV que antes no se habían podido aislar con otros hospederos, porque resultaron demasiado estrictos.

Se han ejecutado estudios para determinar la mejor estrategia de cocultivo, es decir, el cultivo más práctico y seguro para inocular las cepas de amebas conjuntamente con los posibles GV de una muestra ambiental o clínica, entre ellos los realizados por Khalil et al. (2016), Machado et al. (2022) y Dornas et al. (2015), quienes destacan cocultivos como el medio PYG, en el cual se propaga la ameba y las muestras de sospecha de presencia GV en líquido PYG y empleando filtros, se eliminan otros agentes no requeridos; otra estrategia es adicionar antibióticos (vancomicina) al cocultivo para evitar dichos agentes; y por último, es aplicar el cocultivo en un medio de agar no nutritivo, lo cual evita el desarrollo de los agentes no necesarios, siendo la segunda estrategia de aplicación de antibióticos al cocultivo la que genera mejores resultados según los autores descritos y sus estudios expuestos.

4.9. Ciclo de infección de *Acanthamoeba castellanii* con GV

Los aislamientos de GV indican que cada especie de GV aparentemente tiene especificidad de huésped (Dornas et al., 2015), y los CPE en el huésped frente a la infección viral dependerán de la estrategia de propagación del GV que lo está infectando o de la estrategia antiviral de las amebas (Yoshikawa et al., 2019; Fukaya y Takemura, 2021). En cuanto al ciclo de infección de *Acanthamoeba castellanii*, Boratto et al. (2020) establecen como primer punto que generalmente los GV imitan a las bacterias de las cuales se alimenta naturalmente la ameba como mecanismo de entrada, para que *Acanthamoeba castellanii* los fagocite sin complicaciones, y que el proceso viral consiguiente en la ameba es propio para cada GV y ameba hospedera.

Para iniciar el ciclo de infección, por citar un ejemplo, los Yaravirus tienden a adherirse a la membrana plasmática de *Acanthamoeba castellanii* para internalizarse, así, los viriones se

incorporan en las vesículas endocíticas ocupando luego la fábrica viral hasta su maduración para reclutar mitocondrias y construir viriones con esa energía, que posteriormente son liberados al exterior (Yoshikawa et al., 2019). Así, este ciclo viral es variante respecto del huésped - hospedero, y el cual se busca determinar en esta investigación para, según los CPE descubrir los posibles virus gigantes infectantes.

El final de la infección puede desembocar en la disminución de células huésped y simultáneamente el aumento del genoma viral; también puede terminar provocando lisis celular inducida por el virus; o, por el contrario, si el genoma viral no cambia y no produce la lisis al huésped, los trofozoítos se convierten en quistes (Boratto et al., 2020).

4.10. *Acanthamoeba castellanii* y GV en el ambiente

Acanthamoeba castellanii apoya al equilibrio ecológico gracias a que es depredadora amebal potencial de hongos y bacterias patógenas (*Cyanobacterias* y *Firmicutes*) en cuerpos de agua, así como precursora de otras bacterias (Bonkowski, 2004). En sistemas acuáticos, la depredación de *Acanthamoeba castellanii* reduce las poblaciones de *Cyanobacterias*, lo que logra evitar procesos de eutrofización, así como incrementar la concentración de oxígeno disuelto del medio (Tsai et al., 2020), un factor determinante para la vida acuática.

Por otro lado, existen también *Cyanobacterias* tóxicas para las amebas herbívoras de vida libre, por lo que estas interacciones suponen una dinámica poblacional equilibrada en los cuerpos de agua que controlan poblaciones de *Acanthamoeba* (Urrutia-Cordero et al., 2013). De dicho control dinámico de *Acanthamoeba castellanii*, en sistemas acuáticos, también toman parte los GV (Santos y Carrapiço, 2011), los cuales tras ser fagocitados generan la infección viral produciendo CPE en el huésped, es decir, producen cambios morfológicos y de comportamiento controlando así el crecimiento y desarrollo poblacional de *Acanthamoeba castellanii* en el ambiente (Fukaya y Takemura, 2021).

Otro papel ambiental de *Acanthamoeba castellanii* y los GV, es contribuir al establecimiento y desarrollo de ciclos biológicos y biogeoquímicos (Santos y Carrapiço, 2011), teniendo en consideración que esta ameba consume a los descomponedores primarios productos de la degradación de bacterias dejando minerales asimilables para otros agentes en el entorno (Bonkowski, 2004). En este sentido, Boratto et al. (2020) explican que la presencia de GV es

muy evidente en ríos ácidos y lagunas urbanas caracterizados por la presencia de partículas orgánicas, esto según estudios realizados en Brasil, razón por la que es muy probable la existencia de estos virus en las lagunas urbanas establecidas en esta de la investigación.

5. Metodología

5.1. Área de estudio

El estudio se ejecutó en ecosistemas lacustres de la ciudad de Loja, pertenecientes a la provincia de Loja, del sur de Ecuador. Loja es una cuenca sedimentaria paleo lacustre, cuya formación geológica está evidenciada en la presencia de lagunas en el territorio, actualmente en su mayoría pertenecientes a espacios de recreación al aire libre, y otras halladas en zonas periféricas de la ciudad (Plan de Uso y Gestión del Suelo del Cantón Loja [PUGS], 2021).

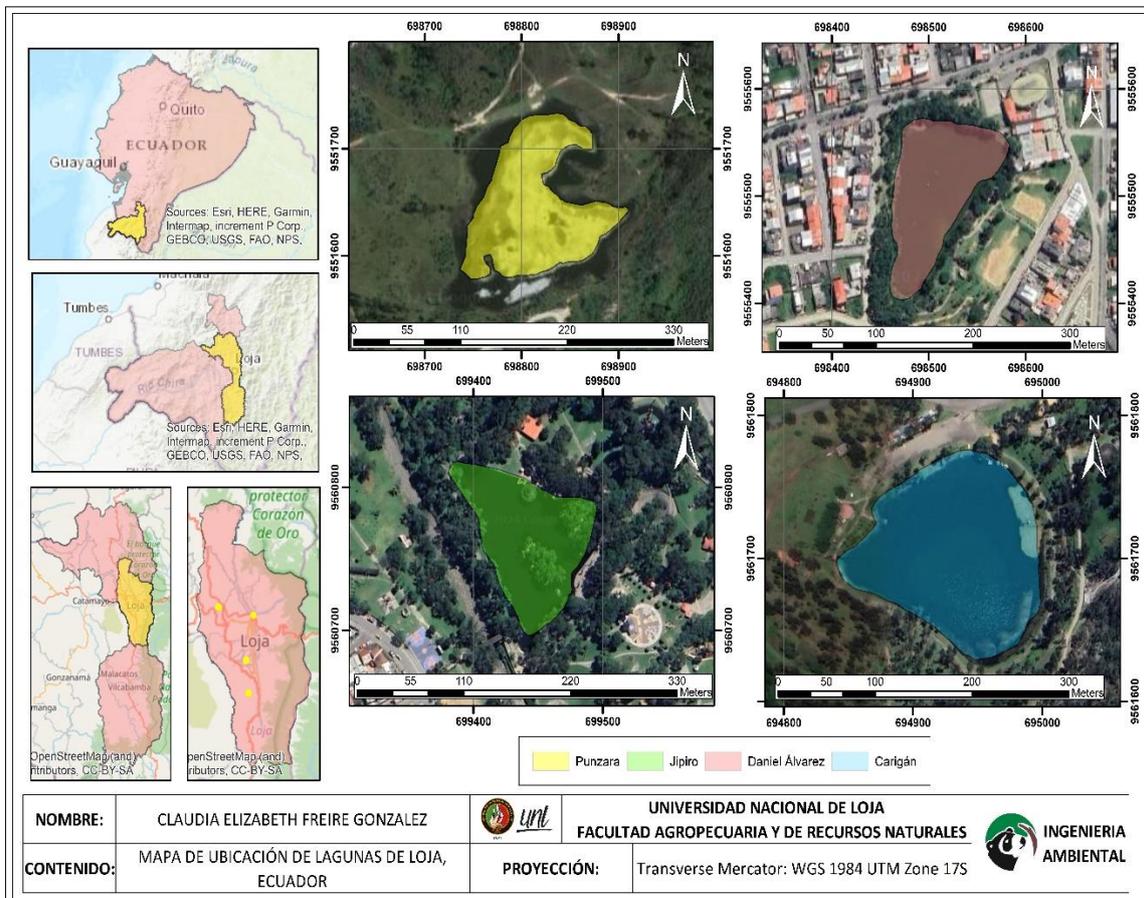


Figura 1. Área de estudio, donde se muestran los ecosistemas lacustres de la ciudad de Loja, provincia Loja, Ecuador.

La selección de los ecosistemas lacustres de la ciudad se estableció bajo criterios de baja movilidad del flujo de agua del medio, así como características que evidenciaron fenómenos de eutrofización. Ambos incisos, de acuerdo a lo expresado por Tsai et al. (2020), representan entornos predilectos para el desarrollo de los protozoos. A su vez, en un estudio de carácter exploratorio realizado por Vásquez (2024) en ecosistemas lacustres de la ciudad de Loja, se determinan indicios de la presencia de GV. En este sentido, se describen las cuatro lagunas establecidas, como se muestra a continuación (Figura 1):

En el Parque lineal Daniel Álvarez Burneo, un parque urbano, ubicado en el sector Sur Occidental de Loja, contiguo a la Av. Benjamín Carrión, se encuentra la Laguna "Daniel Álvarez Burneo Burneo" de 1,17 ha. Así mismo, en el Parque lineal Jipiro, ubicado en el Sector norte de la ciudad de Loja, en la Av. Salvador Bustamante Celi entre Daniel Armijos y Francisco Lecaro (Frente al Complejo Ferial), se ubica la Laguna Jipiro de 0,74 ha. En el Parque Colinar Carigán Villonaco de la parroquia Carigán a pocos metros de la vía Panamericana Norte de la ciudad, se halla la Laguna Carigán, que cuenta con una superficie de 1,51 ha. Y en la parroquia Punzara, en el sector Punzara Grande al sur de la ciudad, se posiciona la Laguna Punzara con un área de 1,45 ha.

Todas estas zonas son concebidas como sitios de esparcimiento y recreación, con numerosos servicios y atractivos turísticos de gran concurrencia.

5.2. Diseño de investigación

En el marco de la presente investigación experimental se empleó un método deductivo de tipo descriptivo, sobre los efectos citopáticos en *Acanthamoeba castellanii* luego de ser infectada por virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño, provenientes de cuatro diferentes ecosistemas lacustres de la ciudad de Loja,.

Así también, el enfoque de la investigación es mixto (cuantitativo y cualitativo), dado que mediante la aplicación de microscopía inversa de lapso de tiempo y análisis de imágenes se pudieron determinar los cambios morfológicos de las células amebales y, contemporáneamente, el análisis estadístico reflejó el comportamiento poblacional de los cultivos monoxénicos luego de la infección. Los datos generados sobre el proceso de variaciones en cuanto a morfología y comportamiento del hospedero infectado dieron lugar al análisis y discusión sobre los posibles

GV infecciosos de los ecosistemas descritos. Por lo que, de cada unidad muestral o de cada laguna, se obtuvo una muestra compuesta de tres diferentes puntos. La muestra compuesta fue inoculada mediante tres diferentes concentraciones o tratamientos realizando tres repeticiones por cada tratamiento de infección.

5.3. Desarrollo de cultivos monoxénicos de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 de agua de diferentes ecosistemas lacustres

5.3.1. Muestreo de agua de ecosistemas lacustres

Para el muestreo de aguas lacustres se realizó un análisis *in situ* de parámetros físico químicos a través del uso de un multiparámetro (Multiparameter HI98194 pH/EC/DO HANNA). Los parámetros fueron: sólidos suspendidos (ppm), conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$), pH, temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y oxígeno disuelto (mg/L) (Anexo 1).

El oxígeno disuelto, como parámetro integrador de desequilibrios tróficos e indicador de procesos biológicos como la respiración (consumo) y fotosíntesis (producción); la temperatura y conductividad; el pH, el cual reflejará la química del agua con posibles procesos de eutrofización; a lo que se le suman los sólidos suspendidos, para reconocer la capacidad de dispersión o absorción de la luz del agua, relacionados con la turbidez (García y Camacho, 2001). Los valores registrados se compararon con criterios de calidad para aguas destinadas a fines recreativos descritos en el Anexo 1 del Libro VI de la Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes: Recurso Agua (2012), ya que ésta se prescribe con el fin de salvaguardar la integridad de los individuos, los ecosistemas y las interrelaciones para este tipo de ecosistemas con fines recreacionales.

Respecto de la toma de muestras de agua, se ejecutó de acuerdo a lo establecido por Machado et al. (2022), quien sugiere el uso de tubos plásticos cónicos esterilizados de 50,00 ml que fueron etiquetados con la ubicación. Para cada muestra se tomó un valor $\geq 10,00$ ml a poca profundidad, con tres diferentes puntos por laguna para conformar una muestra compuesta, y así incrementar la representatividad del muestreo. Finalmente, las muestras se colocaron en congelación para asegurar su integridad y conservación.

5.3.2. Filtración de la muestra

Las muestras de agua fueron expuestas a tres ciclos de congelación-descongelación, para reducir la carga microbiana; tras ello, se tomaron alícuotas de 1,00 ml que fueron colocadas en tubos de microcentrífuga de 1,50 ml (Machado et al., 2022), el cual representa el inóculo 1:1, y se etiquetó con el nombre del ecosistema lacustre correspondiente.

5.3.3. Cultivo axénico de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010

Esta etapa se desarrolló de acuerdo a lo prescrito en el protocolo de Vásquez (2024), integrante del Grupo de investigación Genética y Biología Molecular de la Universidad Nacional de Loja, quien modificó los protocolos de Machado et al. (2022) para aislar posibles GV mediante un hospedero amebal. Es así que, en primera estancia se elaboró medio PYG (glucosa y extracto de levadura y peptona), para posteriormente inocular *Acanthamoeba castellanii*, al que se le aplicó gentamicina, como un antibiótico de amplio espectro, en una proporción de 1,00 ml de gentamicina por cada 500,00 ml de PYG. Los cultivos axénicos de *Acanthamoeba castellanii* se dispusieron en frascos de cultivo de tejidos (superficie 75,00 cm²), inoculando 100,00 µl de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 en 25,00 ml de medio PYG, manteniéndolos en incubación a 30,00 °C durante seis días. Transcurrido dicho lapso, por microscopía invertida se observó una confluencia celular del 90 – 100 % de *Acanthamoeba castellanii* (Anexo 1).

Se debe indicar que los materiales y el medio esterilizado, el uso de antibióticos de amplio espectro, como por ejemplo la gentamicina, así como los ciclos de congelación y descongelación de las muestras de agua, permitieron bloquear la aparición de falsos positivos, es decir, se eliminó toda posibilidad de que se presenten efectos citotóxicos en las células amebales generados por bacterias, ya sea por la incidencia de alguna sustancia o por un elemento tóxico externo presente en la muestra de agua, y que los mismos sean caracterizados erróneamente (Machado et al., 2022).

5.3.4. Dilución del cultivo axénico de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010

Se seleccionó un cultivo axénico (100,00 µl de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 en 25,00 ml de medio PYG durante seis días a 30,00 °C) con una confluencia celular próxima

al 90 %, dado que en este punto las amebas presentaron aún división celular, pero sin llegar al desprendimiento de la monocapa. Lo anterior se debe a que las células de *Acanthamoeba castellanii* se adhieren al matraz del frasco para dividirse y se desprenden del fondo cuando su confluencia celular es próxima al 100 % (Machado et al., 2022). Posteriormente se lavó el cultivo axénico seleccionado desprendiendo las amebas del fondo del frasco de cultivo de tejidos con una pipeta, para que éstas se encuentren absortas en el medio líquido PYG (Machado et al., 2022).

Para la dilución del cultivo axénico de *Acanthamoeba castellanii* con una micropipeta se tomaron 10,00 µl de amebas del producto del lavado del cultivo axénico seleccionado y se los colocó en un nuevo frasco de cultivo de tejidos junto con 50,00 ml de PYG, incubándolo a 30,00 °C durante cuatro días. El objetivo fue obtener una menor confluencia de amebas sanas con capacidad natural de división celular incrementando el medio PYG y disminuyendo la cantidad de inóculo amebal. Con esto se obtuvo un cultivo axénico de *Acanthamoeba castellanii* diluido con una mejor disposición de las amebas en espacio y cantidad inmersas en medio PYG, para una óptima descripción microscópica inversa de las amebas antes y después de ser infectadas.

5.3.5. Contabilización de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010

Respecto de lo descrito por Machado et al. (2022) y Vásquez (2024), para el conteo celular de *Acanthamoeba castellanii* se usó 25,00 µl de azul de tripano para teñir 100,00 µl de amebas dentro de un tubo de microcentrífuga de 1,50 ml, de lo cual con una pipeta se tomó 5,00 µl y se los dispuso en una cámara de Neubauer para contar las amebas a través de un microscopio invertido (lente 10x). El conteo del número de células de amebas dentro de cada uno de los cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer y la aplicación de la fórmula descrita por Vásquez (2024) para reconocer la concentración real de amebas, permitió identificar la cantidad de células de *Acanthamoeba castellanii* por microlitro (Anexo 1).

$$\frac{\text{Número de células}}{\text{ml}} = \frac{\text{Células de amebas contabilizadas}}{\text{Número de cuadrantes contabilizados}} \times 10^4 \quad (1)$$

5.3.6. Inoculación de células de *Acanthamoeba castellanii* con muestras de agua

Al cultivo axénico de *Acanthamoeba castellanii* diluido (frasco de cultivo de tejidos transcurridos cuatro días inoculado con 10,00 μ l de amebas más 50,00 ml PYG a 30,00 °C) se lo suplementó con antibióticos de amplio espectro; es decir, se intercambió los 50,00 ml de medio PYG del cultivo axénico diluido por 50,00 ml de nuevo PYG complementado con vancomicina (60,00 μ l), ciprofloxacina (240 μ l) y doxiciclina (240 μ l). Luego, se hizo el lavado con una pipeta, para desprender las células amebales del fondo (monocapa) y tenerlas inmersas en el nuevo medio PYG suplementado (Anexo 1). Los antibióticos se aplicaron con el fin de reducir la carga contaminante de las muestras de agua a un valor despreciable, tal como lo establece Machado et al. (2022), pero incrementando la concentración de las drogas.

Por tiempo y agilización del tratamiento, el procesamiento de muestras de agua o inóculos ambientales de las lagunas se realizó en una microplaca de 96 pocillos (Figura 2). Así también, con modificaciones en Machado et al. (2022) y Vásquez (2024), en los pocillos de la microplaca a ser infectados se inocularon 80,00 μ l de amebas producto del último lavado (*Acanthamoeba castellanii*, PYG y antibióticos), y se sellaron los bordes de la microplaca con cinta Parafilm, incubándola a 30,00 °C durante 24 horas.



Figura 2. Disposición de controles negativos (C-) y positivos (C+), de blancos (B) y de los tres tratamientos de los inóculos ambientales (1:1, 1:10 y 1:20) de los cuatro ecosistemas lacustres de la ciudad de Loja, en la microplaca de 96 pocillos

Fuente: Elaboración propia en Biorender.com

Transcurrido dicho lapso, se procedió a infectar las células de *Acanthamoeba castellanii* en la microplaca de 96 pocillos con los inóculos ambientales procedentes de sus procesos de congelación y descongelación (Machado et al., 2022; Vásquez, 2024). Los inóculos ambientales fueron prospectados en diferentes concentraciones (1:1, 1:10 y 1:20), diluidos en agua desionizada y autoclavada a 120,00 °C por 20,00 minutos. Esto con la finalidad de reconocer variabilidad o no de CPE respecto de la concentración del inóculo ambiental en el tiempo.

Los inóculos ambientales se prepararon en tubos de microcentrífuga de 1,50 ml, diferenciados por laguna que se prepararon tres inóculos ambientales diferentes: el inóculo ambiental 1:1, que fue la muestra ambiental sin diluir, es decir, 1,50 ml de la muestra de agua compuesta; el inóculo ambiental 1:10, el cual fue una dilución de 0,10 ml de muestra de agua con 0,90 ml de H₂O desionizada; y, el inóculo ambiental 1:20, el cual se preparó tomando 0,10 ml del inóculo ambiental 1:10 con 0,90 ml de H₂O desionizada. Luego de la infección, la viabilidad de *Acanthamoeba castellanii* se controló respecto del tiempo con descripciones diarias durante siete días. Es así que, además de las tres repeticiones por tratamiento, de forma paralela se elaboró: i) Blancos, para constatar la asepsia y validez del medio PYG en el experimento; y, además ii) Controles positivos y negativos, para constatar que ninguna variable de confusión haya afectado la viabilidad de las amebas no infectadas (Tabla 1). Por último, en esta etapa, ejecutada la infección, donde ya se tienen los cultivos monoxénicos, se selló la placa e incubó a 30,00 °C durante 7 días

Tabla 1. Tratamientos y controles durante la inoculación de *Acanthamoeba castellanii* con muestras ambientales.

Controles		Tratamientos	
B	Medio de cultivo (PYG)	1:1	Medio de cultivo (PYG) + 80 µl de <i>Acanthamoeba castellanii</i> + Antibióticos + 80 µl de Inóculo ambiental al 100%
C+	Medio de cultivo (PYG) + 80 µl de <i>Acanthamoeba castellanii</i> + Antibióticos	1:10	Medio de cultivo (PYG) + 80 µl de <i>Acanthamoeba castellanii</i> + Antibióticos + 80 µl de Inóculo ambiental (90% agua desionizada + 10 % agua ambiental)
C-	Medio de cultivo (PYG) + 80 µl de <i>Acanthamoeba castellanii</i> + 80 µl de Hipoclorito de sodio al 0,50 %	1:20	Medio de cultivo (PYG) + 80 µl de <i>Acanthamoeba castellanii</i> + Antibióticos + 80 µl de Inóculo ambiental (90% agua desionizada + 10 % del tratamiento 1:10)

Nota: B: blanco; C+: control positivo; C-: control negativo; 1:1: inóculo ambiental sin dilución; 1:10: inóculo ambiental diluido en una proporción de 900 µl de agua desionizada y 100 µl de inóculo ambiental sin diluir (1:1); 1:20: inóculo ambiental diluido en una proporción de 900 µl de agua desionizada y 100 µl de inóculo ambiental diluido 1:10.

5.4. Identificación de los efectos citopáticos (CPE) en *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 luego de la infección

5.4.1. Efectos citopáticos (CPE) en *Acanthamoeba castellanii*

Machado et al. (2022) establecen que las descripciones de CPE en las células de amebas causados por GV se realizan durante 7 días, por lo que en esta investigación se planteó desarrollarlas durante ese período de tiempo de incubación del cultivo monoxénico, considerando observaciones diarias de los CPE en las células mediante microscopía inversa, teniendo en consideración el número de células de amebas dentro del campo focal del microscopio (Anexo 1).

Las descripciones se realizaron teniendo en consideración imágenes de la estructura intracelular y extracelular de una *Acanthamoeba castellanii* típica, antes y después de ser

infectada. Las imágenes iniciales fueron capturadas antes de la inoculación ambiental, es decir, cuando la ameba se hallaba en cultivo axénico, para las posteriores comparaciones de las variaciones en su estructura o comportamiento, luego de ser infectadas, de lo cual también se registraron fotografías y descripciones. Cualquier variación estructural y de comportamiento fuera del ciclo natural vial que se presentó en las amebas luego de la infección, fue registrada en función del tiempo.

Una vez realizado todo el procedimiento de infección, se describieron los CPE, considerando aquellos aspectos descritos de una forma general por Fukaya y Takemura (2021) y Fukaya y Takemura (2023), entre los que se encuentran:

Cambios de tamaño y forma del contorno de las células huésped: claramente perceptibles a microscopía, donde las células pueden tomar formas redondas o elongadas.

Cambios de tamaño y forma de la vacuola (orgánulo): perceptible con la captura de imágenes microscópicas. Inclusive Fukaya y Takemura (2023) establecen que, si las células presentan vacuolas intactas detectables post infección, estas no han sido infectadas por GV.

Lisis: perceptible con la captura de imágenes microscópicas. Al final de la infección se puede generar la lisis celular inducida por el GV; o, por el contrario, si el genoma viral no cambia y no produce la lisis al huésped, puede hallarse como trofozoítos o quistes (Boratto et al., 2020).

5.4.2. Análisis de datos sobre la viabilidad de *Acanthamoeba castellanii*

5.4.2.1. Análisis gráfico

El análisis gráfico consistió en el conteo de células infectadas en función del tiempo, tal como lo establecieron Fukaya y Takemura (2023), en este caso, con ciertas adaptaciones. Es así que, se elaboraron gráficas que representen curvas de infección, tomando en consideración las variables dependientes (número de células de *Acanthamoeba castellanii* con CPE), respecto de la variable independiente tiempo (horas posteriores a la infección o hpi).

En cuanto a las curvas de infección, cada una representa un promedio entre las tres repeticiones de cada tratamiento dadas las tres diferentes concentraciones del inóculo (1:1, 1:10 y 1:20) procedentes de las cuatro lagunas considerando cada CPE observado. Y, además, al ser

cada curva de infección un promedio, se presentaron gráficamente las barras de error de los datos. Esto se aplicó empleando paquetes del software *RStudio* como *ggplot2* (*geom_line*).

Las gráficas sugeridas por Fukaya y Takemura (2021) y Fukaya y Takemura (2023) son curvas de infección, de acuerdo a cada CPE, por lo que se elaboraron empleando el software *RStudio* y su paquete *ggplot2* (*geom_line*), de la siguiente manera:

Cambios en el comportamiento de las células huésped: curva con el número de células de *Acanthamoeba castellanii* que presentaron desprendimiento celular de la monocapa y agrupamiento, respecto del tiempo.

Cambios de tamaño y forma del contorno de las células huésped: curva con el número de células de *Acanthamoeba castellanii* que presentaron reducción del tamaño celular y redondeo celular, respecto del tiempo.

Cambios de tamaño y forma de la vacuola (orgánulo): curva con el número de células de *Acanthamoeba castellanii* que presentaron reducción de las vacuolas respecto del tiempo.

Lisis: curva con el número de células de *Acanthamoeba castellanii* que presentaron lisis celular independiente y agrupada, respecto del tiempo.

Adicionalmente, con el paquete *dplyr* de *RStudio* se imprimió el valor del promedio de cada curva, así como el error estándar, para reconocer cuánto varía el promedio de las tres repeticiones por cada tratamiento, cuyo valor cuanto menor sea indicará mayor precisión en la estimación del promedio. De lo anterior depende la fiabilidad de las conclusiones generadas a través de las curvas generadas por CPE.

5.4.2.2. Análisis estadístico

Para verificar la naturaleza de los datos se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk en *RStudio*. Para esto se consideró un p-valor ≤ 0.05 , como evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula, es decir, para concluir que los datos no parecen provenir de una distribución normal. Con esto se asumió la aplicación de un análisis multivariado de escalamiento multidimensional no métrico (nMDS) en *Past 4*, para visualizar la similitud o disimilitud entre el conjunto de variables agrupadas por localidad en el espacio, presentando las relaciones de proximidad de

los ecosistemas lacustres. En un nMDS las dimensiones no se analizan de forma física sino abstracta, por lo que se calculó el “stress” para determinar la discrepancia entre las distancias en el espacio original multidimensional, donde una excelente representación está dada por un $\text{stress} < 0.05$.

La aplicación de una prueba no paramétrica para analizar los datos de distribución no normal estadísticamente, denominada PERMANOVA, en *InfoStat* y *Past 4*, y *RStudio* para la generación de gráficos del análisis, permitió identificar las similitudes entre grupos (tratamientos y variables), con un p valor de 0,001, pudiendo así establecer la presencia de diferencias significativas o semejanzas entre grupos, con el fin de analizar a aquellos semejantes como grupos cuyos efectos citopáticos provienen del mismo ente. La prueba anterior simultáneamente describió la prueba de Friedman, que fue útil para realizar una comparación entre el comportamiento de las variables o CPE registrados respecto de las medias significativamente diferentes ($p > 0,05$).

5.5. Identificación o determinación de virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño infectantes de acuerdo a los CPE de *Acanthamoeba castellanii*

Para identificar la presencia de GV, se compararon los CPE presentados en las células de *Acanthamoeba castellanii* de este estudio, con los CPE causados por GV evidenciados en otros estudios, esto a través de la revisión bibliográfica. De esta manera, se pudo sugerir el posible GV infectante, lo cual requerirá posteriormente un análisis molecular para su confirmación o, por el contrario, podría sugerir la posible descripción de un virus no reconocido hasta el momento.

6. Resultados

6.1. Desarrollo de cultivos monoxénicos de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 de agua de diferentes ecosistemas lacustres

La caracterización de los cuatro ecosistemas lacustres de la ciudad de Loja, se obtuvo con los datos de los parámetros físico químicos de sólidos suspendidos (ppm), conductividad (uS/cm), pH, temperatura (°C) y oxígeno disuelto (mg/L), que se resumen en la Tabla 2. Teniendo en consideración que los ecosistemas lacustres muestreados son sitios de

esparcimiento y recreación ubicados dentro de la periferia urbana de Loja, se analizaron los parámetros descritos en la Tabla 2 de acuerdo a los criterios metodológicos ya indicados.

Tabla 2. Parámetros resultantes de las muestras de agua de los cuatro ecosistemas lacustres de la ciudad de Loja

Laguna	Punto	Sólidos suspendidos (ppm)	Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	pH	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Oxígeno disuelto (mg/l)
Daniel Álvarez Burneo	1	162	324	9,19	20,86	11,26
	2	162	324	9,42	21,10	11,33
	3	163	325	9,16	19,83	10,07
	Promedio	162	324	9,26	20,60	10,89
Jipiro	1	41	81	6,83	18,70	8,98
	2	39	78	6,98	18,55	9,65
	3	40	80	7,00	18,74	9,20
	Promedio	40	80	6,94	18,66	9,28
Carigán	1	14	28	6,08	21,35	8,30
	2	14	28	6,30	21,20	9,44
	3	14	29	7,07	21,57	9,56
	Promedio	14	28	6,48	21,37	9,10
Punzara	1	12	25	5,69	19,48	8,68
	2	14	40	5,68	19,21	7,68
	3	13	27	5,53	19,20	7,65
	Promedio	13	31	5,63	19,30	8,00

En este sentido, el pH de todos los ecosistemas lacustres, excepto la laguna de Jipiro, se encontró por fuera de los límites permisibles (6,5 – 8,5), es decir, la laguna de Daniel Álvarez Burneo presentó alcalinidad, mientras que las lagunas de Carigán y Punzara mayormente acidez. En cuanto al oxígeno disuelto registrado, las lagunas no presentaron valores inferiores al mínimo admisible (6 mg/l); sin embargo, durante la toma de las muestras las lagunas estuvieron bajo sistemas de aireación artificial. En cuanto a los sólidos suspendidos, únicamente la laguna de Daniel Álvarez Burneo presentó valores superiores a 100 mg/l. Por otra parte, la temperatura de los ecosistemas varió entre los 18 – 21 $^{\circ}\text{C}$. Dicho esto, las lagunas de Jipiro, Carigán y Punzara disponen de una caracterización similar entre sí, a diferencia de la laguna Daniel Álvarez Burneo, la cual presentó parámetros diferentes.

En cuanto al cultivo axénico de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010, se logró tras inocular en frascos de cultivo de tejidos 100,00 μl de amebas, más 25,00 ml de medio PYG, durante seis días a 30 $^{\circ}\text{C}$. Al término de dicho lapso mostraron una confluencia celular del 90 –

100 % (Figura 3), es decir, una funcional división celular, lo que permitió poseer colecciones de cepas activas de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 durante la investigación.

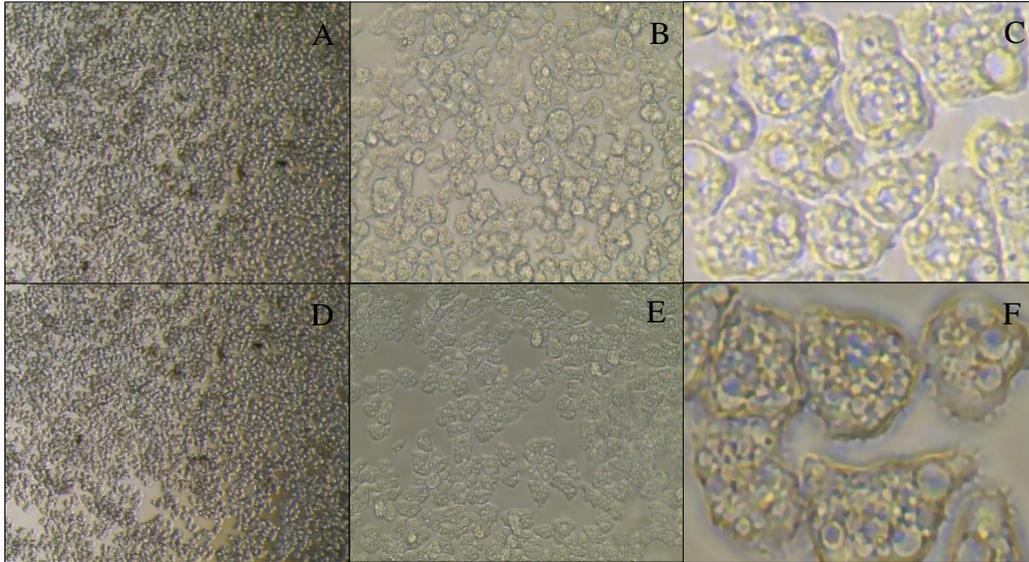


Figura 3. Cultivo axénico de 100,00 μ l de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 inoculada en 25,00 ml de medio PYG. Confluencia celular del 100 % mediante microscopía invertida A) lente 10 x, B) lente 20 x, y C) lente 40 x. Confluencia celular del 90 % mediante microscopía invertida D) lente 10 x, E) lente 20 x, y F) lente 40 x

El cultivo axénico reflejó amebas con una configuración clara y forma bien establecida, dadas las despejadas y prominentes vacuolas contráctiles, así como las vacuolas lisosomáticas, digestivas y de glucógeno de las amebas. Por lo anterior se afirma que estos organismos protistas se encuentran en estado de trofozoíto, es decir, son viables con total disposición para realizar la división celular por hallarse adheridas a la monocapa en el fondo del frasco de cultivo de tejidos.

La experimentación del cultivo axénico con más cantidad de medio PYG (50,00 ml) y una menor cantidad de inóculo de amebas (10,00 μ l) mostró una mejor disposición en espacio y cantidad de *Acanthamoeba castellanii* (Figura 4), ya que se logró una confluencia del 60 %. Esto permitió una descripción microscópica óptima de la ameba, lo que facilitó la verificación de la viabilidad de las amebas antes de ser infectadas, así como la descripción de los CPE después de ser infectada, observándolos con mayor claridad en el campo focal.

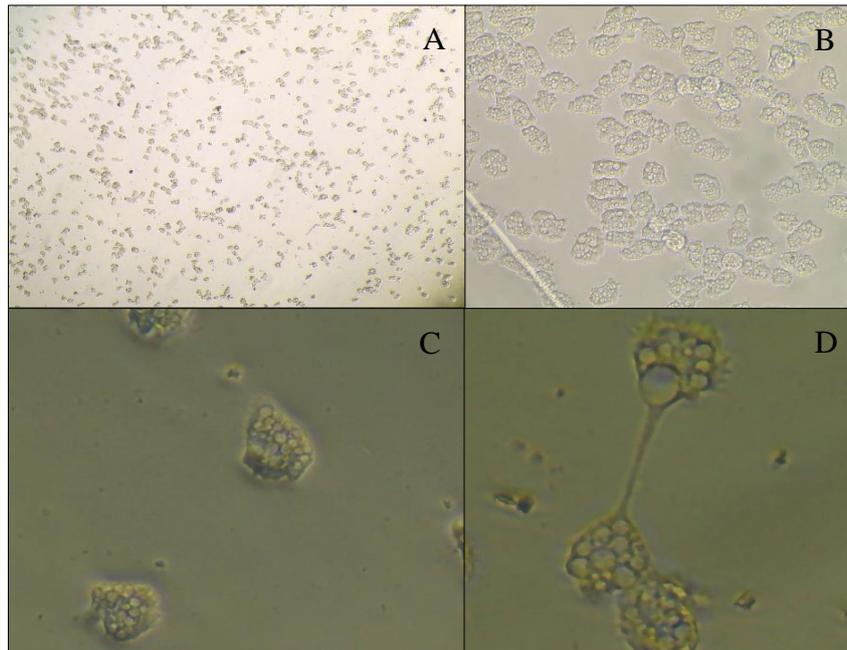


Figura 4. Cultivo axénico de 10,00 μ l de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 inoculada en 50,00 ml de medio PYG, con una confluencia celular del 60 % vista con microscopía invertida A) lente 10 x; B) y C) lente 40 x; y, D) lente 40 x, con evidencia de división celular

Se realizó el conteo celular del cultivo axénico diluido, ya que con este se obtuvo una confluencia del 60 % (10,00 μ l y 50,00 ml PYG), lo que se traduce a una mejor disposición celular en cantidad y espacio, lo que lo convirtió en el cultivo axénico más adecuado para las posteriores experimentaciones. Siendo así, la contabilización en la cámara de Neubauer (Figura 5) de las células de *Acanthamoeba castellanii* por microlitro presentes en el cultivo axénico diluido resultó en la presencia de $1,17 \times 10^5$ amebas por microlitro de PYG producto del lavado.

Las descripciones iniciales de la inoculación de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 en la microplaca de 96 pocillos transcurridas 24 horas permitieron establecer la viabilidad inicial de las amebas antes de infectarlas (Figura 6), las cuales se muestran sanas con una configuración clara y vacuolas prominentes en todos los pocillos dispuestos para los diferentes tratamientos, adheridas a la monocapa del fondo de los pocillos, por lo que revelan división celular con normalidad. Además, se registró dentro del campo óptico entre un mínimo de 28 y un máximo de 78 células.

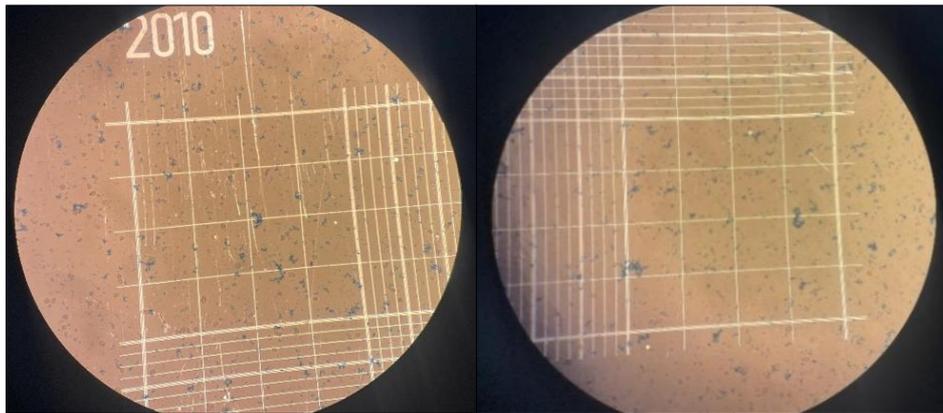


Figura 5. Conteo de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 por microlitro, inoculada en una proporción de 10,00 μ l de amebas por 50,00 ml de medio PYG, en una cámara de Neubauer mediante microscopía invertida

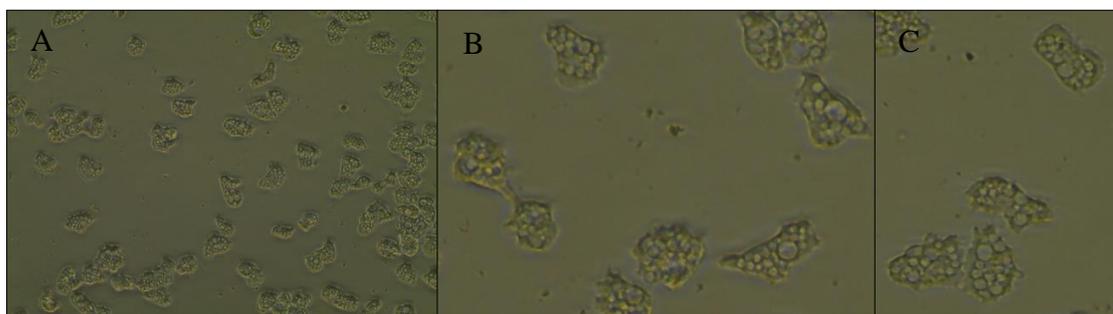


Figura 6. Cultivos axénicos de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 en pocillos de la microplaca de 96 pocillos para los controles y tratamientos de las cuatro lagunas, reflejando la viabilidad inicial de las amebas antes de infectarlas, vistas con microscopía invertida. A) lente 20 x; B) lente 40 x, con evidencia de división celular; y, C) lente 40 x

6.2. Identificación de los efectos citopáticos (CPE) en *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 luego de la infección

6.2.1. Efectos citopáticos (CPE) en *Acanthamoeba castellanii*

Respecto de los blancos, las tres repeticiones por cada laguna durante toda la experimentación demostraron asepsia y validez del medio PYG, sin ninguna especie o elemento ajeno. En cuanto a las tres repeticiones por laguna de los controles positivos, *Acanthamoeba castellanii* mostró división celular con normalidad sin efectos desfavorables hasta las 148 horas,

después de las cuales las células iniciaron su proceso de desprendimiento de la monocapa por el espacio y tiempo de inoculación. En cuanto a los controles negativos, a las 6 hpi, el 100 % de las células de *Acanthamoeba castellanii* presentaron su etapa de quiste y a las 20 hpi se desprendieron del fondo del pocillo; etapa y disposición que mantuvieron hasta finalizada la experimentación. Todo lo descrito se refleja en la Figura 7.

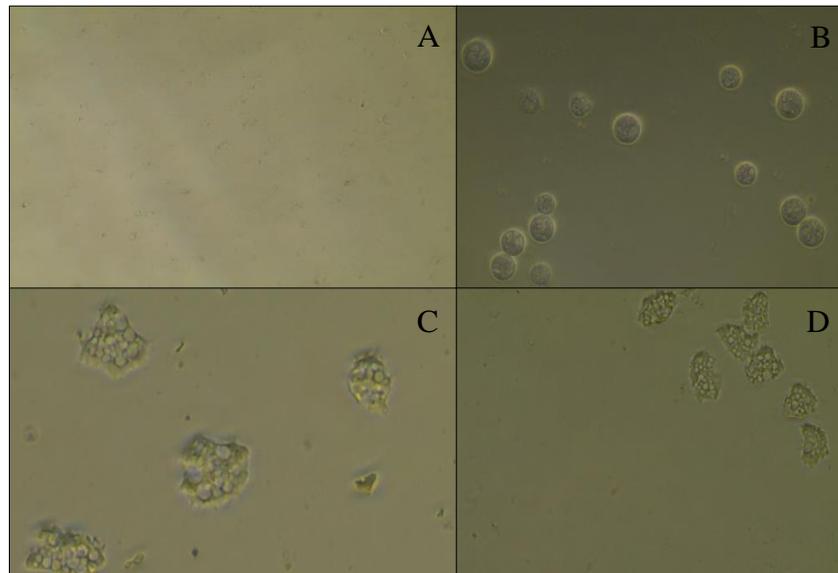
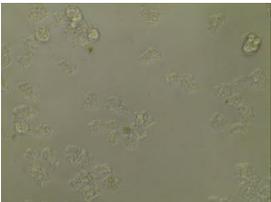
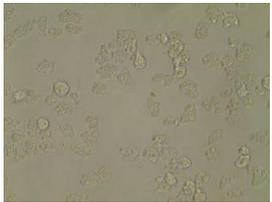
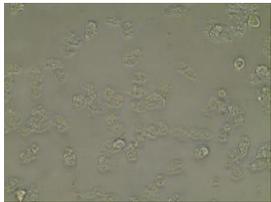
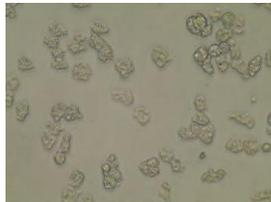
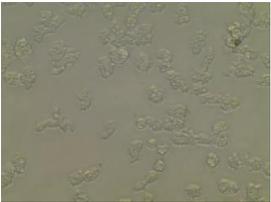
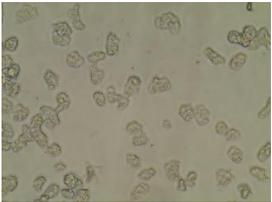
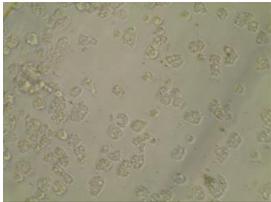
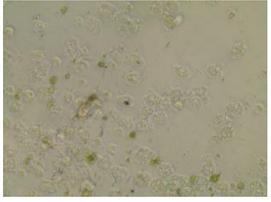
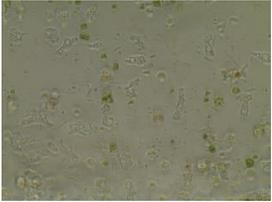
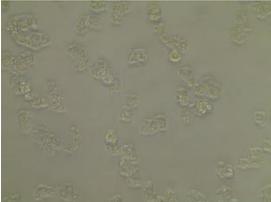
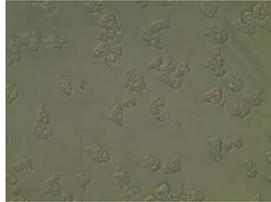
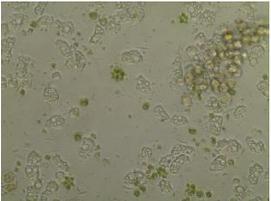
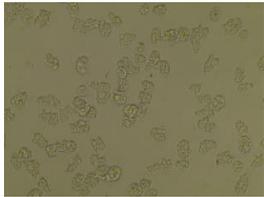
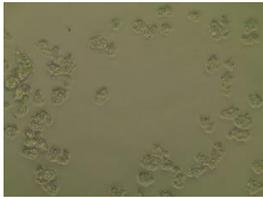
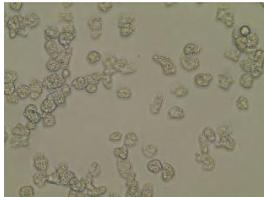
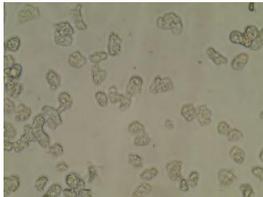
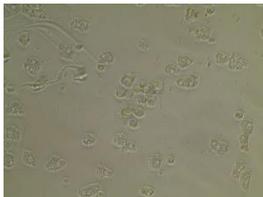
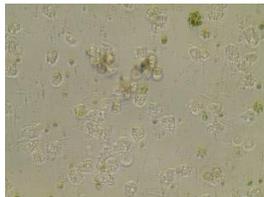
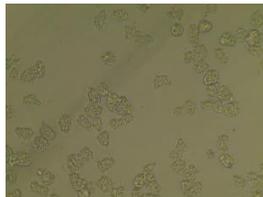
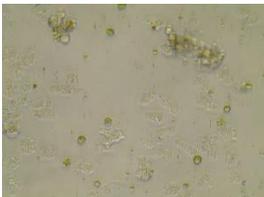


Figura 7. Cultivos monoxénicos de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 en pocillos de la microplaca de 96 pocillos de los ecosistemas lacustres. A) Blanco (medio PYG). B) Control negativo con Hipoclorito de sodio al 0,5 %. Y los controles positivos de las lagunas con vista microscópica invertida con lente 10 x: C) y D)

Los cultivos monoxénicos mostraron cambios evidentes en su configuración al cabo de 20 hpi, con cambios singulares entre las 50 – 100 hpi. Dicho esto, al finalizar el registro, se identificaron siete cambios morfológicos y de comportamiento en las células: desprendimiento celular de la monocapa, reducción del tamaño celular y de las vacuolas, agrupamiento celular, redondeo celular individual y en grupo, así como lisis independiente y en racimos. A continuación, se muestra imágenes con la descripción de cada CPE encontrado y el ecosistema en el cual se observó (Tabla 3).

Tabla 3. Evidencia y descripción de los CPE identificados en los ecosistemas lacustres de la ciudad de Loja

Desprendimiento de la monocapa				D	J	C	P
							
Reducción del tamaño celular				D	J	C	P
							
Redondeo celular				D	J	C	P
							
Redondeo celular en agrupamiento				D			
							

	Reducción de vacuolas	D J C P	
			
	Agrupamiento celular	D	
			
	Lisis celular	J C P	
			
	Lisis celular en agrupamiento	D	
			

Nota: D: Laguna Daniel Álvarez Burneo, J: Laguna Jipiro, C: Laguna Carigán, P: Laguna Punzara. La letra D, J, C o P describe la presencia del CPE. La inicial del ecosistema lacustre afirma la presencia del CPE correspondiente.

6.2.2. Análisis de datos sobre la viabilidad de *Acanthamoeba castellanii*

6.2.2.1. Análisis gráfico

Los resultados expuestos en gráficas de curvas ilustran el número de células infectadas por un posible GV de acuerdo al CPE en función del tiempo (0, 20, 30, 42, 66, 100 y 148 hpi) para las diferentes concentraciones de inóculo ambiental (1:1; 1:10; 1:20). De igual forma, en todas las gráficas se presenta una curva referente al control positivo (C), la que se mantiene en cero en todas las gráficas a lo largo del tiempo, lo que establece la ausencia de efectos citopáticos en las células. Por lo descrito se asume que cualquier cambio identificado en las otras curvas se debe a una infección viral (GV) procedente de los inóculos ambientales con los cuales se infectó a *Acanthamoeba castellanii*. En este contexto, se hace un análisis de los CPE identificados.

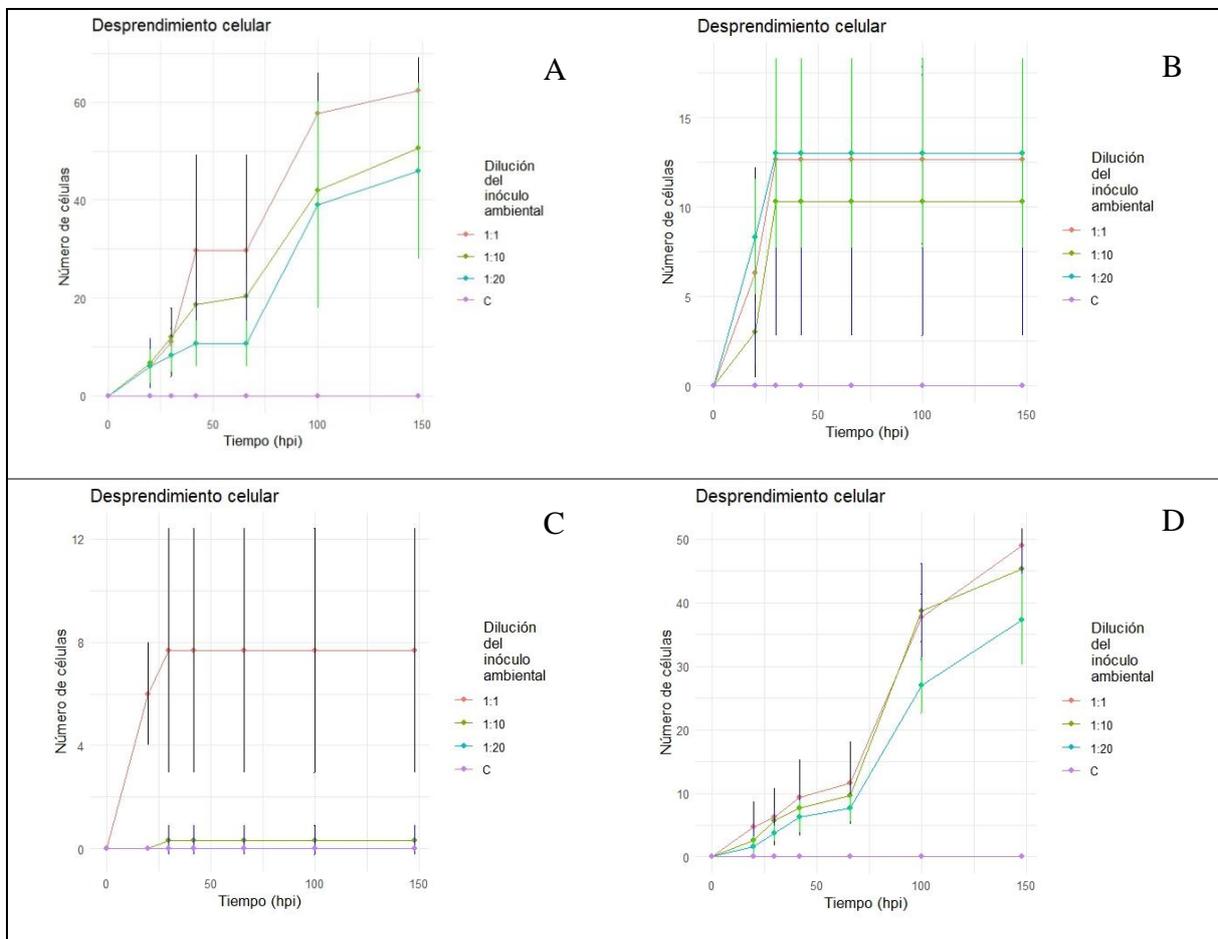


Figura 8. Curvas de infección del desprendimiento de la monocapa (CPE) producto del promedio de las tres repeticiones por cada uno de los tres tratamientos en función del tiempo,

con sus barras de error respecto del control positivo. A) Laguna Daniel Álvarez Burneo, B) Laguna Jipiro, C) Laguna Carigán, D) Laguna Punzara

El desprendimiento de la monocapa (Figura 8), un CPE caracterizado por la pérdida de la capacidad de adherencia de las células al fondo del pocillo, se presentó en todas las inoculaciones de los cuatro ecosistemas lacustres. En cuanto a las curvas de infección, indicaron un incremento gradual del CPE acorde a las diluciones del inóculo ambiental con una relación directa, es decir, el inóculo no diluido (1:1) resultó en un mayor desprendimiento celular comparado con las diluciones menores (1:10 y 1:20) la cual fue menos severa, indicando que la concentración del posible GV tiene un impacto directo en el número de células infectadas y desprendidas.

En el caso de las células infectadas con agua proveniente de las lagunas Daniel Álvarez Burneo (Figura 8A) y Punzara (Figura 8D), sufrieron un incremento de desprendimiento celular con el tiempo, donde entre las 60 – 100 hpi se observó un aumento marcado del CPE. Por el contrario, las lagunas de Jipiro (Figura 8B) y Carigán (Figura 8C), únicamente se observó un desprendimiento celular rápido inicial, entre las 10 – 30 hpi, manteniéndose constante en todos los tratamientos, por lo que alcanzó un máximo temprano y no progresa significativamente más allá de ese punto durante el experimento.

En cuanto a las barras de error de las curvas, en la laguna Daniel Álvarez Burneo (Figura 8A), a partir de las 50 hpi, la variabilidad aumentó, especialmente en las diluciones más altas (1:1 y 1:10), lo que sugiere que hay diferencias en la respuesta de las células al GV en estos puntos temporales, con valores promedio similares de células desprendidas por tratamiento. Respecto de la laguna de Jipiro (Figura 8B), al inicio, la variabilidad fue baja, pero aumentó notablemente después de los primeros puntos temporales, indicando que hay diferencias en la respuesta celular al tratamiento en diferentes réplicas o experimentos.

En la laguna de Carigán (Figura 8C), se observó que la variabilidad fue muy alta para el inóculo 1:1, especialmente después del aumento inicial, pero fue baja para las diluciones 1:10 y 1:20, indicando respuestas más consistentes y menos severas. Sobre la laguna de Punzara (Figura 8D), la variabilidad se mostró baja en todos los tratamientos (1:1; 1:10; 1:20), reflejando

similitudes entre el inóculo 1:1 y 1:10, es decir, baja relación entre la concentración de inóculo ambiental respecto del desprendimiento celular.

La reducción del tamaño celular (Figura 9), CPE característico tras una infección viral, este caso estuvo ligada directamente con otro CPE, la reducción de las vacuolas (Figura 10), por lo que ambos CPE mostraron curvas de infección con cambios graduales idénticos en todas las inoculaciones de los cuatro ecosistemas lacustres. Siendo así, se analizaron sus gráficas de forma indistinta.

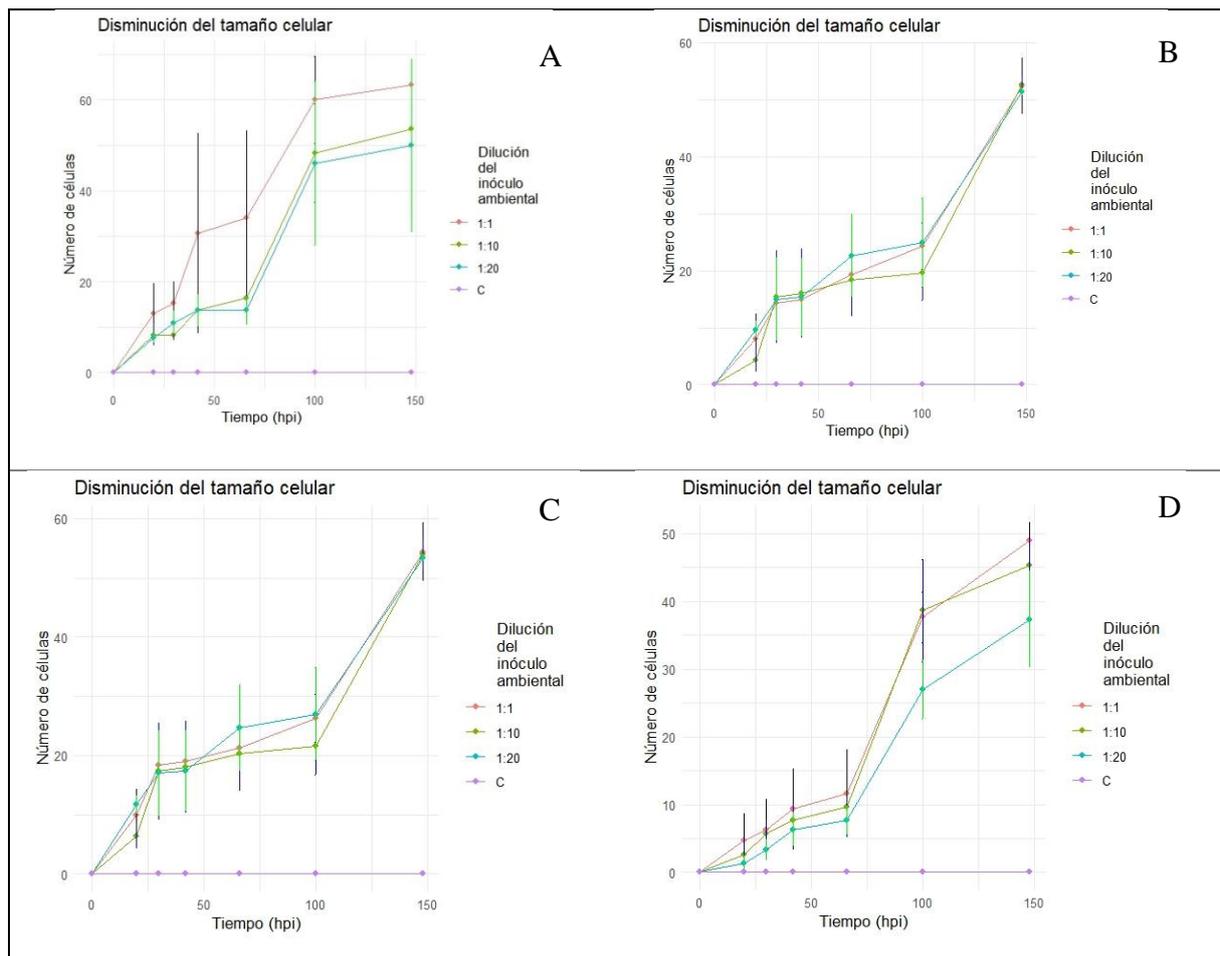


Figura 9. Curvas de infección de la reducción del tamaño celular (CPE) producto del promedio de las tres repeticiones por cada uno de los tres tratamientos en función del tiempo, con sus barras de error respecto del control positivo. A) Laguna Daniel Álvarez Burneo, B) Laguna Jipiro, C) Laguna Carigán, D) Laguna Punzara

En cuanto a las curvas de infección tanto de la reducción del tamaño celular como la reducción de vacuolas, reflejaron que el incremento gradual de ambos CPE no estuvo exactamente acorde a las diluciones del inóculo ambiental, es decir, el inóculo no diluido (1:1) resultó en CPE muy similares a las diluciones menores, con ligera reducción de células promedio infectadas en el inóculo 1:20, pero finalizando todos los tratamientos en ambos CPE.

Lo anterior sucedió en todas las lagunas (Figura 9BCD y Figura 10BCD), excepto en la laguna Daniel Álvarez Burneo (Figura 9A y 10A), donde el inóculo 1:1 reflejó efectos en más células que en los inóculos ambientales menos concentrados, los que sí presentaron infección similar, por lo que se asume que la tendencia a la reducción celular y de vacuolas en el experimento no depende de la concentración del inóculo ambiental.

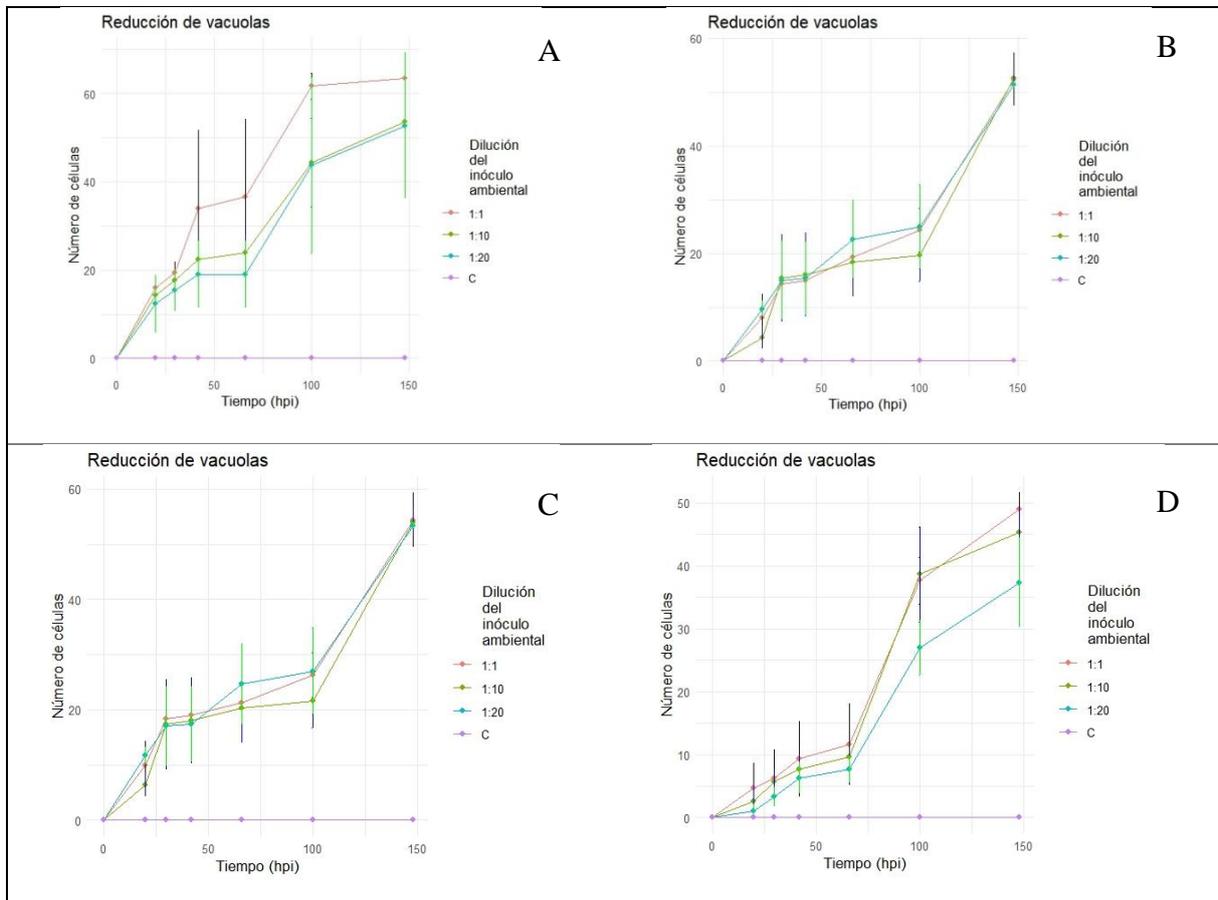


Figura 10. Curvas de infección de la reducción de las vacuolas (CPE) producto del promedio de las tres repeticiones por cada uno de los tres tratamientos en función del tiempo, con sus barras de error respecto del control positivo. A) Laguna Daniel Álvarez Burneo, B) Laguna Jipiro, C) Laguna Carigán, D) Laguna Punzara

En todos los casos se propició un incremento de la reducción del tamaño celular como la reducción de vacuolas con el tiempo, a partir de las 60 hpi, 100 hpi, 100 hpi y 60 hpi, en la laguna Daniel Álvarez Burneo, Jipiro, Carigán y Punzara, respectivamente.

En cuanto a las barras de error de las curvas del CPE de la reducción celular y de vacuolas (Figura 9 y Figura 10), la variabilidad aumentó en la laguna Daniel Álvarez Burneo, a partir de las 40 hpi, especialmente en las diluciones más altas (1:1 y 1:10), lo que sugiere que hay diferencias en la respuesta de las células al GV en estos puntos temporales, con valores promedio similares de células infectadas por tratamiento. Respecto de las lagunas de Jipiro, Carigán y Punzara, la variabilidad fue baja en todos los puntos temporales de las curvas, por lo que las medias se percibieron como representativas y precisas en estos tratamientos.

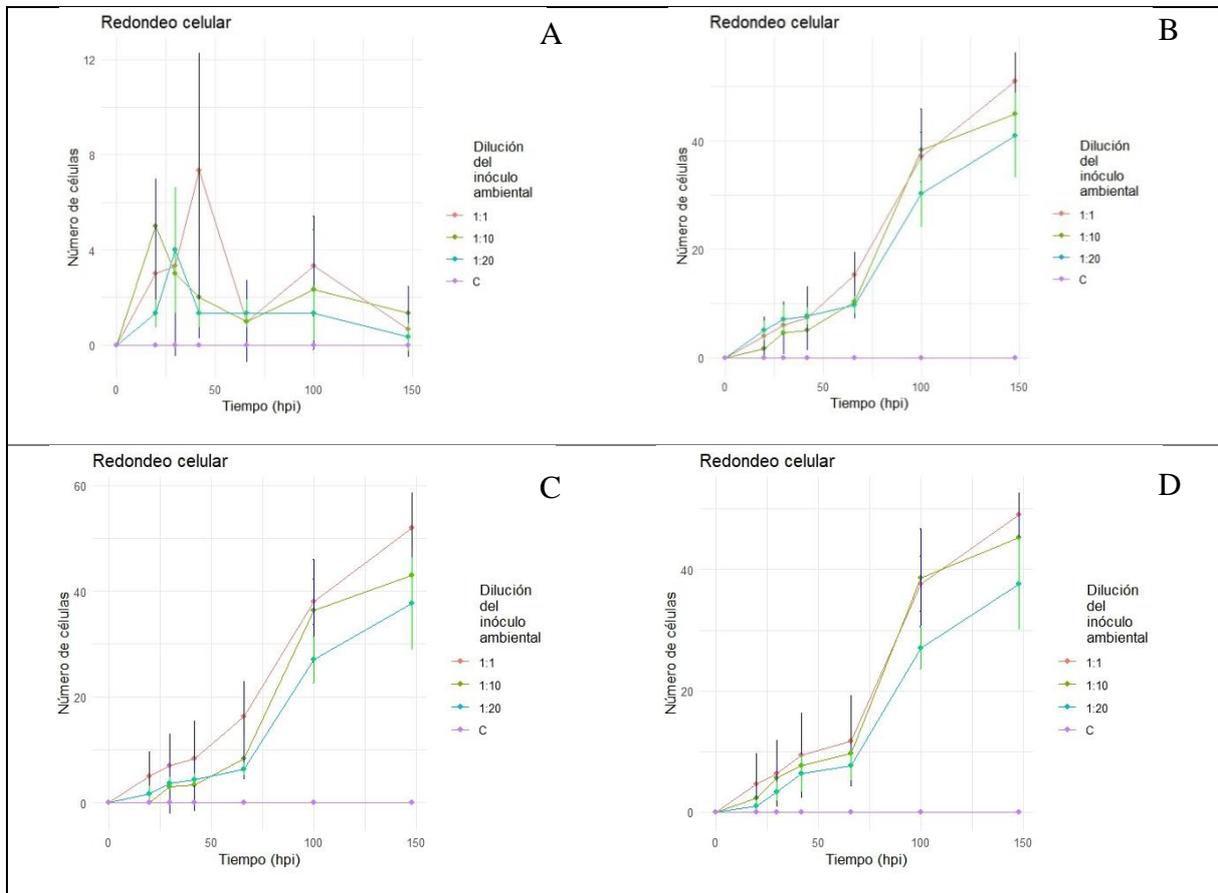


Figura 11. Curvas de infección del redondeo celular (CPE) producto del promedio de las tres repeticiones por cada uno de los tres tratamientos en función del tiempo, con sus barras de error respecto del control positivo. A) Laguna Daniel Álvarez Burneo, B) Laguna Jipiro, C) Laguna Carigán, D) Laguna Punzara

Sobre el redondeo celular, definido por Fukaya y Takemura (2023) como un CPE generalista ocasionado tras la infección de un GV en *Acanthamoeba castellanii*, se debe indicar que todas las inoculaciones de los cuatro ecosistemas lacustres lo presentaron (Figura 11).

En cuanto a las curvas de infección del redondeo celular (Figura 11), el incremento gradual de células promedio redondeadas no se relacionó directamente a las diluciones del inóculo ambiental, ya que, aunque el inóculo no diluido (1:1) resultó superior en número de células infectadas, fue bastante similar al número de infectadas bajo diluciones menores, con una ligera reducción de células promedio infectadas en el inóculo 1:20, donde al final de la experimentación las lagunas de Jipiro, Carigán y Punzara (Figura 11BCD, respectivamente) presentaron este efecto. Siendo así, se asume que de la concentración del inóculo ambiental no depende la tendencia al redondeo celular.

Lo descrito anteriormente no ocurrió en la laguna Daniel Álvarez Burneo (Figura 11A) donde, aunque el inóculo 1:1 reflejó efectos en más células que en los inóculos ambientales menos concentrados, al inicio de la infección (20 hpi) el inóculo 1:10 exhibió mayor número de células infectadas en ese lapso, pero fue bastante claro que al final de la experimentación las células no se estabilizaron en un redondeo celular independiente.

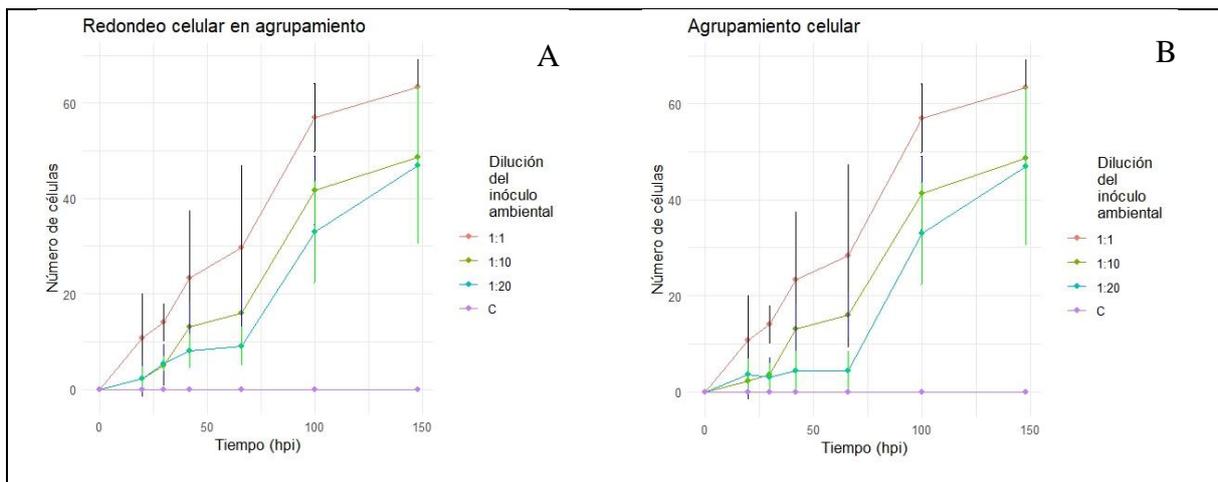


Figura 12. Curvas de infección del redondeo celular agrupado (A) y agrupamiento celular (B) producto del promedio de las tres repeticiones por cada uno de los tres tratamientos en función del tiempo, con sus barras de error respecto del control positivo, de la laguna Daniel Álvarez Burneo

Como se describe en la Figura 12A, las células del pocillo de la laguna Daniel Álvarez Burneo se redondearon formando racimos (redondeo celular en agrupamiento) y/o, en la Figura 12B, se presentó la tendencia a la conformación de grupos celulares (agrupamiento), efectos que sí presentaron relación directa entre diluciones, es decir, que el mayor número de células infectadas fue dependiente de una mayor concentración de inóculo ambiental.

Lo dicho anteriormente se visualizó únicamente en esta laguna, no así en las lagunas de Jipiro, Carigán y Punzara, donde las células se redondearon (Figura 11BCD, respectivamente), pero no de forma grupal, representando un incremento gradual de circularidad a partir de las 70 hpi. En cuanto a las barras de error de las curvas del redondeo celular, las lagunas de Jipiro, Carigán y Punzara, mostraron que una baja variabilidad en todos los puntos temporales, por lo que las medias se perciben como representativas y precisas en estos tratamientos.

A diferencia de la laguna Daniel Álvarez Burneo, en la que la variabilidad de las curvas de infección del redondeo celular independiente aumentó de las 20 – 50 hpi (Figura 11A), lo que sugiere que hay diferencias entre los valores promedio calculados entre repeticiones por tratamiento; sin embargo, el redondeo grupal (Figura 12A) y/o agrupamiento (Figura 12B), disponen de un error superior en el promedio de las repeticiones entre las 30 – 70 hpi del inóculo 1:1, en oposición a los errores temporales de los demás inóculos ambientales de este caso, en los cuales la media de las repeticiones fue bastante representativa.

La lisis celular, fue otro efecto citopático originado por los inóculos ambientales en todos los tratamientos de las cuatro lagunas, caracterizado por la desintegración celular de *Acanthamoeba castellanii*. En este sentido, las curvas de lisis celular (Figura 13) indican que el incremento gradual de las células promedio lisadas fueron proporcionales a la concentración del inóculo ambiental, es así que, el inóculo no diluido (1:1) resultó superior en número de células infectadas en el tiempo que la dilución 1:10, y ésta de igual forma superior a la dilución 1:20; todo esto a partir de las 40 hpi. Este efecto fue identificado desde las primeras horas de inoculación (20 hpi) hasta el final de la experimentación (148 hpi), donde todas las lagunas presentaron este efecto (Figura 13BCD), con ciertas excepciones en la laguna Daniel Álvarez Burneo.

En la laguna Daniel Álvarez Burneo la lisis celular se presentó de forma diferente, ya que para lisarse se formaron racimos o lisis en agrupamiento (Figura 13A). A partir de las 40 hpi y 70 hpi se identificó la presencia de este CPE, con relación directa entre la cantidad de inóculo ambiental y el número de células lisadas en el tiempo por tratamiento. Además, las barras de error muestran que la variabilidad de las curvas promedio de lisis grupal del inóculo 1:1 y 1:10 fue elevada, lo que corrobora que hay diferencias entre los valores promedio calculados entre repeticiones por tratamiento. Pero en cuanto a las barras de error de las curvas de lisis de las lagunas de Jipiro, Carigán y Punzara (Figura 13BCD), la variabilidad fue baja en todos los puntos temporales, con ciertos incrementos a las 100 y 148 hpi, por lo que las medias se perciben como representativas en estos tratamientos.

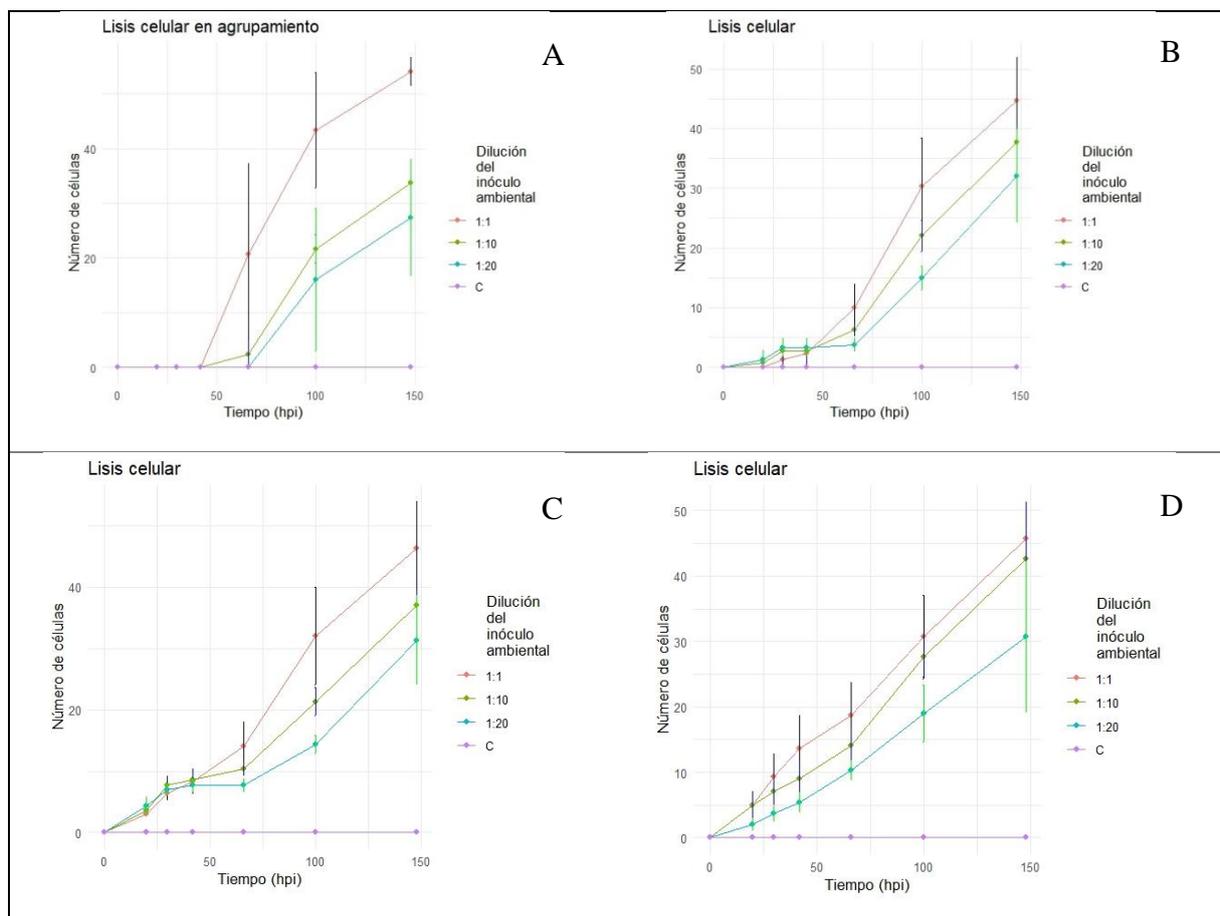


Figura 13. Curvas de infección de la lisis celular (CPE) producto del promedio de las tres repeticiones por cada uno de los tres tratamientos en función del tiempo, con sus barras de error respecto del control positivo. A) Laguna Daniel Álvarez Burneo (lisis en agrupamiento), B) Laguna Jipiro, C) Laguna Carigán, D) Laguna Punzara

En cuanto a la presencia de células sanas durante los tratamientos (Figura 14ABCD), el conteo de éstas permitió establecer curvas para compararlas con el control positivo, en el cual se contabilizaron también las células sanas. Este contraste refleja cómo las células de *Acanthamoeba castellanii* sin infectar ejecutaron división celular de forma creciente sin interrupción, esto hasta que su confluencia en espacio lo permitió. Por el contrario, el número promedio de células sanas de los tratamientos fue decreciente, por contener inoculación ambiental. En cuanto al error graficado, se describe como poco significativo, por lo que las curvas promedio fueron consideradas como precisas.

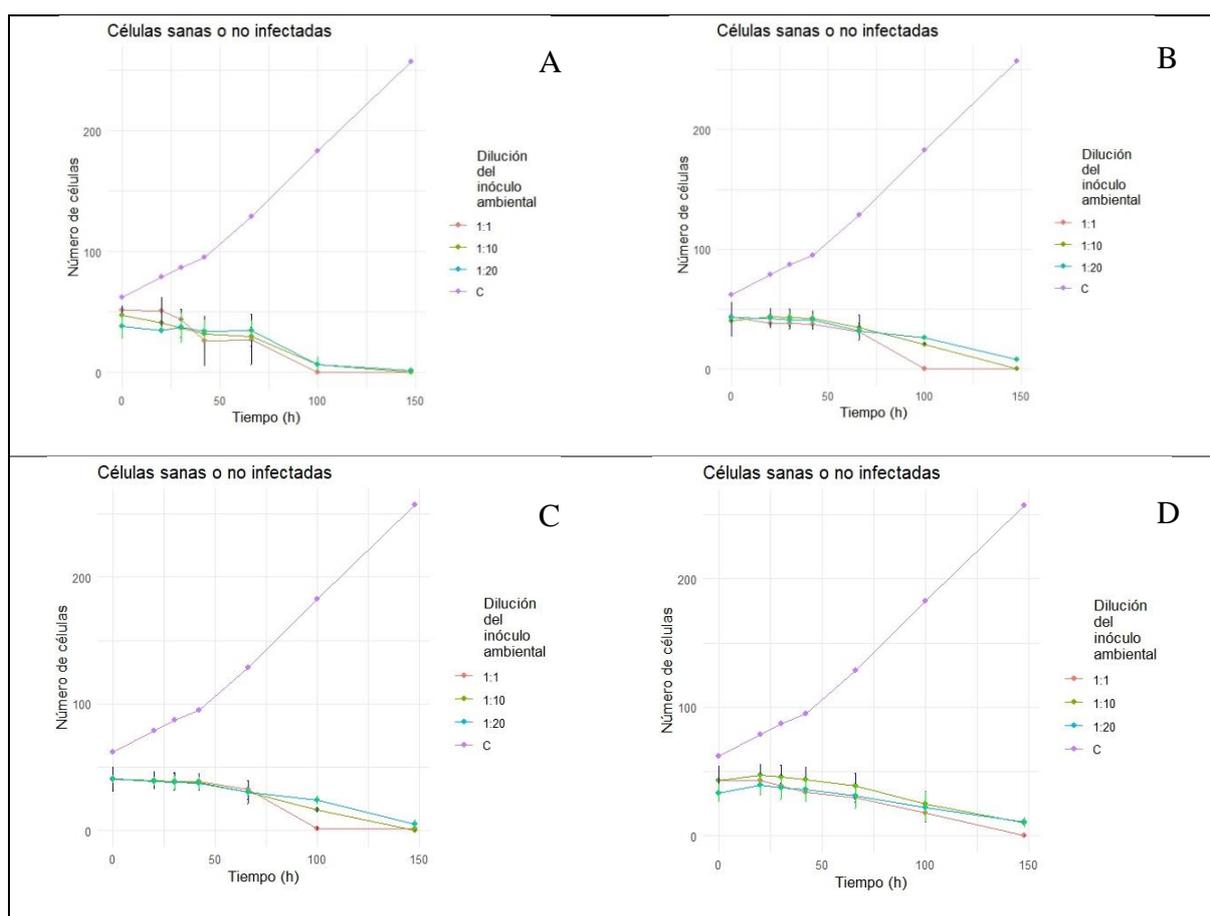


Figura 14. Curvas de células sanas producto del promedio de las tres repeticiones por cada uno de los tres tratamientos en función del tiempo, con sus barras de error respecto de las células sanas (trofozoíto) del control positivo. A) Laguna Daniel Álvarez Burneo, B) Laguna Jipiro, C) Laguna Carigán, D) Laguna Punzara

6.2.2.2. Análisis estadístico

Confirmada la ausencia de distribución de datos a través de la prueba Shapiro-Wilk (p -valor $\leq 0,05$), se obtuvo un nDMS (Figura 15) y la prueba no paramétrica PERMANOVA (Figura 16). En el análisis multivariado nDMS del conjunto de datos agrupados por localidad (Figura 15), las distancias euclidianas muestran la similitud entre ecosistemas, por lo que, cuanto más próximos estén (Jipiro, Carigán y Punzara), más similares son. En cuanto al stress ($0,03 < 0,05$), refleja de manera fiel las relaciones entre lagunas en el espacio original. Así, los datos entre las lagunas de Jipiro, Carigán y Punzara fueron bastante similares entre sí, pero diferentes a los datos de la laguna Daniel Álvarez Burneo. Lo que hace suponer que la infección viral entre las primeras lagunas es efecto de un posible ente en común, a diferencia de la última laguna cuyo efecto podría corresponder a un posible ente diferente.

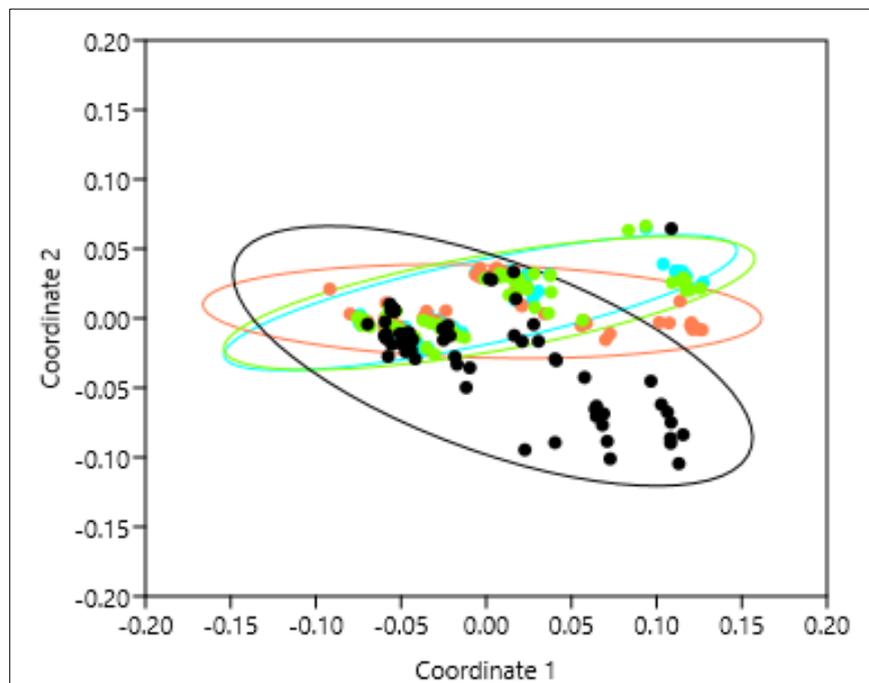


Figura 15. Gráfica de análisis multivariado *Non-metric Multidimensional Scaling* (MDS) aplicando distancias Euclidianas sobre la dispersión o variabilidad entre los grupos de datos de cada ecosistema lacustre (negro: Laguna Daniel Álvarez Burneo; verde: Laguna de Jipiro; turquesa: Laguna de Carigán; naranja: Laguna de Punzara)

En cuanto al conjunto de datos agrupados por tratamiento especificado, para cada laguna, estos no fueron significativamente diferentes entre el tratamiento con inoculación 1:1 y

1:10, mientras que el tratamiento 1:20 si presentó diferencias significativas. Esto es consistente con el análisis gráfico, donde se logró identificar durante la experimentación que los dos primeros tratamientos presentaron tendencia de infección gradual bastante similar entre sí, en comparación en el tratamiento más diluido, el cual tuvo una tendencia inferior, consistente con la concentración del inóculo. Lo anterior por CPE. Respecto de las tres repeticiones por tratamiento, para cada CPE, estas no mostraron diferencias significativas, por lo que debido a la similitud de simulación de efectos citopáticos entre ellas se asume que en cada repetición el posible ente infeccioso fue el mismo.

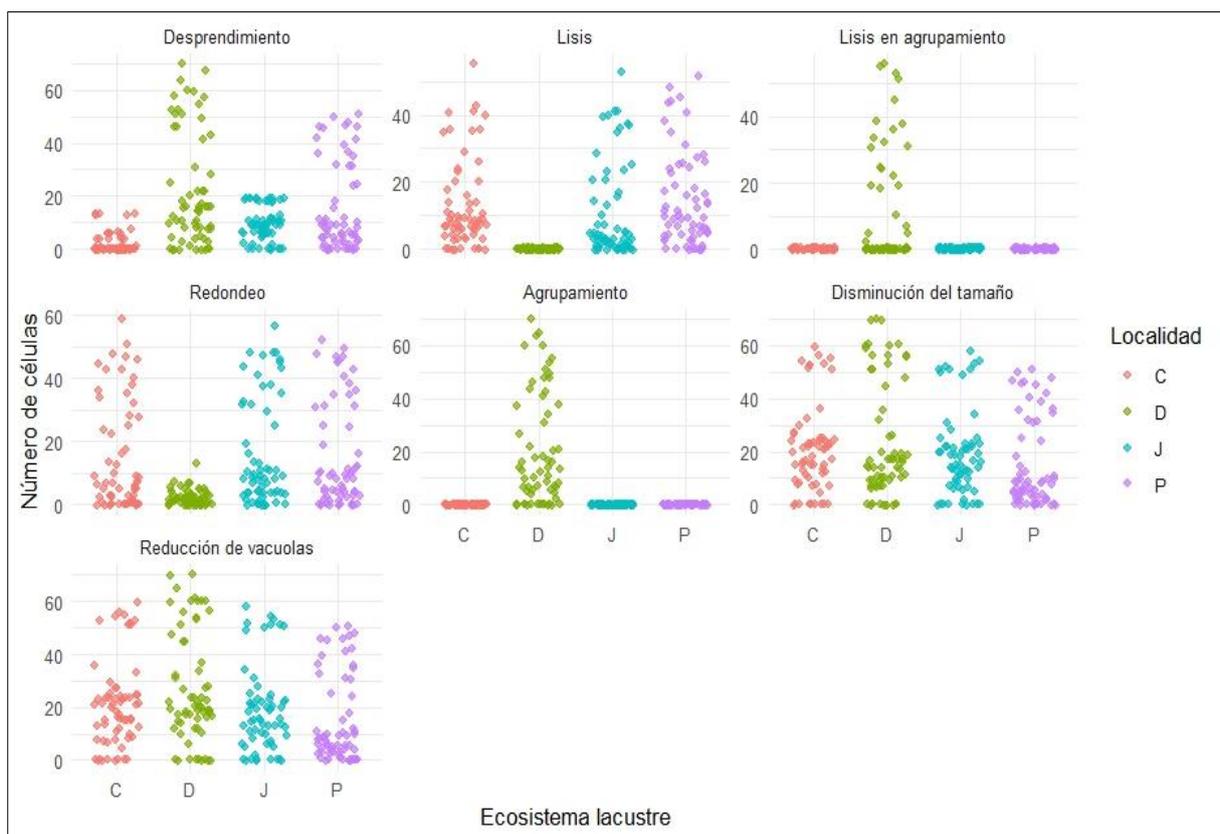


Figura 16. Gráficos de dispersión de puntos (PERMANOVA) sobre la similitud de infección viral (número de células de *Acanthamoeba castellanii* infectadas) de los diferentes CPE identificados entre ecosistemas lacustres (D: Laguna Daniel Álvarez Burneo; J: Laguna de Laguna de Jipiro; C: Laguna de Carigán; P: Laguna de Punzara). Las variables están agrupadas considerando los tiempos post infección, los tres tratamientos y las tres repeticiones correspondientes a cada tratamiento de cada ecosistema lacustre en función del número de células.

En cuanto a la similitud de la posible infección viral entre ecosistemas lacustres (Figura 16), el desprendimiento celular de la monocapa se comportó de forma diferente en todas las lagunas, en concordancia con lo reflejado en el análisis gráfico, en el cual es bastante evidente el comportamiento diferenciado entre lagunas. Sobre la disminución del tamaño celular fue significativamente similar ($p > 0,001$) entre todas lagunas, al igual que el comportamiento de las células sanas en todos los tratamientos, de forma que van disminuyendo en número con el tiempo. En cuanto al redondeo y lisis celular, así como la reducción de las vacuolas de las células, se presentaron de forma similar en todas las lagunas, excepto en la laguna Daniel Álvarez Burneo, lo cual es consistente con los CPE diferentes que ésta presentó frente al resto de lagunas, ya que la infección viral si ocasionó redondeo celular, pero de forma agrupada al igual que la lisis.

Prueba de Friedman										
Desp	Tamaño menor	Circ	Lisis	Vac	Lisis agrup	Circ Agrup	Sanas	T ²	p	
4.46	5.80	4.42	3.88	5.99	2.22	2.68	6.55	226.55	<0.0001	
<i>Minima diferencia significativa entre suma de rangos = 72.432</i>										
Tratamiento	Suma(Ranks)	Media(Ranks)	n							
Lisis agrup	559.00	2.22	252	A						
Circ Agrup	675.00	2.68	252	B						
Lisis	977.50	3.88	252	C						
Circ	1114.50	4.42	252	D						
Desp	1124.00	4.46	252	D	E					
Tamaño menor	1462.50	5.80	252			F				
Vac	1509.50	5.99	252			F	G			
Sanas	1650.00	6.55	252					H		
<i>Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.050)</i>										

Figura 17. Comparación entre variables o CPE registrados respecto de las medias significativamente diferentes mediante la prueba de Friedman

Respecto del análisis entre variables o efectos citopáticos suscitados, se logró identificar similitudes ($p > 0,05$) entre CPE, es decir, variables que son congruentes entre sí. Para ello se muestra la Figura 17, en la cual es claro que el desprendimiento celular y el redondeo celular se presentaron y comportaron de forma semejante durante la infección respecto del tiempo post infección, al igual que sucedió entre la reducción del tamaño celular y disminución de vacuolas.

Esto permitió identificar que, a medida que el posible ente infectante genera disminución del tamaño celular, también produce disminución de vacuolas.

Con énfasis en los análisis celulares, gráficos y estadísticos de los CPE descritos se establece que los CPE en *Acanthamoeba castellanii* sí variaron al ser infectada con posibles GV provenientes de muestras ambientales de diferentes lagunas. En este sentido, la laguna Daniel Álvarez Burneo presentó una infección viral diferente a la de las lagunas de Jipiro, Carigán y Punzara. Sin embargo, en todos los ecosistemas varió el número de células viables de *Acanthamoeba castellanii* en el tiempo durante la fase de infección.

6.3. Identificación o determinación de posibles virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño infectantes de acuerdo a los CPE de *Acanthamoeba castellanii*

En cuanto a la morfogénesis de las células producto de la infección con inóculos ambientales de las lagunas de Jipiro y Carigán, presentaron desprendimiento de escasas (8-10 células) células solo hasta las 30 hpi, mientras que las células infectadas con agua de la laguna de Punzara se fueron desprendiendo gradualmente durante toda la experimentación. Fuera de dicha especificación, las tres lagunas presentaron infección viral que ocasionó que las células se redondeen sin agruparse, conforme se reducían sus vacuolas y su tamaño (20 hpi), desembocando todas finalmente en lisis celular. De igual manera, la división celular se registró hasta las 20 hpi, y posteriormente no se identificó incremento de células sanas producto del primer proceso. Por lo indicado, se asumió como una especie de infección viral igual para estos tres ecosistemas.

La morfogénesis de las células infectadas con inóculos de la laguna Daniel Álvarez Burneo progresivamente presentaron la reducción del tamaño celular y de vacuolas (20 hpi), las que posteriormente se fueron desprendiendo de la monocapa (40 hpi) cuando se tornaban circulares formando agrupamientos celulares, los que a partir de las 40 hpi iniciaron proceso de lisis. Cabe indicar que las células presentaron división celular hasta las 20 hpi; sin embargo, en el resto de puntos temporales no se registró incremento del número de células sanas.

En cuanto a la indagación de investigaciones relacionadas a la infección viral reconocida en las lagunas de Jipiro, Carigán y Punzara, el estudio realizado por Fukaya y Takemura (2021), acerca del análisis cuantitativo de cambios morfológicos y de comportamiento de

Acanthamoeba castellanii infectada con virus gigantes, afirma que el Kytovirus, el Mimivirus, el Medusavirus, y el Pandoravirus, todos GV, ocasionan en *Acanthamoeba castellanii* CPE generales como el redondeo celular inducido por la infección, así como la inhibición de la división celular y la disminución de la movilidad. En este sentido, esta investigación no registró motilidad por circunstancias metodológicas, pero sí los dos primeros CPE, cambios inminentes de los virus gigantes mencionados, por lo que se evaluaron los cambios singulares de dichos GV.

La investigación de Fukaya y Takemura (2021) registra que el Kytovirus tiene un ciclo de replicación extremadamente rápido. El CPE más notable que muestra es la reducción del tamaño celular junto con la disminución de vacuolas después de 2 hpi, y termina casi de inmediato a las 12 hpi. Siendo así, se descartó la presencia de Kytovirus en esta experimentación.

De acuerdo al estudio de Fukaya et al. (2023) en el cual se analizan los cambios morfológicos y de comportamiento de células amebales tras la infección viral, capturados en imágenes microscópicas, mediante el algoritmo de análisis cinético basado en contraste de fase para amebas (PKA3), se reconoce que la estrategia de infección de Medusavirus en *Acanthamoeba castellanii*, consiste en que al tiempo que el núcleo incrementa de tamaño, por el contrario las vacuolas y el tamaño celular se reducen, donde además el contorno celular se dispone de forma circular a partir de las 12 hpi. Asimismo, Fukaya et al. (2023) establecen que el incremento del núcleo se debe a que este GV replica su ADN en esta sección de la ameba y que la división celular se detiene tras 1 hpi. Lo descrito es compartido también por Takemura (2020) y Tokishawa et al. (2019), y también suplementado con la afirmación de que *Acanthamoeba castellanii* es el huésped ideal de laboratorio para la identificación de Medusavirus.

Lo anterior es bastante consistente con los CPE descritos para las lagunas de Jipiro, Carigán y Punzara, no obstante, de acuerdo a Fukaya y Takemura (2021), a más de los CPE indicados como universales, la infección de Medusavirus ocasiona comportamientos giratorios y enquistamiento a *Acanthamoeba castellanii*, además de cierto grado de incremento de tamaño celular hasta antes de las 12 hpi. Del mismo modo, tras el mayor incremento de células de menor tamaño (96 hpi), el promedio de redondeo se torna menor, lo cual se debe al inicio de

procesos de lisis celular (Fukaya y Takemura, 2021.; Yin et al., 2012). De igual forma Zhang et al. (2021) mencionan que el perfil transcripcional de los genes de *Acanthamoeba castellanii* y su morfología se altera enormemente después de la infección de Medusavirus, haciendo énfasis en la variación del tamaño celular y de vacuolas, pero también establecen la formación de quistes, lo cual es compartido por Yoshikawa et al. (2019).

Dicho lo anterior, el comportamiento rotacional, el enquistamiento, el aumento de tamaño celular de *Acanthamoeba castellanii* antes de las 12 hpi, y en particular, la disminución del efecto de redondeo luego del incremento de células de menor tamaño, no fueron identificados en esta experimentación. Es así que, por todas las aseveraciones descritas, se descartó la posible presencia de Medusavirus en las inoculaciones de las tres lagunas: Jipiro, Carigán y Punzara.

En cuanto al Pandoravirus, es un virus gigante con un comportamiento idéntico al Medusavirus, con la única diferencia de que mientras el segundo replica su ADN en el núcleo de la ameba, el primero causa confusión en el núcleo de *Acanthamoeba castellanii* (Fukaya y Takemura, 2021; Philippe et al., 2013). Dicho lo anterior, de igual manera que el Medusavirus, se asumió que los CPE registrados en *Acanthamoeba castellanii* producto de la infección con inóculos ambientales provenientes de las lagunas de Jipiro, Carigán y Punzara no fueron ocasionados por Pandoravirus.

En cuanto al Mimivirus, el primero reconocido, promueve una morfología post infección viral en *Acanthamoeba castellanii* con CPE congruentes a los descritos en esta investigación. De acuerdo al estudio de Dos Santos et al. (2021), el género *Acanthamoeba* es un hospedero conocido de Mimivirus, lo cual coincide con Abrahão et al. (2014), quienes establecen a *Acanthamoeba castellanii* como hospedero amebal para su aislamiento, aunque haya sido descubierto mediante *Acanthamoeba polyphaga*. Dos Santos et al. (2021) indican que el ciclo de replicación de este virus en la ameba se da mediante fagocitosis y al crecer la fábrica viral se reorganiza la morfogénesis hasta culminar en lisis celular, para liberar las partículas virales; lo cual de igual forma fue consistente con lo registrado en este estudio.

A lo anterior deben sumarse las especificaciones del ciclo viral de Mimivirus que, de acuerdo a Fukaya y Takemura (2021), las células amebales sanas o en estado de trofozoíto a

partir de las 18 hpi de este GV, se reducen, y a partir de aproximadamente las 30 hpi la presencia de células en etapa de trofozoíto es casi nula. Asimismo, Fukaya y Takemura (2021) enfatizan además en que la disminución del tamaño celular y de vacuolas, así como el incremento de circularidad y de distancia de movimiento, comienzan y terminan simultáneamente. De igual forma, Yaakov et al. (2019) y Fukaya et al. (2020) mencionan que la infección por Mimivirus provoca una creciente y gradual circularidad en las células amebales.

Todo lo descrito anterior fue consistente con lo sucedido en este estudio, a excepción de la distancia de movimiento, pero es un parámetro que no fue evaluado en esta investigación, por lo que se asumió que los CPE registrados en *Acanthamoeba castellanii* producto de la infección con inóculos ambientales provenientes de las lagunas de Jipiro, Carigán y Punzara pudieron ser ocasionados posiblemente por el Mimivirus.

En cuanto a la revisión bibliográfica sobre la morfogénesis tras la infección viral que se reconoció en la laguna Daniel Álvarez Burneo, se centró en investigar GV registrados que ocasionen, como en esta investigación, congregaciones celulares en *Acanthamoeba castellanii* o racimos.

De acuerdo a Fukaya et al. (2020), el Tupanvirus, el Kashiwazakivirus y el Hokutovirus infectan células de *Acanthamoeba castellanii* haciendo que formen aglomeraciones celulares llamadas racimos. Es más, el estudio de Machado et al., (2022), indica que la infección viral que genera racimos celulares en amebas es producida por Tupanvirus. La investigación de Oliveira et al. (2019), establece que el ciclo de replicación de Tupanvirus, consiste en ingresar a las amebas mediante fagocitosis, en las que ensamblan su fábrica viral y producen una nueva morfogénesis celular. La infección resulta en cambios a nivel morfológico y de comportamiento, y pronto pasa a lisis para liberar viriones que continúan con la replicación viral (Abrahão et al., 2018; Andrade et al., 2017).

Oliveira et al. (2019), establecen que los CPE generados por el Tupanvirus son bastante similares a los generados por el Mimivirus, lo que es consistente con lo que se registró en este estudio. En esta misma línea, Oliveira et al. (2019) indican que los racimos se forman a partir de las 12 hpi como a las 24 o 30 hpi, es decir, en temporalidades variadas, no obstante, aquellos más antiguos, 24 horas luego de su aparición, tienden a lisarse o hallarse muy dañados, lo que

coincidió con la morfología y comportamiento de las células post infección de esta investigación. Por todo lo anterior se asumió que el posible GV infectante de *Acanthamoeba castellanii* proveniente de los inóculos ambientales de la laguna Daniel Álvarez Burneo fue posiblemente el Tupanvirus.

7. Discusión

Para identificar GV, es necesario comprender y detallar cómo estos actúan en las células del hospedero, por lo que esta investigación consistió en evaluar la viabilidad o capacidad de crecimiento y supervivencia de las células de *Acanthamoeba castellanii*, evidenciada en la presencia o no de CPE, tras ser infectadas con inóculos ambientales con posibles GV de las lagunas Daniel Álvarez Burneo, Jipiro, Carigán y Punzara; todas pertenecientes a la ciudad de Loja. Con dicho fin, esta investigación experimental logró desarrollar cocultivos de amebas y muestras ambientales, así como identificar la presencia de CPE celulares amebales, consiguiendo así percibir la presencia indirecta de GV en todas las localidades. Finalmente, el detalle de los CPE en cuanto a tipo de CPE, número de células infectadas y el tiempo de ocurrencia de la infección permitió describir los posibles GV responsables de esos cambios estructurales en las células amebales.

Los GV son ubicuos, capaces de habitar desde ecosistemas acuáticos hasta terrestres, ambientes naturales o artificiales, y bajo condiciones ambientales normales e inhóspitas (Colson et al., 2017). Boratto et al. (2020) explican que, la presencia de este tipo de virus es incuestionable en ecosistemas acuáticos como ríos y lagunas urbanas asociadas a procesos de acidificación y eutrofización, ya que prefieren entornos naturales caracterizados por la presencia de partículas orgánicas.

En cuanto a la descripción del área de estudio, la publicación de Camargo et al. (2005) establece que la temperatura, el pH, la conductividad y el oxígeno disuelto, son parámetros que afectan la estructura de las comunidades de organismos que habitan en las aguas y dicha alteración es posible tanto a nivel macro como microscópico. Siendo los parámetros mencionados los que se evaluaron en los entornos de muestreo de este estudio.

El pH de las lagunas estudiadas en la presente investigación mostró que la química del agua es afín a posibles procesos de eutrofización de acuerdo al estudio de Wang et al. (2022),

quienes expresan que las causas de cambio de nutrientes y de eutrofización en ecosistemas acuáticos son influenciadas de forma determinante por el pH y el oxígeno disuelto. En cuanto al oxígeno disuelto, este parámetro estuvo subordinado a sistemas de aireación artificial durante la toma de muestras en los sitios descritos, por lo que este no revela una caracterización consistente. Respecto del valor de los sólidos suspendidos (>100 mg/l) de la laguna Daniel Álvarez Burneo, éste indicó capacidad insuficiente de dispersión o absorción de la luz del agua, lo que se relaciona directamente con la turbidez e ineficiencia en procesos celulares de los organismos acuáticos. La misma laguna dispone de una capacidad de conducción eléctrica que exhibe elevada presencia de sales o procesos de mineralización.

Por lo descrito, es cierta la diferencia del entorno en la que se desarrolla la laguna Daniel Álvarez Burneo respecto del resto de lagunas (Jipiro, Carigán y Punzara), donde cabe indicar que la primera es un sitio de mayor concurrencia dada su ubicación más cercana a poblados. Así también, mediante la observación directa y caracterización de los ecosistemas se asume la presencia de eutrofización en dichos sitios; sin embargo, esto debe ser dilucidado en una futura investigación especializada.

Con el desarrollo del cultivo axénico de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 (100,00 µl de amebas y 25,00 ml PYG) expuesto a incubación (30,00 °C), se logró obtener cepas amebales en su etapa de trofozoíto con una confluencia celular del 90 – 100 %, al cabo de seis días, tiempo semejante a los estudios de Machado et al. (2022) y Vásquez (2024), quienes emplearon entre 3 – 5 días. No obstante, el requerimiento experimental de obtener amebas mejor dispuestas en espacio y cantidad se alcanzó diluyendo el primer cultivo axénico (100,00 µl de amebas y 25,00 ml PYG), es decir, reduciendo la cantidad de amebas inoculadas e incrementando el medio PYG (10,00 µl de amebas y 50,00 ml PYG).

Machado et al. (2022) informan que la dilución celular es una técnica efectiva para obtener células más dispersas que permitan el recuento celular. Fukaya y Takemura (2023) ejecutaron una dilución distinta del cultivo axénico de *Acanthamoeba castellanii*, pero con el mismo fin que esta investigación, aplicando agua destilada, no medio PYG, durante la disposición de las amebas en la placa de 96 pocillos para obtener un volumen total de 400,00 µl con células en suspensión diluidas en menor concentración. Con ello, esta experimentación establece que incrementar el medio de cultivo PYG y disminuir la cantidad de inóculo de

Acanthamoeba castellanii ATCC 30010, permite una observación y descripción microscópica óptima de las amebas, facilitando su disposición en espacio y cantidad, antes y después de ser infectada.

Por otra parte, el control positivo (Figura 14), que trata de células de *Acanthamoeba castellanii* dispuestas sin inoculación con muestras ambientales, durante las 148 hpi de experimentación mostró crecimiento exponencial, dada la nula presencia de CPE, tal como se muestra en todas las curvas de infección. Lo expuesto destaca la cabida de la ameba para mantener su capacidad de división celular, incrementando su población con el tiempo, sin que su viabilidad se vea comprometida, siempre que no exista un inóculo externo impuesto, que irrumpa en su desarrollo. Por el contrario, el control negativo (Figura 7B) deja entrevisto que otra sustancia, no específicamente un posible ente, como el hipoclorito de sodio (0,50 %), hace que las células amebales pierdan viabilidad, pero con un efecto instantáneo de enquistamiento (6 hpi), ya que este compuesto causa a las amebas un efecto de irrupción del desarrollo celular (Kardaras et al., 2023), más no CPE como los descritos para los demás tratamientos de las lagunas.

Durante todos los tratamientos, la división celular se detuvo a las 20 hpi, lo que reafirma junto con el quebranto de proporción de células sanas (Figura 14) en comparación con el control positivo (Figura 14), que la viabilidad de las células amebales depende de la no exposición a inóculos ambientales, los mismos que generaron CPE porque posiblemente contenían GV. El análisis de la viabilidad de *Acanthamoeba castellanii* frente a inóculos ambientales con posibles GV determinó cómo estos afectaron la supervivencia y reproducción de esta especie amebal, mediante el conteo, captura fotográfica, observación y descripción celular. La identificación de los CPE descritos permitió así también entender la interacción entre los posibles GV y su hospedero *Acanthamoeba castellanii*, logrando así indagar en sus mecanismos de infección celular.

El análisis estadístico multivariado no métrico multidimensional (MDS), muestra escasa dispersión o variabilidad entre los grupos de datos de las lagunas Jipiro, Carigán y Punzara, a diferencia de la laguna Daniel Álvarez Burneo, la cual presenta evidente variación respecto de los tres primeros ecosistemas, dada la caracterización de CPE de agregaciones celulares amebales que no fueron identificados en las tres primeras lagunas mencionadas. Estos hallazgos

y descripción general, tras el desarrollo de inoculaciones (cocultivos) con los tres diferentes tipos de tratamientos y las tres repeticiones de cada uno para cada ecosistema lacustre, dada la morfogénesis de las células producto de la infección con inóculos ambientales de las lagunas de Jipiro, Punzara y Carigán, se asumió como una especie de infección posiblemente viral igual para estos tres ecosistemas. En dicho contexto, se adjudicó que, la morfología y comportamiento de las células post infección con muestras de agua de dichas lagunas, fueron causados posiblemente por el Mimivirus, debido a que las características identificadas eran consistentes con los CPE generados por este GV en *Acanthamoeba castellanii*, de acuerdo a los reportado por Abrahão et al. (2014), Fukaya y Takemura (2021) y Dos Santos et al. (2021).

Por lo anterior, se establece que posiblemente el Mimivirus es un ente que reside en los ecosistemas lacustres Jipiro, Punzara y Carigán. Y aunque el Mimivirus fue reconocido gracias a *Acanthamoeba polyphaga*, también *Acanthamoeba castellanii* es un hospedero conocido de Mimivirus, según lo establece Abrahão et al. (2014). El Mimivirus promueve una morfología post infección viral en *Acanthamoeba castellanii* con CPE congruentes a los descritos en esta investigación y a aquellos identificados por el estudio de Dos Santos et al. (2021), quien indica que el ciclo de replicación de este GV en la ameba ocurre mediante fagocitosis y al crecer la fábrica viral se reorganiza la morfogénesis hasta culminar en lisis celular, para liberar las partículas virales. De igual forma con lo establecido por Fukaya y Takemura (2021), quienes expresan que las células amebales sanas o en estado de trofozoíto a partir de las 18 hpi de este GV, se reducen, y a partir de aproximadamente las 30 hpi la presencia de células en etapa de trofozoíto es casi nula.

Congruentemente con lo registrado en esta experimentación, Fukaya y Takemura (2021) enfatizan además en que la disminución del tamaño celular y de vacuolas, así como el incremento de circularidad en *Acanthamoeba castellanii*, infectada por Mimivirus, comienzan y terminan simultáneamente, lo que reafirma la idea de que la infección viral sea posiblemente causada por dicho GV. De igual forma, Yaakov et al. (2019), menciona que la infección por Mimivirus provoca una creciente y gradual circularidad en las células amebales (Fukaya et al., 2020), tal como lo mostraron las curvas de infección de las lagunas de Jipiro, Carigán y Punzara en esta investigación. Fukaya y Takemura (2021) establecen que el incremento de la distancia de movimiento celular de las amebas es un CPE de Mimivirus; sin embargo, la distancia de movimiento es un CPE que no fue evaluado en la presente investigación.

Por el contrario, la infección con inóculos ambientales de la laguna de la Daniel Álvarez Burneo, aunque presentó la misma morfogénesis inicial que las lagunas de Jipiro, Punzara y Carigán, adicionalmente mostró agregación celular junto con todos los CPE descritos para las demás lagunas, por lo que estadísticamente los CPE de esta laguna difieren de las demás, es así que se asumió que esta laguna contiene un posible GV infectante distinto al de las demás lagunas. Siendo así, los CPE registrados en *Acanthamoeba castellanii* producto de la infección con inóculos ambientales provenientes de la laguna Daniel Álvarez Burneo fueron posiblemente ocasionados por el Tupanvirus. Fukaya et al. (2020) y De Souza et al. (2020) indican que en el caso del Tupanvirus, este provoca la formación clara de racimos o cúmulos como especies de haces de células redondeadas en células infectadas, tal como se registró durante las horas post infección en este estudio, que de acuerdo a Machado et al. (2022), esta tendencia es característica de aislados de Tupanvirus. A su vez, Oliveira et al. (2019) resaltan que los CPE generados por el Tupanvirus son bastante similares a los generados por el Mimivirus, a excepción de los agregados celulares, lo que es consistente con lo que se inspeccionó en la presente investigación.

Las investigaciones de Andrade et al., (2017), Abrahão et al. (2018) y Oliveira et al. (2019), coinciden en que el ciclo de replicación de Tupanvirus, consiste en ingresar a las amebas mediante fagocitosis, y durante el ensamblaje de su fábrica viral hacen que la morfogénesis de *Acanthamoeba castellanii* cambie ocasionándole CPE que hacen que pierda su viabilidad, por lo que terminan generando lisis celular para liberar viriones, donde la lisis registra temporalidades (12 – 24 hpi) semejantes a las de la actual investigación.

Vásquez (2024), además de desarrollar protocolos de cocultivos, describe de forma general los CPE generados por inóculos ambientales de los mismos ecosistemas estudiados en esta investigación, la laguna Daniel Álvarez Burneo, Jipiro, Carigán y Punzara, indicando que la infección de *Acanthamoeba castellanii* con muestras de agua de dichos ecosistemas lacustres, hace que las amebas pasen de su estado de trofozoíto a una nueva morfogénesis caracterizada por CPE como: el desprendimiento de la monocapa, la disminución del tamaño celular, el redondeo celular, la reducción o ausencia de vacuolas y la lisis celular. Lo anterior es consistente con los hallazgos del presente trabajo, a excepción de la ausencia de descripción de formaciones de agregados celulares del tratamiento con agua proveniente de la laguna Daniel

Álvarez Burneo. Esta prorrogaación en la formación de agregados celulares hace suponer la posibilidad de presencia de diferentes virus en un mismo ecosistema lacustre.

Se debe indicar que *Acanthamoeba castellanii* en el ambiente, además de ser precursora de los ciclos biológicos y biogeoquímicos (Santos y Carrapiço, 2011) y depredadora amebal potencial de bacterias patógenas (Cianobacterias y Firmicutes) y hongos (Bonkowski, 2004), es también consumidora de bacterias no patógenas y causante de patologías como la queratitis (Lorenzo-Morales et al., 2015), resaltando la necesidad de un organismo, elemento o como en este caso, un ente (GV), que regule la viabilidad amebal y evite la sobrepoblación que pongan en riesgo otras especies.

En este contexto, esta investigación establece que los posibles GV presentes en las lagunas muestreadas, consecuentemente ubicuos igual que sus hospederos (Brandes y Linial, 2019), afectan la viabilidad de *Acanthamoeba castellanii* en su ambiente natural, controlando su crecimiento poblacional en los ecosistemas lacustres de Daniel Álvarez Burneo, Jipiro, Carigán y Punzara. Esto se asume en función del estudio de Fukaya y Takemura (2021), en el cual se explica que los GV controlan el incremento y desarrollo poblacional de *Acanthamoeba castellanii* en ambientes acuáticos, es decir, que de estos depende en gran medida la viabilidad celular de ésta y otras especies amebales. Cabe recalcar entonces, que el equilibrio ecológico está sujeto a interacciones que regulen los conjuntos poblacionales en el ambiente, tal como lo hace dicha interacción, por lo que la posible presencia de GV en dichos ecosistemas se asume como positiva.

En cuanto a la conservación y aprovechamiento de los recursos genéticos, esto es posible si se desarrollan estudios que identifiquen y describan organismos, elementos y entes, como los virus gigantes, cuyo campo de estudio es bastante incierto y desconocido. Este tipo de investigaciones ofrecen perspectivas sobre la biología celular para comprender la evolución de los huéspedes, pero también de sus distintos hospederos. Además, la individualización de los GV representa futuras herramientas genéticas donde se apliquen los ORFans contenidos en estos entes con fines de edición genética o para aislar enzimas con aplicaciones técnicas sostenibles a nivel ambiental, como la biorremediación, o para frenar problemas de salud pública, como patologías derivadas de amebas.

A razón de la viabilidad metodológica de este estudio, las investigaciones recientes emplean técnicas complementarias a la microscopía óptica temporal, de modo que logran capturar imágenes por lapsos más cortos (30 segundos), para recrear series y con ellas películas de las células infectadas (Fukaya y Takemura, 2023); esto permite no solo ver los cambios celulares a nivel estructural sino también a nivel de comportamiento, como los registros de cambios de la movilidad o de tendencias celulares giratorias post infección (op. cit.). Lo anterior es afectivo a nivel analítico, ya que se observan comportamientos que no se podrían registrar sin esas cintas de imágenes, además de que se optimiza el tiempo al procesar mayor cantidad de tratamientos y diluciones simultáneamente. Es así que en cuanto a experimentos adicionales respecto del reconocimiento de CPE post infección, es necesario ejecutar averiguaciones con técnicas y equipos con una capacidad mayor, para dar paso a la identificación de efectos a nivel de comportamiento móvil, como el estudio de Fluakaya y Takemura (2023), en el cual se reconoce la disminución o aumento de la movilidad celular, así como efectos giratorios de las células.

En este contexto, para profundizar en el entendimiento de la interacción entre *Acanthamoeba castellanii* y este tipo de virus, es obligatorio ampliar los análisis a nivel molecular mediante secuenciación de genes. Es vital reconocer cómo estos entes influyen a nivel genético a su hospedero. Esto puede indicar cómo se da el intercambio horizontal de genes entre diferentes especies y qué rasgos los huéspedes comparten a sus hospederos, y viceversa, lo que podría resultar tanto contraproducente como beneficioso para alguno de los implicados.

En este sentido, rescatar lo descrito por Bisio et al. (2023), quienes establecen que la controversia desde el descubrimiento de los virus gigantes, en cuanto a la diversidad de su genoma y su genómica funcional, ha motivado la investigación científica, lo mismo que ha influenciado en la generación de métodos y técnicas para reconocer su radiación adaptativa y evolución, como el perfeccionamiento de la captura de imágenes microscópicas de los CPE post infección viral. Es así que, en cuanto a los criterios metodológicos resumidos y aplicados en esta experimentación, los concentran y los confirman como un medio para identificar posibles virus gigantes no solo procedentes de ecosistemas lacustres, sino también de otros tipos de ecosistemas acuáticos como sistemas de aguas residuales, ríos, arroyos, canales de agua, sistemas de refrigeración, entre muchos más.

Por lo mencionado, con evidencia suficiente se establece que, en todos los tratamientos, la viabilidad de *Acanthamoeba castellanii* en el tiempo durante la fase de infección con los posibles GV provenientes de muestras ambientales de las diferentes lagunas, se vio alterada. Los CPE en las células amebales variaron entre las lagunas de Jipiro, Punzara y Carigán, frente a la laguna Daniel Álvarez Burneo. Además, la prospección de los dos tipos de morfogénesis identificadas en las células hospederas, supusieron la posible presencia de dos virus gigantes diferentes: el Mimivirus y el Tupanvirus, respectivamente. Lo descrito refleja la posible presencia de dos virus gigantes en ecosistemas lacustres de la ciudad de Loja, que no ha sido reportada en muestras ambientales de ecosistemas de la provincia y el país. Sin embargo, para confirmar su identificación específica, se propone la secuenciación genómica.

8. Conclusiones

Acanthamoeba castellanii es un protista ubicuo, igual que los virus gigantes (GV), con potencial evidente para la identificación de virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño, por ser un hospedero común de estos entes. Teniendo en cuenta la ejecución de cultivos axénicos de *Acanthamoeba castellanii* diluidos, se concluye que la disolución de células amebales, con menor inóculo de amebas y mayor cantidad de medio de desarrollo amebal PYG, permite disponer de células en menor cantidad y con una disposición espacial más clara. Lo anterior se ultima en esta investigación como ventajoso para el desarrollo de cultivos monoxénicos de *Acanthamoeba castellanii* y los posibles GV provenientes de inóculos ambientales, dado que esto permite que la complejidad del conteo, observación, captura e identificación de efectos citopáticos (CPE) post infección viral, sea menor.

En cuanto a la observación e identificación de los CPE suscitados en las células de *Acanthamoeba castellanii* de los cultivos monoxénicos, mediante microscopía invertida de lapso de tiempo, en resumen, se registraron siete CPE que revelan la eventual posible presencia de GV en los cuatro ecosistemas lacustres de la ciudad de Loja: Daniel Álvarez Burneo, Jipiro, Carigán y Punzara. Este descubrimiento pone de manifiesto la presencia de interacciones del hospedero amebal *Acanthamoeba castellanii* con los posibles GV infectantes presentes en los ecosistemas, resaltando que los GV son entes con presencia potencial en ecosistemas acuáticos, independiente de la disposición de parámetros naturales, mostrando su capacidad de resiliencia y adaptación a diferentes ambientes.

La complejidad, particularidad y especificidad de CPE ocasionados por los GV hace viable describir las posibles especies de GV infectantes de acuerdo a registros bibliográficos. En conclusión, en esta investigación son evidentes los efectos citopáticos que irrumpieron la viabilidad de *Acanthamoeba castellanii* en todas las experimentaciones producto de la inoculación con muestras ambientales procedentes de las cuatro lagunas, con lo que se asume la posible presencia de dos virus gigantes, donde Tupanvirus presuntamente está presente en la laguna Daniel Álvarez Burneo, dada la disposición de morfogénesis de la ameba en racimos; mientras que las lagunas de Jipiro, Carigán y Punzara, contengan posiblemente Mimivirus. Es así que se concluye que las interacciones entre el ambiente – hospedero – GV son tan diversas que requieren ser analizadas para reconocer la diversidad de entes presentes en el medio.

9. Recomendaciones

Se recomienda la replicación de esta investigación implementando técnicas más avanzadas de microscopía, para capturar CPE que requieren de películas iconográficas para su descripción, así como para reconocer físicamente los virus gigantes infectantes de los ecosistemas estudiados. De igual forma, realizar el análisis con secuenciación genómica molecular para una detección más precisa y detallada de los entes infectantes.

Dada la posibilidad de la presencia de más de un potencial virus gigante infectante en un mismo ecosistema lacustre, se recomienda la ejecución de este estudio aplicado a un solo ecosistema, de modo que se pueda obtener mayor cantidad de replicaciones por tratamiento, lo que podría dar paso a la descripción de posiblemente más y diferentes CPE y morfogénesis virales. Cabe recalcar que esta sugerencia pueda estar sujeta y aplicada en diferentes investigaciones para cada ecosistema de este estudio o cualquier otro ecosistema acuático de interés.

Y finalmente, este estudio revela la necesidad del reconocimiento de la diversidad de los ecosistemas en sus distintos niveles, para la obtención de herramientas que permitan aprovechar los recursos genéticos que, sin la identificación de entes u organismos microscópicos, se están descartando, dejando de lado más y mejores posibilidades útiles y sostenibles a nivel genético en función del ambiente y la salud pública.

10. Bibliografía

- Abrahão, J. S., Dornas, F. P., Silva, L. C. F., Almeida, G. M., Boratto, P. V. M., Colson, P., La Scola, B., y Kroon, E. G. (2014). *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus and other giant viruses: an open field to outstanding discoveries. *Virology Journal*, *11(1)*, 120. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-120>
- Abrahão, J., Silva, L., Silva, L.S. *et al.*, (2018). Tailed giant Tupanvirus possesses the most complete translational apparatus of the known virosphere. *Nat Commun* *9*, 749 <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03168-1>
- Adl, S. M., Bass, D., Lane, C. E., Lukeš, J., Schoch, C. L., Smirnov, A., ... Zhang, Q. (2018). Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. doi:10.1111/jeu.12691
- Aherfi, Sarah; Colson, Philippe; La Scola, Bernard; Raoult, Didier (2016). *Giant Viruses of Amoebas: An Update*. *Frontiers in Microbiology*, *7*(). doi:10.3389/fmicb.2016.00349
- Alarcón, D., y Flores, R. (2018). Virus: pequeños gigantes que dominan el planeta. *Comunicaciones libres*, *69(2)*.
- Anderson IJ, Watkins RF, Samuelson J, Spencer DF, Majoros WH, Gray MW, Loftus BJ. (2005). Gene discovery in the *Acanthamoeba castellanii* genome. *Protist*. *156(2)*:203-14. doi: 10.1016/j.protis.2005.04.001.
- Andrade, Ana Cláudia dos S. P.; Arantes, Thalita S.; Rodrigues, Rodrigo A. L.; Machado, Talita B.; Dornas, Fábio P.; Landell, Melissa F.; Furst, Cinthia; Borges, Luiz G. A.; Dutra, Lara A. L.; Almeida, Gabriel; Trindade, Giliane de S.; Bergier, Ivan; Abrahão, Walter; Borges, Iara A.; Cortines, Juliana R.; de Oliveira, Danilo B.; Kroon, Erna G.; Abrahão, Jônatas S. (2018). Ubiquitous giants: a plethora of giant viruses found in Brazil and Antarctica. *Virology Journal*, *15(1)*, 22. doi:10.1186/s12985-018-0930-x

- Andreani, Julien; Verneau, Jonathan; Raoult, Didier; Levasseur, Anthony; La Scola, Bernard (2018). Deciphering viral presences: two novel partial giant viruses detected in marine metagenome and in a mine drainage metagenome. *Virology Journal*, 15(1), 66–. doi:10.1186/s12985-018-0976-9
- Aoki K, Hagiwara R, Akashi M, Sasaki K, Murata K, Ogata H, Takemura M. (2019). Quince marsellavirus aislados recientemente de tres muestras de agua en Japón revelan la diversidad local de Marseilleviridae. *Microbiol frontal* 10:1152. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01152>.
- Bäckström, Disa; Yutin, Natalya; Jørgensen, Steffen L.; Dharamshi, Jennah; Homa, Felix; Zaremba-Niedwiedzka, Katarzyna; Spang, Anja; Wolf, Yuri I.; Koonin, Eugene V.; Ettema, Thijs J. G.; Novick, Richard P. (2019). Virus Genomes from Deep Sea Sediments Expand the Ocean Megavirome and Support Independent Origins of Viral Gigantism. *mBio*, 10(2), –. doi:10.1128/mBio.02497-18
- Bisio H, Legendre M, Giry C, Philippe N, Alempic JM, Jeudy S, Abergel C., (2023). Evolution of giant pandoravirus revealed by CRISPR/Cas9. *Nat Commun*. 14(1):428. doi: 10.1038/s41467-023-36145-4. PMID: 36702819; PMCID: PMC9879987.
- Bonkowski, M. (2004). Protozoa and plant growth: the microbial loop in soil revisited. *New Phytologist*, 162(3), 617–631. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2004.01066.X>
- Boratto, Paulo V. M.; Oliveira, Grazielle P.; Machado, Talita B.; Andrade, Ana Cláudia S. P.; Baudoin, Jean-Pierre; Klose, Thomas; Schulz, Frederik; Azza, Saïd; Decloquement, Philippe; Chabrière, Eric; Colson, Philippe; Levasseur, Anthony; La Scola, Bernard; Abrahão, Jánatas S. (2020). Yaravirus: A novel 80-nm virus infecting *Acanthamoeba castellanii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (), 202001637–. doi:10.1073/pnas.2001637117
- Boyer M, Yutin N, Pagnier I, Barrassi L, Fournous G, Espinosa L, et al., (2009). Giant Marseillevirus highlights the role of amoebae as a melting pot in emergence of chimeric microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106: 21848–53.

- Brandes, Nadav; Linial, Michal (2019). Giant Viruses—Big Surprises. *Viruses*, 11(5), 404. doi:10.3390/v11050404
- Brown, T. J., y Cursons, R. T. M. (1977). Pathogenic Free-living Amebae (PFLA) from Frozen Swimming Areas in Oslo, Norway. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 9(3), 237–240. doi:10.3109/inf.1977.9.issue-3.16
- Camargo, J., Alonso, A. & De La Puente, M., (2005). Eutrophication downstream from small reservoirs in mountain rivers of Central Spain. *Water research*, 39, 3376 – 3384.
- Castrillón, J. C., y Orozco, L. P. (2013). *Acanthamoeba spp.* como parásitos patógenos y oportunistas. *Revista Chilena de Infectología*, 30(2), 147–155. doi:10.4067/s0716-10182013000200005
- Colson, Philippe; de Lamballerie, Xavier; Fournous, Ghislain; Raoult, Didier (2012). Reclassification of Giant Viruses Composing a Fourth Domain of Life in the New Order Megavirales. *Intervirology*, 55(5), 321–332. doi:10.1159/000336562
- Colson, Philippe; La Scola, Bernard; Levasseur, Anthony; Caetano-Anollés, Gustavo; Raoult, Didier (2017). Mimivirus: leading the way in the discovery of giant viruses of amoebae. *Nature Reviews Microbiology*, 15(4), 243–254. doi:10.1038/nrmicro.2016.197
- Contreras, J., Flores, T. G., Talavera, T. D. R. A., Martínez, Z. E., y López, N. A. P. (2017). ¿Qué son los microbios? *Ciencia: revista de la Academia Mexicana de Ciencias*, Vol. 68, N° 2, 10-17. ISSN 1405-6550
- De Souza, G. A. P., Queiroz, V. F., Lima, M. T., de Sousa Reis, E. V., Coelho, L. F. L., & Abrahão, J. S. (2020). Virus goes viral: An educational kit for virology classes. *Virology Journal*, 17(1), 13. doi: 10.1186/s12985-020-1291-9.
- Dornas, Fábio P.; Khalil, Jacques Y. B.; Pagnier, Isabelle; Raoult, Didier; Abrahão, Jônatas; La Scola, Bernard (2015). Isolation of new Brazilian giant viruses from

- environmental samples using a panel of protozoa. *Frontiers in Microbiology*, 6(). doi:10.3389/fmicb.2015.01086
- Dos Santos Oliveira, Juliana; Anastasiya A Lavell; Victor Alejandro Essus; Getúlio Souza; Gabriel Henrique Pereira Nunes; Eduarda Benício; Allan Jefferson Guimarães; Kristin N Parent; Juliana R Cortines; (2021). Structure and physiology of giant DNA viruses. *Current Opinion in Virology*, (). doi:10.1016/j.coviro.2021.04.012
- Fischer, M. G. (2016). Giant viruses come of age. *Current Opinion in Microbiology*, 31, 50–57. doi:10.1016/j.mib.2016.03.001
- Francis R, Ominami Y, Bou Khalil JY, La Scola B. (2019). Aislamiento de alto rendimiento de virus gigantes mediante detección de alto contenido. *Común Biol 2*: 216. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0475-6>.
- Fukaya S, Takemura M. (2021). Kinetic analysis of *Acanthamoeba castellanii* infected with giant viruses quantitatively revealed process of morphological and behavioral changes in host cells. *Microbiol Spectr* 9: e00368-21. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00368-21>.
- Fukaya S, Takemura M. (2023). Analysis of Morphological Changes in the Nucleus and Vacuoles of *Acanthamoeba castellanii* following Giant Virus Infection. *Microbiol Spectr* 11: e04182-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04182-22>.
- Fukaya, S., Aoki, K., Kobayashi, M., & Takemura, M. (2020). Kinetic Analysis of the Motility of Giant Virus-Infected Amoebae Using Phase-Contrast Microscopic Images. *Frontiers in Microbiology*, 10. doi:10.3389/fmicb.2019.03014
- Garate, M., Cao, Z., Bateman, E., & Panjwani, N. (2004). Cloning and Characterization of a Novel Mannose-binding Protein of *Acanthamoeba*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(28), 29849–29856. doi:10.1074/jbc.m402334200
- García-Gil, L. J., y Camacho, A. (2001). Anaerolimnología: Pequeña guía para el muestreo en aguas microaeróbicas y anóxicas en lagos y embalses estratificados. *Asociación*

Española de Limnología, Madrid - España. Limnetica, 20(1), 179-186. ISSN: 0213-8409

Kardaras G, Marcovici I, Rusu D, Dehelean C, Coricovac D, Iorio-Siciliano V, Sculean A, Stratul SI, (2023). In-Vitro Safety Evaluation of Sodium Hypochlorite (NaOCl) as Part of Step 2 and Maintenance Therapy Protocols in Patients with Periodontitis Stages III-IV. *Oral Health Prev Dent*; 21:103-112. doi: 10.3290/j.ohpd.b4009557.

Khalil, Jacques Yaacoub Bou; Andreani, Julien; La Scola, Bernard (2016). Updating strategies for isolating and discovering giant viruses. *Current Opinion in Microbiology*, 31(80–87). doi: 10.1016/j.mib.2016.03.004

La Scola B, Audic S, Robert C, Jungang L, de Lamballerie X, Drancourt M, Birtles R, Claverie JM, Raoult D. (2003). A giant virus in amoebae. *Science* 299:2033. <https://doi.org/10.1126/science.1081867>

Lorenzo-Morales, J., Khan, N. A., & Walochnik, J. (2015). An update on Acanthamoeba keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*, 22, 10. <https://doi.org/10.1051/parasite/2015010>

Machado TB, de Aquino ILM, Azevedo BL, Serafim MS, Barcelos MG, Andrade ACSP, Reis E, Ullmann LS, Pessoa J Jr, Costa AO, Rosa LH, Abrahão JS., (2024). A long-term prospecting study on giant viruses in terrestrial and marine Brazilian biomes. *Virol J*. 21(1):135. doi: 10.1186/s12985-024-02404-z.

Machado, T. B., de Aquino, I. L. M., & Abrahão, J. S. (2022). Isolation of Giant Viruses of *Acanthamoeba castellanii*. *Current Protocols*, 2(5), e455. <https://doi.org/10.1002/CPZ1.455>

Marciano-Cabral, F., & Cabral, G. (2003). *Acanthamoeba spp.* as Agents of Disease in Humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(2), 273–307. doi:10.1128/cmr.16.2.273-307.2003

Mateu, M. G. (2013). Introduction: The Structural Basis of Virus Function. *Structure and Physics of Viruses*, 68, 3. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6552-8_1

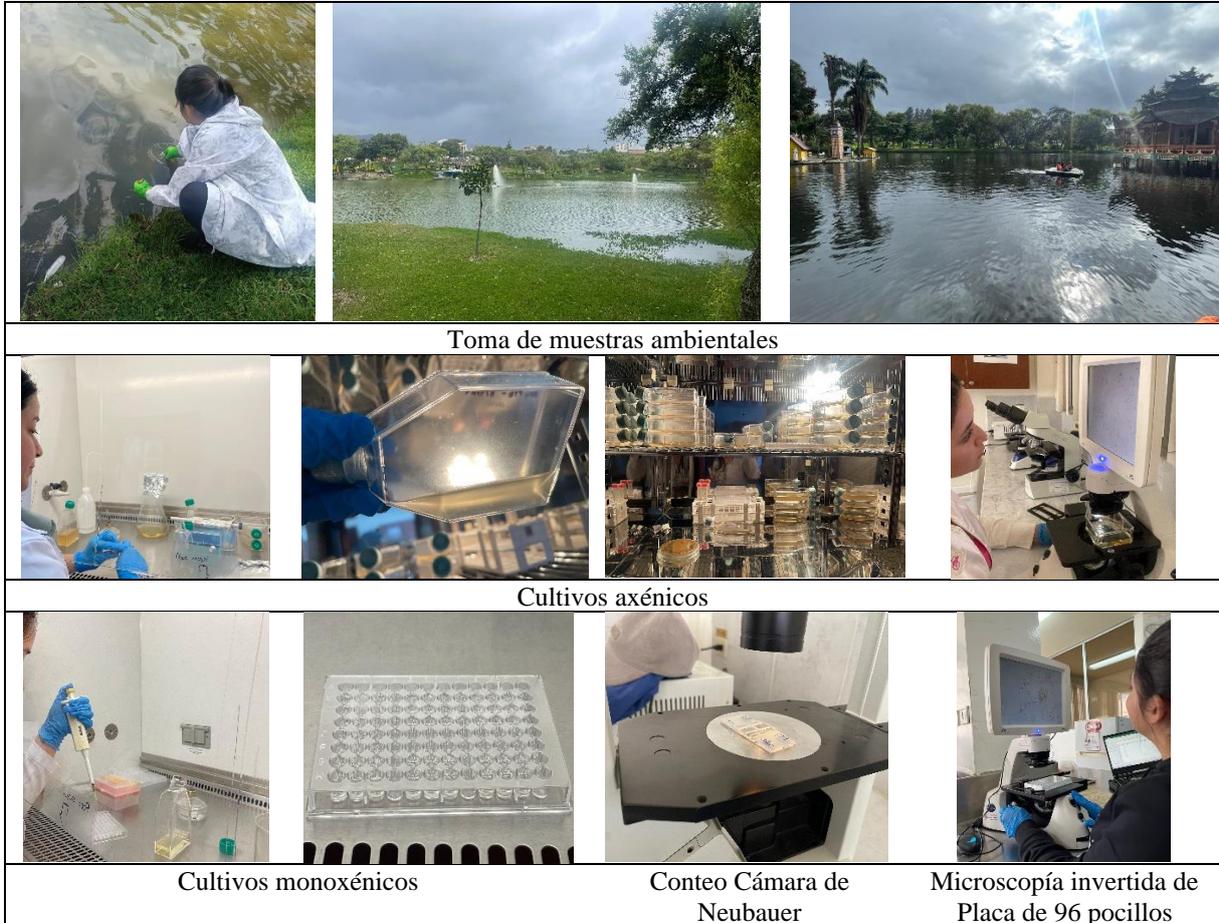
- Nwachuku, N., & Gerba, C. P. (2004). Health Effects of *Acanthamoeba spp.* and Its Potential for Waterborne Transmission. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, () 93–131. doi:10.1007/0-387-21729-0_2
- Oliveira, Grazielle; Andrade, Ana; Rodrigues, Rodrigo; Arantes, Thalita; Boratto, Paulo; Silva, Ludmila; Dornas, Fábio; Trindade, Giliane; Drumond, Betânia; La Scola, Bernard; Kroon, Erna; Abrahão, Jônatas (2017). Promoter Motifs in NCLDVs: An Evolutionary Perspective. *Viruses*, 9(1), 16–. doi:10.3390/v9010016
- Plan de Uso y Gestión del Suelo del Cantón Loja (PUGS). (2021). Diagnóstico ciudad de Loja. Plan de Uso y Gestión del Suelo del Cantón Loja 2020 – 2032. Municipio de Loja, Loja – Ecuador.
- Philippe N, Legendre M, Doutre G, Couté Y, Poirot O, Lescot M, Arslan D, Seltzer V, Bertaux L, Bruley C, Garin J, Claverie JM, Abergel C. (2013). Pandoraviruses: amoeba viruses with genomes up to 2.5 Mb reaching that of parasitic eukaryotes. *Science*, 341(6143):281-6. doi: 10.1126/science.1239181.
- Salazar-Ardiles C, Asserella-Rebollo L, Andrade DC. (2022). Free-Living Amoebas in Extreme Environments: The True Survival in our Planet. *Biomed Res Int*. doi: 10.1155/2022/2359883.
- Santos, R.; & Carrapiço, F. (2011). *Frank Ryan, Virolution*. 53(2), 97–100. doi:10.1007/s13199-011-0111-9
- Schuster, F. L. (2002). Cultivation of Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(3), 342–354. doi:10.1128/cmr.15.3.342-354.2002
- Schuster, F. L., & Visvesvara, G. S. (2004). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology*, 34(9), 1001–1027. doi:10.1016/j.ijpara.2004.06.004
- Siddiqui, R., & Khan, N. A. (2012). Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites and Vectors*, 5(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-6/FIGURES/6>

- Svitkina, T. (2018). The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *10(1)*. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A018267>
- Takashi Yamada (2011). *Giant viruses in the environment: their origins and evolution.* , *1(1)*, 58–62. doi:10.1016/j.coviro.2011.05.008
- Takemura M. (2020). Medusavirus Ancestor in a Proto-Eukaryotic Cell: Updating the Hypothesis for the Viral Origin of the Nucleus. *Front Microbiol.* doi:10.3389/fmicb.2020.571831. PMID: 33013805; PMCID: PMC7494782.
- Tsai, C.-M., Chen, J.-W., & Lin, W.-C. (2020). Effects of *Acanthamoeba castellanii* on the dissolved oxygen and the microbial community under the experimental aquatic model. *Experimental Parasitology*, *218*, 107985. doi:10.1016/j.exppara.2020.107985
- Urrutia-Cordero, P., Agha, R., Cirés, S., Lezcano, M. Á., Sánchez-Contreras, M., Waara, K.-O., ... Quesada, A. (2013). Effects of harmful cyanobacteria on the freshwater pathogenic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Aquatic Toxicology*, *130-131*, 9–17. doi:10.1016/j.aquatox.2012.12.019
- Vásquez Tituana A. C., (2024). *Cultivo de amebas del género Acanthamoeba ATCC 30010 con enfoque al estudio de virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño* [Trabajo de Integración Curricular previa a la obtención del título de Ingeniera Ambiental, Universidad Nacional de Loja]. Repositorio institucional, <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/29075>
- Visvesvara, G. S. (1991). Classification of *Acanthamoeba*. *Clinical Infectious Diseases*, *13(Supplement_5)*, S369–S372. doi:10.1093/clind/13.supplement_5.s369
- 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 Immunology & Medical Microbiology*, *50(1)*, 1–26. doi:10.1111/j.1574-695x.2007.00232.x

- Wang L, Song H, An J, Dong B, Wu X, Wu Y, Wang Y, Li B, Liu Q, Yu W, (2022). Nutrients and Environmental Factors Cross Wavelet Analysis of River Yi in East China: A Multi-Scale Approach. *Int J Environ Res Public Health*, 20(1):496. doi: 10.3390/ijerph20010496. PMID: 36612818; PMCID: PMC9819906.
- Yaakov, L. B., Mutsafi, Y., Porat, Z., Dadosh, T., and Minsky, A. (2019). Kinetics of mimivirus infection stages quantified using image flow cytometry. *Cytom. A* 95, 534-534. doi: 10.1002/cyto.a.23770
- Yamada, T. (2011). Giant viruses in the environment: their origins and evolution. *Current Opinion in Virology*, 1(1), 58–62. <https://doi.org/10.1016/J.COVIRO.2011.05.008>
- Yin, Z., Kanade, T., & Chen, M. (2012). Understanding the phase contrast optics to restore artifact-free microscopy images for segmentation. *Medical Image Analysis*, 16(5), 1047–1062. doi: 10.1016/j.media.2011.12.006
- Yoshikawa G, Blanc-Mathieu R, Song C, Kayama Y, Mochizuki T, Murata K, Ogata H, & Takemura M. (2019). Medusavirus, a novel large DNA virus discovered from hot spring water. *J Virol* 93:e02130-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.02130-18>
- Yutin N, Wolf YI, Raoult D, et al. (2009). Eukaryotic large nucleocytoplasmic DNA viruses: clusters of orthologous genes and reconstruction of viral genome evolution. *Virol J*, 6:223.
- Yutin, Natalya, Wolf, Yuri I. & Koonin, Eugene V. (2014). Origin of giant viruses from smaller DNA viruses not from a fourth domain of cellular life. *Virology*, 466-467(), 38–52. doi:10.1016/j.virol.2014.06.032
- Zhang R, Endo H, Takemura M, Ogata H. (2021). RNA Sequencing of Medusavirus Suggests Remodeling of the Host Nuclear Environment at an Early Infection Stage. *Microbiol Spectr*, 9(2):e0006421. doi: 10.1128/Spectrum.00064-21.

11. Anexos

Anexo 1. Procedimiento para desarrollar cultivos axénicos y monoxénicos de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010



Anexo 2. Certificado de traducción del resumen

Loja, 12 de noviembre de 2024

Mgtr.

Edgar M. Castillo C.

**MAGÍSTER EN PEDAGOGÍA PARA LA ENSEÑANZA DEL IDIOMA INGLÉS
COMO LENGUA EXTRANJERA**

Certifica. -

Haber traducido de español a inglés el resumen del trabajo de integración curricular titulado: **Viabilidad de *Acanthamoeba castellanii* frente a virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño**, de la autoría de la estudiante Claudia Elizabeth Freire González, C.I.: 0705641322.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad, pudiendo la interesada hacer uso del presente documento cuando lo considere conveniente.



Edgar M. Castillo C.
EFL TEACHER

Nro. Reg. Senescyt: 1031-07-785748